

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Synthese Sulfoxid-basierter Reagenzien für die Proteomik
und deren Anwendung**

Michael Stadlmeier

aus

Wangen im Allgäu

2019

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 26.06.2019

Michael Stadlmeier

Dissertation eingereicht am: 20.05.2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachterin: Dr. Stefanie Kellner

Mündliche Prüfung am: 21.06.2019

Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

S. Schiffers, T. M. Wildenhof, K. Iwan, M. Stadlmeier, M. Müller, T. Carell: Label-Free Quantification of 5-Azacytidines Directly in the Genome, *Helv. Chim. Acta.* **2019**, *102*, e1800229; DOI: 10.1002/hlca.201800229

C. Schneider, S. Becker, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Stadlmeier, T. Carell: Noncanonical RNA Nucleosides as Molecular Fossils of an Early Earth-Generation by Prebiotic Methylations and Carbamoylations, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5943; DOI:10.1002/anie.201801919

M. Stadlmeier*, J. Bogena*, M. Wallner*, M. Wühr, T. Carell: A Sulfoxide-Based Isobaric Labelling Reagent for Accurate Quantitative Mass Spectrometry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2958; DOI:10.1002/anie.201708867

M Ehrlich, M. J. Gattner, B. Viverge, J. Bretzler, D. Eisen, M. Stadlmeier, M. Vrabel, T. Carell: Orchestrating the Biosynthesis of an Unnatural Pyrrolysine Amino Acid for Its Direct Incorporation into Proteins Inside Living Cells, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 1; DOI: 10.1002/chem.201500971

* Beitrag der Autoren zu gleichen Teilen.

„Flying is learning to throw yourself at the ground and miss.“

The Hitchhiker's Guide to the Galaxy by *Douglas Adams*

Danksagung

Einige Zeit lang habe ich nun an der LMU München studiert und geforscht, um jetzt diese Doktorarbeit in meinen Händen halten zu können. Hierbei hatte ich das Glück, viele Menschen kennen zu lernen, welche mich in den letzten Jahren tatkräftig unterstützt haben – nicht wenige sind dabei zu guten Freunden geworden. Deswegen ist es mir eine Freude, den Beginn dieser Arbeit zu nutzen, um mich bei diesen Menschen zu bedanken.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* für die Betreuung meiner Master- und Doktorarbeit, die Vergabe der faszinierenden Forschungsthemen und die Beschaffung der Forschungsmittel, wodurch es mir an keiner Möglichkeit mangelte. Ohne die Freiheit, welche er mir bei der Forschung gab, hätte ich vermutlich nie meine Leidenschaft für die Massenspektrometrie entdeckt – vielen Dank dafür.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens, wertvolles Feedback und viele nette Gespräche danke ich *Dr. Stefanie Kellner*. Auch den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission möchte ich für Ihre Zeit danken, sich mit meiner Prüfung zu beschäftigen.

Bei *Dr. Markus Müller* bedanke ich mich herzlich für die Beantwortung von unzähligen Fragen, der Organisation von einer endlosen Liste an Dingen, der tatkräftigen Unterstützung bei Computeranliegen, viele aufmunternde Worte und natürlich den stets zugänglichen Werkzeugkoffer, weswegen ich mir immer noch keinen eigenen bestellen musste. Ob es jetzt dafür wohl zu spät ist? ;)

Auch weiteren essenziellen alten und neuen Mitgliedern des Arbeitskreises gilt mein Dank an dieser Stelle: *Frau Slava Gärtner* für die Zähmung der Bürokratie, sowie *Frau Voß*, *Kerstin Kurz* und *Kristof Hufnagel*, welche mich auch kurzfristig stets mit Chemikalien, Thermo-Päckchen oder Tüpfelkapillaren versorgt haben.

Während meiner Arbeit habe ich mich gefreut, mehrere Forschungsarbeiten betreuen zu dürfen. Deswegen bedanke ich mich bei *Desirée Herdegen*, *Johanna S. Frickel*, *Sarah Breuer*, *Anna Closs*, *Verena Langowski*, *Kristina Krauskopf*, *Oleg Grossmann*, *Lina Beisswenger* und *Aila Rothweiler*. Vielen Dank dafür, dass ihr einen entscheidenden Teil zu dieser Arbeit beigetragen, mir einige Säulen abgenommen, die Zeit im Labor (noch) lustiger gemacht und mir eine super Ausrede gegeben habt, an die Candybar zu gehen – natürlich nur um den Praktikanten etwas mitzubringen. Ich hoffe, dass ich euch ein bisschen was von meiner Begeisterung für die OC und die Masse mitgegeben habe, euch nicht zu oft bei Laborkollegen gelassen habe, wenn die Masse nach mir rief, und wünsche euch viel Erfolg auf euren weiteren Wegen.

Ich danke *Dr. Stefan Schießler*, dass er mich schon früh für den AK Carell rekrutiert und meine Liebe zu Coca Cola in neue Dimensionen befördert hat. Bei *Dr. Barbara Steigenberger* bedanke ich mich für die super Betreuung während der Masterarbeit, die gute Zusammenarbeit, unsere Freundschaft und dass sie mich zusammen mit *Dr. Sandra Wiedbrauk* davon überzeugt hat, dass Kaffeepausen wirklich eine verdammt gute Erfindung sind. *Dr. David Eisen* danke ich für meine ersten Massenerfahrungen unter seiner Anleitung, für lustige Zeiten im Labor, und dass er mir die Angst vor teuren Geräten nahm – selbst, wenn diese größer sind als ich. Bei *Dr. Edris Parsa* bedanke ich mich, weil er sich mit mir durch etliche Experimente schlug und den Laboralltag sehr viel angenehmer, lustiger und weniger ernst machte.

Nicht nur diese ehemaligen Kollegen haben die Zeit im Arbeitskreis unvergesslich gemacht, sondern auch allen anderen alten und neuen Mitgliedern des AK Carells (und AK Kellners!). Ich danke ihnen für die großartige Atmosphäre, die Unterstützung im und außerhalb des Labors, legendäre Partys (bei denen man auch ab und an mal an der Decke hing), schöne Ausflüge, Hugos in Venedig und natürlich auch die gute Zusammenarbeit an wissenschaftlichen Projekten. Ein großer Dank gilt meinem Labor *F4.012*, das mich trotz meines halben MS-Analytikerdaseins super aufgenommen hat und mir selbst meine Argonsucht verzieh - mir hat es sogar so gut darin gefallen, dass ich extra lange blieb und vorübergehend Laborältester werden konnte. Ich wünsche euch allen weiterhin viel Erfolg bei Monstersäulen! Auch danke ich allen Bärinnen und Bären des Büros, welche mir die Schreibzeit angenehmer und spannender gemacht haben (und mir einen guten Grund gaben, teure Kopfhörer zu kaufen ;)).

Bei *Dr. Charlotte Ebert* möchte ich mich für offene Ohren, gute Ratschläge, Step-Aerobic, Books from Boxes, eine gigantische USA-Konferenz bedanken und dafür, dass sie einfach die beste Laborpartnerin der Welt ist! *Dr. Katharina Iwan* danke ich unter anderem für viele Aufmunterungen, gemeinsames Verrücktwerden in Bärenhöhlen, einige ausgegebene Getränke und interessante Gespräche über Ionen und wo sie zu finden sind. *Christina Schneider* bin ich dankbar für spontane Nerf-Gefechte, phänomenale Karaoke-Duette, leckere Aufmunterungs-Marzipan-Mercis, Kaffee- und Orbitrappausen, ihr Verständnis, auch wenn ich mal vollkommen crazy bin, und dafür, dass man mit ihr zusammen mindestens 21 km laufen kann.

Dr. Miriam Wallner und *Jana Bogena* danke ich für die unermüdliche Belieferung mit Molekülen, viele Synthesestunden, das gegenseitige Aufbauen, wenn die Chemie mal nicht so wollte wie wir, und super spaßige Zeiten, auch mal außerhalb des Labors.

Bei *Leander Runtsch* bedanke ich mich für die stete Unterstützung an der Massefront, die gute Zusammenarbeit bei Experimenten, unzählige Crosslinkverdaus, die Benutzung ALLER seiner Puffer, nerdige Gespräche über die Bench hinweg (sorry BC-Labor!) und die Korrektur meiner mathematischen Meisterleistungen. Ohne ihn hätte ich sicher schon an die ein oder andere Quelle gefasst ;)

Auch meiner dritten Heimat nach F4.012 und BC-Labor, dem 1. Stock, möchte ich herzlich danken. *Dr. Oliver Baron* und *Martina Schuster* danke ich für nette Gespräche, großartige Zusammenarbeit bei Schüleraktionen und dem Start meiner TV-Karriere – ihr seid einfach spitze! Herrn *Dr. Werner Spahl* bin ich dankbar für die Unterstützung an den Massen, Ersatzteile und gute Ratschläge. *Frau Sonja Kosak* danke ich für die nette Atmosphäre im Masseraum und für ihre Süßigkeiten, welche mich bei einigen langen HPLC-Nächten gerettet haben. *Felix Kalfa* danke ich für die zuverlässige Belieferung mit Schutzbrillen bei allen Aktionen.

Bei *Prof. Dr. Martin Wühr* bedanke ich mich für die spannende Kooperation, interessante Gespräche und sehr hilfreiches Feedback sowie das zur Verfügung stellen von Messzeit und Analysesoftware. Ich freue mich bereits sehr auf die Zeit in seinem Labor!

Bei *Leander Runtsch*, *Christina Schneider*, *Dr. Katharina Iwan* und *Dr. Mirko Wagner* bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Claudia danke ich für die gute Versorgung mit Schokolade und ihre Überzeugung, dass auch Michis mal Mittagessen brauchen. Auch bei *Felix*, *Daniela*, *Ed* und *Johannes* möchte ich mich dafür bedanken, dass wir uns gemeinsam durchs Studium geschlagen, den Bayrischen Wald und andere Orte unsicher gemacht und etliche Monster gemeinsam besiegt haben.

Ich danke meiner Familie und besonders meinem Bruder *Maximilian*, welcher mich für seinen Igel begeistert und mich bei der Suche nach Bugs unterstützt hat, wann immer ich das eine oder andere brauchte.

Zuletzt möchte ich meiner Frau *Sandra* herzlich danken, welche mich seit dem ersten Studientag in meinem Leben begleitet, mir in allen Situationen zur Seite steht, mir Kraft und Mut spendet, sich auch komische Massenprobleme geduldig anhört, und ohne die ich sicher nicht so weit gekommen wäre. Ich freue mich schon darauf, mit dir unseren weiteren gemeinsamen Weg zu gehen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	V
2	Summary	XI
3	Einleitung	1
3.1	Proteomik	1
3.1.1	Massenspektrometrie-basierte Proteomik	4
3.1.2	Instrumenteller Aufbau von verschiedenen Massenspektrometern	7
3.1.3	Prinzip der Protein-Identifikation in der Massenspektrometrie	15
3.2	Protein-Protein-Crosslinking	21
3.2.1	Generelles Prinzip	22
3.2.2	Design der Reagenzien	28
3.3	Quantitative Proteomik durch Isobarenmarkierung	34
3.3.1	Grundprinzip der Isobarenmarkierung	36
3.3.2	Herausforderungen und Methodenvariationen	39
4	Zielsetzung	43
5	Ergebnisse und Diskussion	45
5.1	Design, Synthese und Anwendung von Protein-Protein-Crosslinkern	45
5.1.1	Modifikation eines Crosslinkers mit Pyrrol-Grundstruktur	45
5.1.2	Etablierung von Crosslinking-Experimenten mit DSSO 10	50
5.1.3	Entwicklung von anreicherbaren, Sulfoxid-basierten Crosslinkern	64
5.1.4	Untersuchung zur Crosslink-Anreicherung durch CuAAC-Modifizierung	78
5.1.5	Autorenbeiträge	83
5.2	Synthese und Evaluation neuartiger isobarer Quantifizierungsreagenzien	84
5.2.1	Entwicklung einer neuen Reporterstruktur für hohe <i>Multiplexing</i> -Kapazitäten	84
5.2.2	Inkorporation der PyrRep-Struktur in ein Pyrrol-basiertes Reagenz	88
5.2.3	Zugang zu Sulfoxid-basierenden Teststrukturen	90
5.2.4	Synthese des SulfoXid-Tags	96

5.2.5	Erste massenspektrometrische Untersuchungen des SOT-Reagenzes	100
5.2.6	Entwicklung eines Computerprogramms zur Spektrenanalyse	105
5.2.7	Massenspektrometrische Untersuchung komplexer SOT-markierter Proben	109
5.2.8	Limitationen beim Einsatz der SOT-Reagenzien	117
5.2.9	Untersuchung einer modifizierten Reagenzstruktur	119
5.2.10	Autorenbeiträge	124
6	Ausblick	127
6.1	Entwicklung von massespaltbaren und anreicherbaren XL-Reagenzien	127
6.2	Entwicklung eines neuartigen isobaren Quantifizierungsreagenzes	128
7	Experimentalteil	129
7.1	Chemische Materialien und Methoden	129
7.1.1	Chemikalien und Lösemittel	129
7.1.2	Chromatographie	129
7.1.3	Infrarotspektroskopie (IR)	130
7.1.4	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	130
7.1.5	Massenspektrometrie kleiner Moleküle	130
7.1.6	Rotationsverdampfer	130
7.1.7	Schmelzpunktmessung	131
7.2	Materialien und Methoden zur Durchführung der Crosslinking-Experimente	131
7.2.1	Konzentration von Peptidproben	131
7.2.2	Reaktion von Crosslinkern mit Arginin	131
7.2.3	Größenausschlusschromatographie (SEC)	131
7.2.4	Optimiertes Crosslinking-Protokoll	132
7.2.5	Durchführung der CuAAC-Reaktion auf der Proteinebene	132
7.2.6	<i>nano</i> LC-MS-Methoden	133
7.2.7	Datenauswertung	135
7.3	Materialien und Methoden zur Durchführung der isobaren Quantifizierungsexperimente	137

7.3.1	Konjugation mit Testpeptiden	137
7.3.2	Konjugation mit komplexen Lysaten, MS-Analyse und Datenauswertung	137
7.4	Synthese des Dithiopyrrollinkers und von DSSO	138
7.4.1	3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-ol (4)	138
7.4.2	1-Bromo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in (5)	138
7.4.3	1-(3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-yl)-1H-pyrrol (6)	139
7.4.4	1-(3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-yl)-2,5-dithiocyanato-1H-pyrrol (7)	140
7.4.5	2,2'-(1-(3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-yl)-1H-pyrrol-2,5-diyl)diessigsäure (8)	141
7.4.6	Bis(<i>N</i> -hydroxysuccinimidyl)-2,2'-(1-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-yl)-1H-pyrrol-2,5-diyl)diacetat (9)	142
7.4.7	3,3'-Sulfinyldipropionsäure (12)	142
7.4.8	Bis(<i>N</i> -hydroxysuccinimidyl)-3,3'-sulfinyldipropionat (10)	143
7.5	Synthesen von HSAK (13) und HSAKp (14)	143
7.5.1	DL-Homocystin bis(methylester) dihydrochlorid (16)	143
7.5.2	<i>N,N'</i> -bis(Pent-4-inoyl) DL-homocystin bis(methylester) (17)	144
7.5.3	Methyl <i>S</i> -(2-methoxy-2-oxoethyl)- <i>N</i> -(pent-4-inoyl)homocysteinat (18)	145
7.5.4	<i>S</i> -(Carboxymethyl)- <i>N</i> -(pent-4-inoyl)homocystein (20)	146
7.5.5	<i>S</i> -Oxo- <i>S</i> -(carboxymethyl)- <i>N</i> -(pent-4-inoyl)homocystein (22)	146
7.5.6	<i>Bis-N-hydroxydisuccinimidyl-S</i> -(carboxymethyl)- <i>N'</i> -(pent-4-inoyl)homocysteinat (24)	147
7.5.7	<i>Bis-N-hydroxydisuccinimidyl-S-oxo-S</i> -(carboxymethyl)- <i>N'</i> -(pent-4-inoyl)homocysteinat (HSAK, 13)	148
7.5.8	Methyl <i>S</i> -(3-methoxy-3-oxopropyl)- <i>N</i> -(pent-4-inoyl)homocysteinat (19)	148
7.5.9	<i>S</i> -(2-Carboxyethyl)- <i>N</i> -(pent-4-inoyl)homocysteine (21)	149
7.5.10	<i>S</i> -Oxo- <i>S</i> -(carboxyethyl)- <i>N</i> -(pent-4-inoyl)homocystein (23)	150
7.5.11	<i>Bis-N-hydroxydisuccinimidyl-S</i> -(2-Carboxyethyl)- <i>N'</i> -(pent-4-inoyl)homocysteinat (25)	150
7.5.12	<i>Bis-N-hydroxydisuccinimidyl-S-oxo-S</i> -(carboxyethyl)- <i>N'</i> -(pent-4-inoyl)homocysteinat (HSAKp, 14)	151

7.6	Synthesen zur Entwicklung isobarer Quantifizierungsreagenzien	152
7.6.1	<i>tert</i> -Butyl (2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)carbamate (40)	152
7.6.2	N,N'-bis(3-(dimethylamino)propanoyl) DL-homocystin bis(methylester) (58)	153
7.6.3	Methyl <i>S</i> -(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)- <i>N</i> -(3-(dimethylamino)propanoyl)-L-homocysteinat (70)	153
8	Literaturverzeichnis	155
9	Abkürzungsverzeichnis	159

1 Zusammenfassung

Analog zum Begriff des Genoms, welcher die gesamte DNA eines Organismus beschreibt, wurde im letzten Jahrzehnt der Ausdruck des Proteoms etabliert. Das Proteom besteht aus der Gesamtheit aller in einer biologischen Probe vorkommenden Proteine und ist damit nicht nur höchst komplex, sondern auch dynamisch. Die Massenspektrometrie (MS)-basierte Proteomik erlaubt heutzutage die routinemäßige Identifikation von Proteinen aus sehr geringen Mengen diverser biologischer Proben, sowie die Bestimmung von Proteinmodifikationen oder auch die relative Quantifizierung der vorkommenden Proteine zwischen verschiedenen Proben. Mit Hilfe dieser beeindruckenden Methode können biologische Fragestellungen systemisch untersucht werden, um neue Kenntnisse über eine Vielzahl biologischer Systeme zu gewinnen.

Um eine große Menge an Informationen aus den zahlreichen Signalen zu gewinnen, welche in MS-Experimenten detektiert werden, ist die Proteomik jedoch in vielen Fällen auf den zusätzlichen Einsatz hochspezialisierter chemischer Reagenzien angewiesen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden solche Reagenzien entwickelt, synthetisiert, auf ihre MS-Eigenschaften hin untersucht und angewandt. Dadurch wurde zu zwei spezialisierten Gebieten der Proteomik beigetragen: dem Protein-Protein-Crosslinking und der quantitativen Proteomik.

Die Kenntnis von Proteinstrukturen und die Aufklärung von Interaktionsnetzwerken zwischen Proteinen ist entscheidend, um biologische Systeme zu verstehen. Während eines proteolytischen Verdauens, welcher typischerweise in Vorbereitung der MS-Analyse durchgeführt wird, gehen die räumlichen Informationen und die nicht-kovalenten Wechselwirkungen jedoch verloren, da die Proteine dabei in einzelne Peptide geschnitten werden. Durch den Einsatz von chemischen Reagenzien, sogenannten Crosslinkern, können zwei Aminosäuren vor dem Verdau allerdings kovalent miteinander verknüpft werden, wenn sich diese in räumlicher Nähe zueinander befinden. Damit werden die wertvollen räumlichen Informationen für die MS-Messungen konserviert, was die Anfertigung von Strukturmodellen und Protein-Protein-Interaktionskarten ermöglicht.

Um die Identifikation gecrosslinkter Peptide in komplexen Proben möglich zu machen, müssen die eingesetzten Crosslinker-Reagenzien bei geringer Energie innerhalb des Massenspektrometers spaltbar sein, um die verbundenen Peptide effizient voneinander zu trennen. In einer vorangegangenen Arbeit wurden hierfür Crosslinker mit Dithiopyrrol-Struktur entwickelt, welche Indizien für eine einfache MS-Spaltbarkeit zeigten. Durch die Synthese eines wasserlöslichen Derivates (Dithiopyrrol-XL, Abbildung 1.1A) und dessen MS-Analyse im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte jedoch demonstriert werden, dass die Effizienz der Spaltung dieser Grundstruktur zu gering für einen Einsatz als Crosslinker ist. In weiteren Experimenten wurde zunächst der bekannte Crosslinker DSSO (Abbildung 1.1B) verwendet,

um die MS-Analyse von Proben verschiedener Komplexität auf den zu Verfügung stehenden Massenspektrometern zu etablieren. Hierfür wurden sowohl MS²- als auch *pseudo*-MS³-Methoden an einem *Q Exactive HF*-Massenspektrometer verwendet, mit denen Crosslinks in einzelnen Proteinen und kleinen Proteinkomplexen analysiert werden konnten. Zur Anreicherung der in geringer Abundanz vorkommenden Crosslinks wurde eine Methode zur Größenausschlusschromatographie (SEC) der komplexen Peptidproben entwickelt, mit welcher nach Fraktionierung der Proben signifikant mehr Crosslinks detektiert werden konnten (Abbildung 1.1C). Auch die Analyse einer komplexen Probe durch Verwendung einer MS³-Methode an einem *Orbitrap Fusion Lumos*-Instrument wurde durchgeführt, um Interaktionspartner der katalytischen Domäne des TET3-Proteins zu identifizieren und erstmals durch Intraprotein-Crosslinks gestützte Strukturmodelle dieses Proteins zu generieren (Abbildung 1.1D).

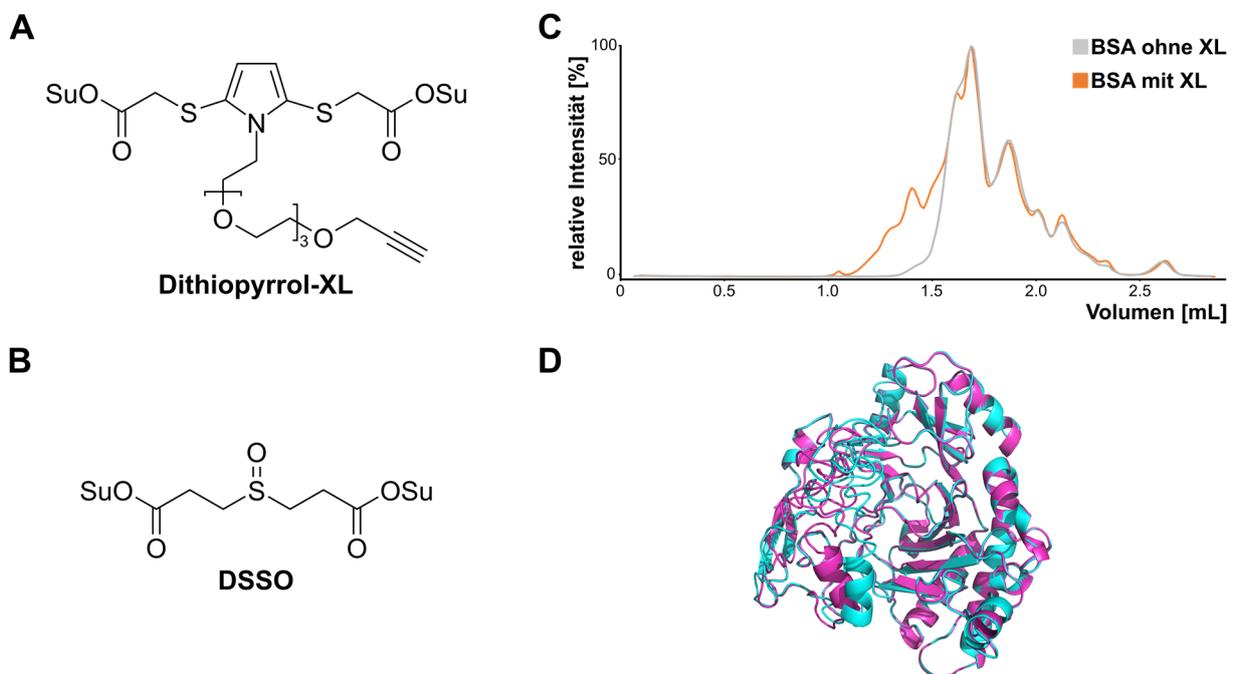


Abbildung 1.1: Strukturen untersuchter Crosslinker und Darstellung ausgewählter Ergebnisse. A) Struktur des untersuchten Dithiopyrrol-Linkers, welcher bei niedrigen Energien nicht effizient genug spaltet. B) DSSO, ein kommerziell erhältlicher spaltbarer Crosslinker. C) SEC einer Proteinprobe vor (grau) und nach (orange) Crosslinking. Im Volumen zwischen 1.0 mL und 1.5 mL können Crosslinks durch die Anreicherung besser detektiert werden. D) Strukturmodell einer verkürzten TET3cd-Sequenz vor (cyan) und nach (magenta) Verwendung der detektierten XLs als Längenrestriktionen.

Da die geringe Abundanz der Crosslinks in den hochkomplexen Peptidproben deren Detektion erheblich erschwert oder sogar verhindert, wurden Crosslinker entwickelt und synthetisiert, welche durch Einführung einer Alkin-Funktionalität durch kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloadditionen (CuAAC) modifiziert und angereichert werden können. Es wurden Fragmentierungsstudien an den entwickelten Crosslinkern HSAK und HSAKp durchgeführt (Abbildung 1.2A,B) und erstmals eine Methode zur Quantifizierung der Fragmentierungseffizienz verschiedener Crosslinker entwickelt. Dabei stellte sich heraus, dass beide Crosslinker bei niedriger Energie spalten, was die Durchführung von Crosslinking-Experimenten ermöglicht.

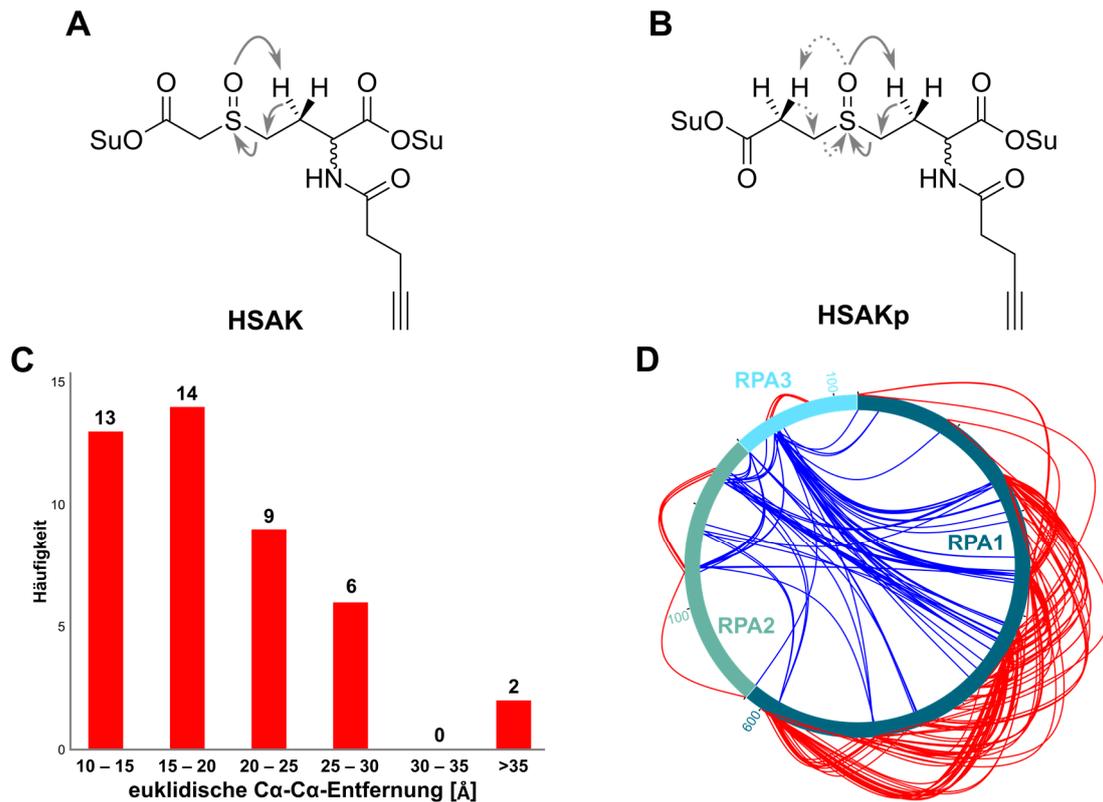


Abbildung 1.2: Strukturen der neu entwickelten Sulfoxid-Crosslinker und ausgewählte Ergebnisse der Untersuchungen. A) Struktur des in eine Richtung spaltbaren HSAK-Crosslinkers. B) Struktur des beidseitig spaltbaren HSAKp-Crosslinkers. C) In der Kristallstruktur eines Modellproteins gemessene XL-Entfernungen nach Crosslinking mit HSAKp. Mit einer maximalen Länge von etwa 35 Å befindet sich die große Mehrheit der detektierten Crosslinks in Einklang mit der Kristallstruktur. D) Bei einer Falscherkennungsrate von 1 % identifizierte Intraprotein- (rot) und Interprotein-XLs (blau) des trimeren RPA-Komplexes.

Der HSAKp-Crosslinker wurde erfolgreich an diversen aufgereinigten Proteinen und einem Protein-komplex in MS²-Experimenten angewandt und durch Optimierung der verwendeten Protokolle zur Probenvorbereitung und der MS-Methode war es möglich, die Anzahl der detektierbaren Crosslinks deutlich zu erhöhen. Die Validität der erhaltenen Crosslinks wurde durch einen Vergleich der detektierten Crosslinkdistanzen mit der Kristallstruktur eines Modellproteins bestätigt (Abbildung 1.2C). So war es mit dem neu entwickelten HSAKp-Crosslinker möglich, umfangreiche strukturelle Informationen über den trimeren Replikationsprotein A-Komplex zu gewinnen, welcher eine wichtige Rolle in der DNA-Replikation und -Reparatur spielt (Abbildung 1.2D). Dies demonstriert die Anwendbarkeit des neu entwickelten Reagenzes auf ein biologisch interessantes System.

Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Modifizierung des Crosslinkers durch CuAAC durchgeführt. Dazu wurde ein reduktiv spaltbares Biotin-Azid zur Konjugation verwendet, um die Anreicherung mit dem etablierten Biotin-Streptavidin-System zu ermöglichen. Während die Modifikation des Crosslinkers in komplexen Peptidproben nicht erfolgreich verlief, konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung der quervernetzten Peptide nach Durchführen der CuAAC-Reaktion auf der Proteinebene möglich ist.

Auch zum Gebiet der quantitativen Proteomik wurde durch die Entwicklung neuer Reagenzien beigetragen. In vielen Proteomik-Experimenten ist es notwendig, Proben relativ zueinander zu quantifizieren, um Effekte auf die Proteinexpression beispielsweise nach Zugabe chemischer Inhibitoren oder nach *Knock-Out* einzelner Proteine untersuchen zu können. Hierfür wird häufig die Methode der Isobarenmarkierung eingesetzt, welche isotopenmarkierte chemische Reagenzien zur Markierung der zu vergleichenden Proben verwendet. Diese Reagenzien bestehen aus einer Reportergruppe, welche während der MS-Fragmentierung abgespalten wird, und einer Massenausgleicherguppe. Durch die gezielte Verteilung der Isotopenmarkierungen in diesen beiden Gruppen werden Reagenziensets von Isotopomeren erhalten, welche alle die gleiche Gesamtmasse besitzen und somit isobar zueinander sind. Nach der Markierung jeder Probe durch ein Isotopomer können die Proben kombiniert und in einem gemeinsamen MS-Experiment analysiert werden (*Multiplexing*), wobei durch die Verteilung der Isotopenmarkierungen in den eingesetzten Reagenzien verschieden schwere Reporterionen nach der Fragmentierung generiert werden. Durch die Analyse der Intensitäten der gebildeten Reporterionen ist eine relative Quantifizierung der Abundanz der Peptide zueinander möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur einer neuartigen Reportergruppe entwickelt, welche die relative Quantifizierung von bis zu zehn verschiedenen Proben in einer einzelnen Messung ermöglicht (PyrRep, Abbildung 1.3A). Dabei könnte die Quantifizierung auf Grund von hohen Massenunterschieden der einzelnen Reportergruppen bei deutlich niedrigeren Auflösungen durchgeführt werden, als dies bei aktuell verfügbaren Reportergruppen der Fall ist.

Da das über die Reportergruppen bestimmte Verhältnis jedoch durch die Co-Isolation zusätzlicher Peptide in der Gasphase verzerrt werden kann, gibt es verschiedene Methoden, um eine verzerrungsfreie Quantifizierung zu ermöglichen. Um dabei nicht auf instrumentell anspruchsvolle MS³-Methoden ausweichen zu müssen, können Methoden verwendet werden, welche die Quantifizierung nicht über die Reporterionen durchführen, sondern stattdessen die Massenausgleicher-Peptidkonjugate analysieren. Diese beinhalten die zu den Reporterionen komplementären Isotopenmarkierungen und können so auch zur Quantifizierung verwendet werden. Da die derzeitig verwendeten Reagenzien jedoch nicht für diese Applikation entwickelt wurden, werden die komplementären Ionen nicht effizient gebildet, was die Verwendung dieser verzerrungsfreien Quantifizierungsmethode limitiert.

Aus diesem Grund wurde in der Doktorarbeit ein neuartiges Quantifizierungsreagenz entwickelt, welches eine Sulfoxid-Gruppe zur effizienten Spaltung in der Gasphase inkorporiert (SulfOxid-Tag, SOT, Abbildung 1.3B). Nach Mitwirkung an der Synthese des hochpolaren Moleküls wurde die Duplex-Version des SOT-Reagenz massenspektrometrisch analysiert. Um eine quantitative Aussage über die Effizienz der Fragmentierung im Vergleich mit dem kommerziell erhältlichen TMT-Reagenz in einer komplexen Zelllysatsprobe durchführen zu können, wurde ein Computerprogramm zur automatischen

Auswertung der gemessenen MS²-Spektren entwickelt, da vorhandene Auswertesoftware nicht zur Detektion der komplexen Fragmentierungsmuster geeignet war. Es konnte deutlich demonstriert werden, dass SOT-markierte Peptide in einem höherem Ladungszustand vorliegen, effizienter fragmentieren und in Folge auch signifikant mehr und intensivere komplementäre Ionen bilden als TMT-markierte Peptide (Abbildung 1.3C). Erstmals wurde vorgeschlagen, die zahlreich gebildeten komplementären Fragmentationen zusätzlich zu den komplementären Ionen des intakten Peptids zu verwenden, um mehrere Datenpunkte aus einem einzigen Spektrum zur akkuraten Quantifizierung zu kombinieren. Die Quantifizierung einer komplexen, stark verzerrten Probe konnte durch Einsatz dieser Methode gegenüber der Reporterionenquantifizierung akkurater durchgeführt werden.

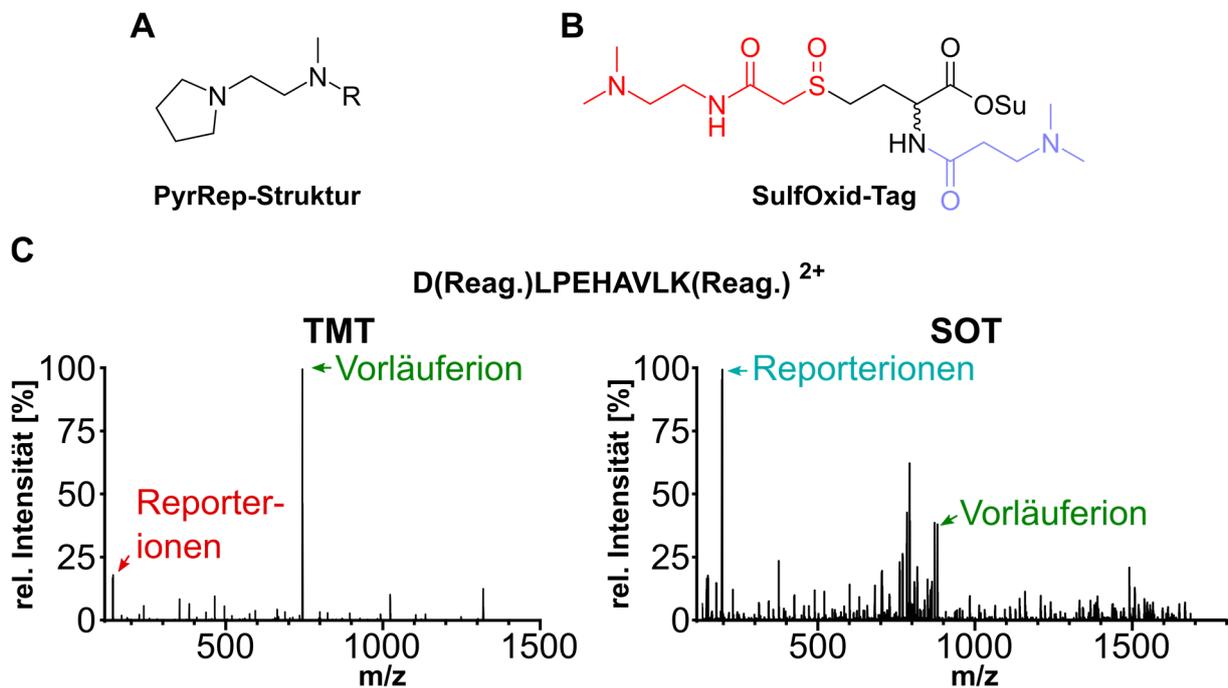


Abbildung 1.3: Beiträge zum Gebiet der quantitativen Proteomik. A) Grundstruktur der PyrRep-Reportergruppe, mit der bis zu zehn Proben in einer Messung quantifiziert werden können. B) Struktur des SulfOxid-Tags (SOT), welches auf Grund einer Sulfoxid-Gruppe ein leicht spaltbares isobares Markierungsreagenz darstellt. C) Vergleich der MS²-Spektren eines doppelt markierten Peptids. SOT-markierte Peptide spalten deutlich effizienter, als TMT-markierte Peptide.

Allerdings kam es bei der Markierung der Peptide durch das SOT-Reagenz zu einer Verminderung der Peptidentifikationsrate. Um den Effekt der Markierungsreaktion auf die Peptidentifikation genauer zu untersuchen, wurden Markierungsexperimente mit Derivaten des SOT-Reagenzes durchgeführt. Es konnte demonstriert werden, dass die Verwendung eines HPLC-aufgereinigten Reagenzes ohne Sulfoxidfunktion zu einer hohen Markierungseffizienz und erwarteten Peptidentifikationsraten führt.

Zusammenfassend wurden während der Doktorarbeit neuartige, Sulfoxid-basierte chemische Reagenzien entwickelt, welche als anreicherbare Crosslinker und als einfach spaltbare Quantifizierungsreagenzien erfolgreich angewandt wurden.

2 Summary

Analogous to the concept of the genome, which describes the entire DNA of an organism, the term proteome was established in the last decade. The proteome consists of all proteins present in a biological sample and is therefore not only highly complex but also dynamic. Mass spectrometry (MS)-based proteomics today allows the routine identification of proteins from very small amounts of various biological samples, as well as the determination of protein modifications or the relative quantification of the occurring proteins between different samples. With the help of this powerful method, biological questions can be investigated systemically in order to gain new knowledge about a variety of biological systems.

However, in order to obtain a large amount of information from the numerous signals detected in MS experiments, proteomics often relies on the additional use of highly specialized chemical reagents. Within the framework of this doctoral thesis, such reagents were developed, synthesized, investigated for their MS properties and applied. This contributed to two specialized areas of proteomics: protein-protein crosslinking and quantitative proteomics.

The knowledge of protein structures and the elucidation of interaction networks between proteins is crucial for understanding biological systems. However, during proteolytic digestion, which is typically performed in preparation for MS analysis, information about spatial arrangement and non-covalent interactions is lost as proteins are cut into individual peptides. However, using chemical reagents, so-called crosslinkers, two amino acids can be covalently linked to each other before digestion if they are spatially close to each other. This preserves the valuable spatial information for MS measurements, enabling the production of structural models and protein-protein interaction maps.

In order to enable the identification of crosslinked peptides in complex samples, the crosslinker reagents need to be cleavable within the mass spectrometer at low energy to efficiently separate the linked peptides from each other. In a previous study, crosslinkers with a dithiopyrrole structure were developed for this purpose, which showed indications of simple MS cleavability. The synthesis of a water-soluble derivative (Dithiopyrrol-XL, Figure 2.1A) and its MS analysis in the context of this doctoral thesis, however, demonstrated that the efficiency of the cleavage is too low for use as a crosslinker. In additional experiments, the well-known crosslinker DSSO (Figure 2.1B) was first used to establish MS analysis of samples of different complexity on the mass spectrometers available. Both MS² and *pseudo*-MS³ methods were used on a *Q Exactive HF* mass spectrometer to analyze crosslinks in individual proteins and small protein complexes. A method for size exclusion chromatography (SEC) of the complex peptide samples was developed for the enrichment of the crosslinks that occur only in low quantities. This allowed for the detection of significantly more crosslinks after fractionation of the

samples (Figure 2.1C). In addition, the analysis of a complex sample using an MS³ method on an *Orbitrap Fusion Lumos* instrument was performed to identify interaction partners of the catalytic domain of the TET3 protein and for the first time to generate intraprotein crosslink-supported structural models of this protein (Figure 2.1D).

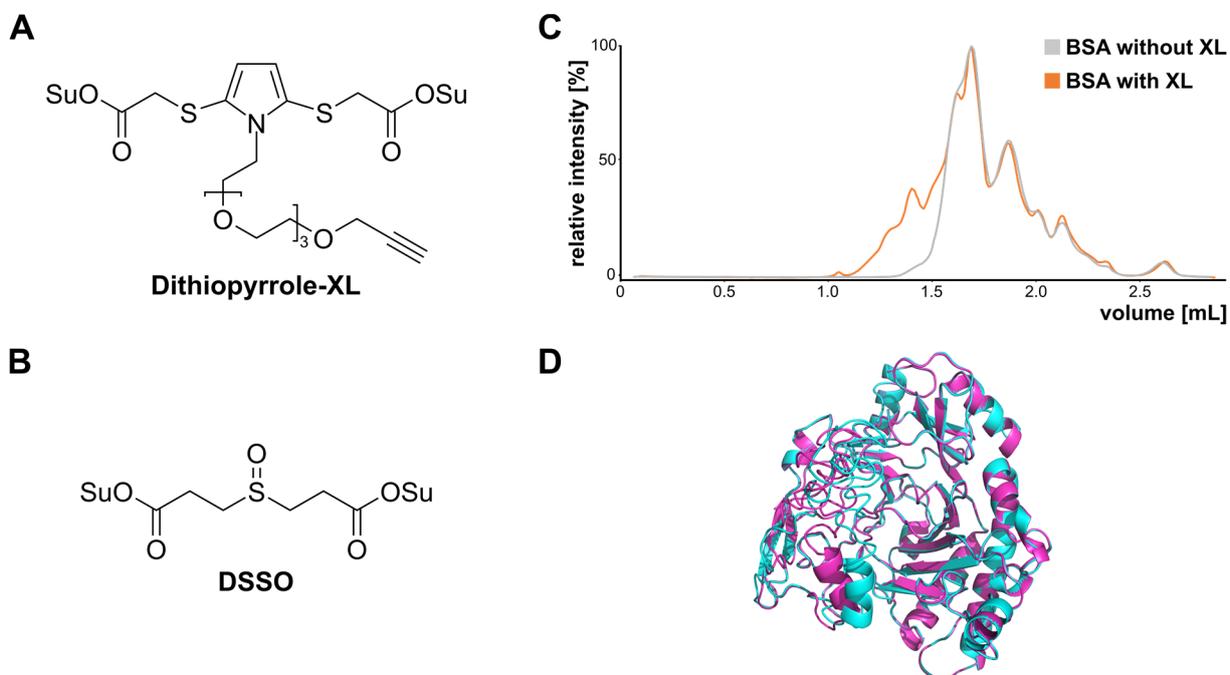


Figure 2.1: Structures of investigated crosslinkers and presentation of selected results. A) Structure of the investigated dithiopyrrole linker, which does not cleave efficiently enough at low energies. B) DSSO, a commercially available cleavable crosslinker. C) SEC of a protein sample before (grey) and after (orange) crosslinking. In volumes between 1.0 mL and 1.5 mL, crosslinks can be better detected due to enrichment. D) Structural model of a shortened TET3cd sequence before (cyan) and after (magenta) use of the detected XLs as length restrictions.

Since the low abundance of crosslinks in the highly complex peptide samples makes their detection considerably more difficult or even impossible, crosslinkers were developed and synthesized which can be modified and enriched through copper-catalyzed alkyne-azide cycloadditions (CuAAC) by the introduction of an alkyne functionality. Fragmentation studies were performed on the developed crosslinkers HSAK and HSAKp (Figure 2.2A,B) and for the first time a method for quantifying the fragmentation efficiency of different crosslinkers was developed. It was found that both crosslinkers cleave at low energy, allowing crosslinking experiments to be performed.

The HSAKp crosslinker was successfully applied to various purified proteins and to a protein complex in MS² experiments. By optimizing the used sample preparation protocols and the MS method it was possible to significantly increase the number of detectable crosslinks. The validity of the obtained crosslinks was confirmed by a comparison of the detected crosslink distances with the crystal structure of a model protein (Figure 2.2C). With the newly developed HSAKp crosslinker it was possible to obtain comprehensive structural information about the trimeric replication protein A complex, which plays

an important role in DNA replication and repair (Figure 2.2D). This demonstrates the applicability of the newly developed reagent to a biologically interesting system.

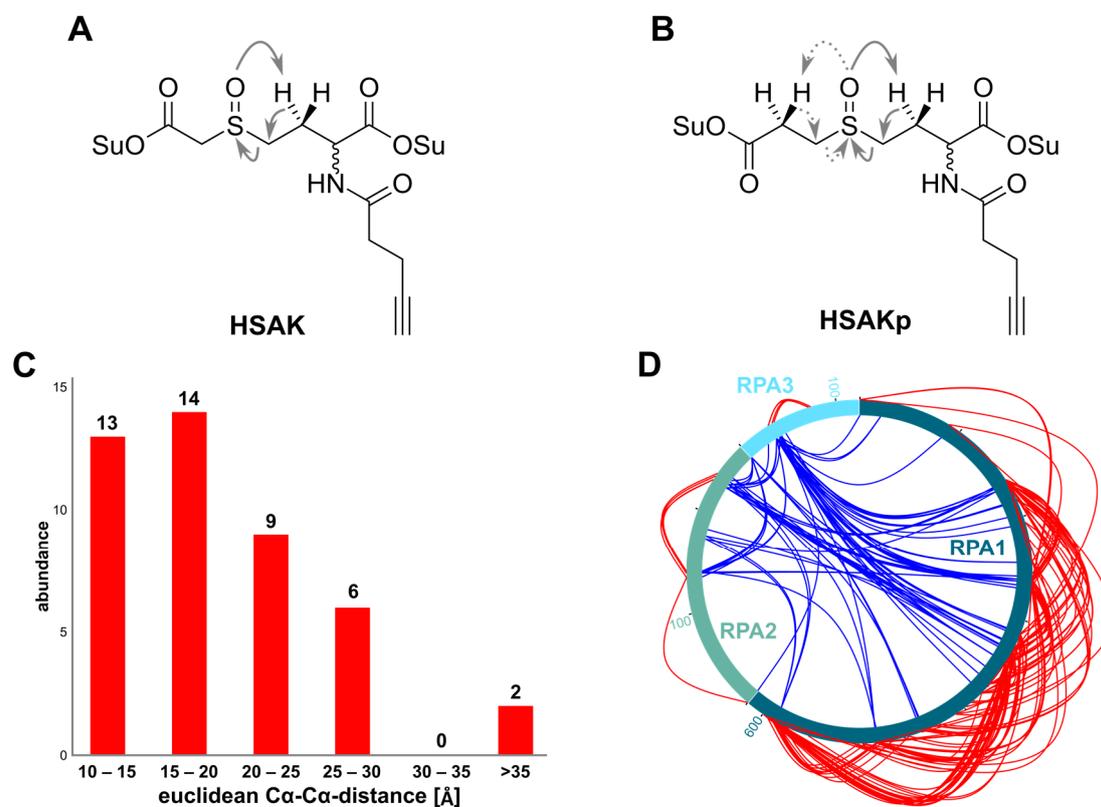


Figure 2.2: Structures of the newly developed sulfoxide crosslinkers and selected results of the investigations. A) Structure of the HSAK crosslinker that can be cleaved in one direction. B) Structure of the HSAKp crosslinker which is cleavable in both directions. C) XL distances measured in the crystal structure of a model protein after crosslinking with HSAKp. With a maximum length of about 35 Å, most crosslinks detected are in line with the crystal structure. D) Intraprotein- (red) and interprotein-XLs (blue) of the trimeric RPA complex identified at a false discovery rate of 1%.

In addition, investigations were carried out regarding the modification of the crosslinker by CuAAC. A reductively cleavable biotin azide was used for conjugation to enable enrichment with the established biotin streptavidin system. While the modification of the crosslinker in complex peptide samples was not successful, it was shown that the enrichment of the crosslinked peptides is possible after the CuAAC reaction at the protein level.

The development of new reagents in this thesis has also contributed to the field of quantitative proteomics. In many proteomics experiments, it is necessary to quantify samples relative to each other in order to investigate effects on protein expression, for example after the addition of chemical inhibitors or after knock-out of individual proteins. The isobaric labeling method, which uses isotopically labelled chemical reagents to tag the samples to be compared, is often used for this purpose. These reagents consist of a reporter group, which is cleaved off during MS fragmentation, and a mass balancer group. By the purposeful distribution of the isotope markers in these two groups reagent sets of isotopomers are obtained which all have the same total mass and are therefore isobaric to each other. After labeling

each sample with an isotopomer, the samples can be combined and analyzed in a single MS experiment (*multiplexing*). The distribution of the isotope labels in the reagents generates reporter ions of different weights after fragmentation. The analysis of the intensities of these reporter ions allows the relative quantification of the peptide abundance.

In this work, the structure of a novel reporter group was developed, which allows the relative quantification of up to ten different samples in a single measurement (PyrRep, Figure 2.3A). Due to the high mass differences of the individual reporter groups, quantification could be performed at significantly lower resolutions than with currently available reporter groups.

However, since the ratio determined by the reporter groups can be distorted by the co-isolation of additional peptides in the gas phase, there are various methods to enable distortion-free quantification. In order to avoid using instrumentally sophisticated MS³ methods, method variations can be used that do not quantify the reporter ions but instead analyze the mass balancer-peptide conjugates. These contain the isotope labels complementary to the reporter ions and can therefore also be used for quantification. However, since the currently used reagents were not developed for this application, the complementary ions are not formed efficiently, which limits the use of this distortion-free quantification method.

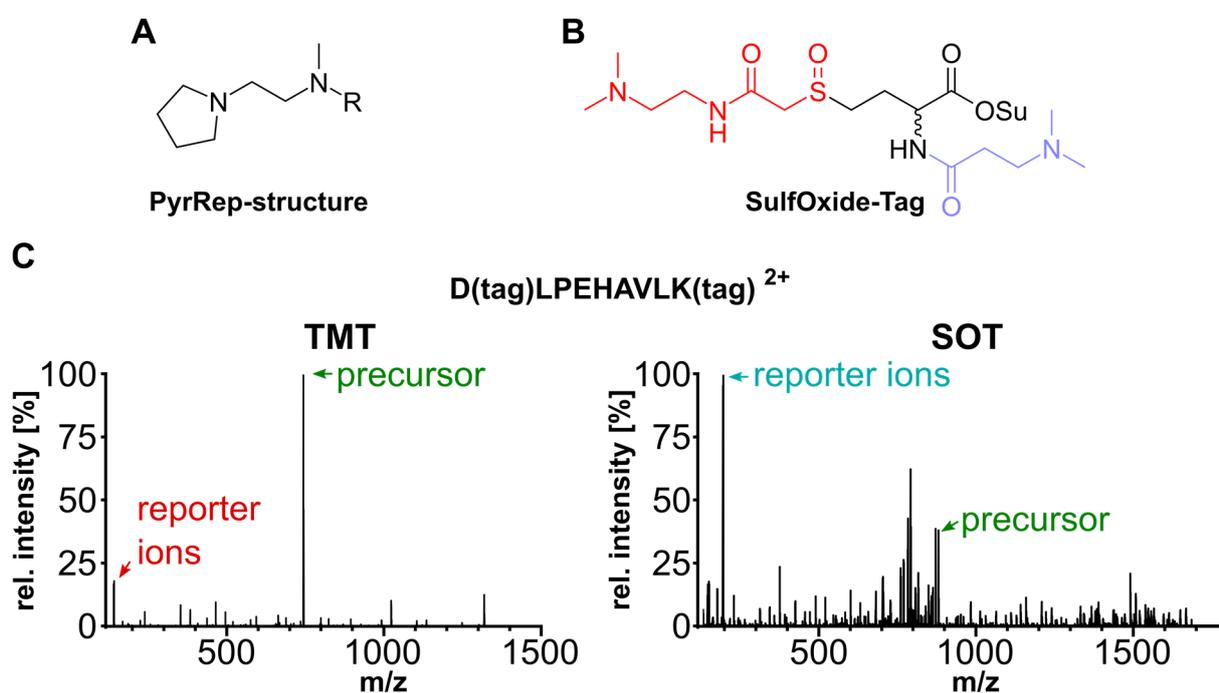


Figure 2.3: Contributions to the field of quantitative proteomics. A) Basic structure of the PyrRep reporter group with which up to ten samples can be quantified in one measurement. B) Structure of the sulfoxide tag (SOT), which is a readily cleavable isobaric labeling reagent by virtue of a sulfoxide group. C) Comparison of MS² spectra of a doubly labelled peptide. SOT-labelled peptides cleave much more efficiently than TMT-labelled peptides.

For this reason, a novel quantification reagent was developed in this doctoral thesis which incorporates a sulfoxide group for efficient fragmentation in the gas phase (Sulfoxide Tag, SOT, Figure 2.3B). After

contributing to the synthesis of the highly polar molecule, the duplex version of the SOT reagent was analyzed by mass spectrometry. In order to obtain a quantitative assessment of fragmentation efficiency compared to the commercially available TMT reagent in a complex cell lysate sample, a computer program was written for the automatic evaluation of the measured MS^2 spectra, since existing evaluation software was not suited for the detection of the complex fragmentation patterns. It could be demonstrated convincingly that SOT-labelled peptides are present in a higher charge state, fragment more efficiently and subsequently form significantly more complementary ions of higher intensity than TMT-labelled peptides (Figure 2.3C). For the first time it was suggested to use the numerous complementary fragment ions in addition to the complementary ions of the intact peptide in order to have multiple data points from a single spectrum for accurate quantification. The quantification of a complex, strongly distorted sample could be performed more accurately by using this method compared to reporter ion quantification.

However, the labelling of the peptides by the SOT reagent led to a reduction in the peptide identification rate. In order to investigate the effect of the labelling reaction on peptide identification more closely, labelling experiments were performed with derivatives of the SOT reagent. It was demonstrated that the use of an HPLC purified reagent without sulfoxide function leads to a high labeling efficiency and expected peptide identification rates.

In summary, novel sulfoxide-based chemical reagents were developed during the PhD thesis, which were successfully applied as enrichable crosslinkers and as easily cleavable quantification reagents.

3 Einleitung

3.1 Proteomik

Mit Anbruch des neuen Millenniums setzte sich in der Biologie eine neue Herangehensweise zur Erforschung von Organismen durch. Während man sich in der Vergangenheit eher isoliert mit einzelnen Fragestellungen beschäftigt hatte, wurde klar, dass es wegen der enormen Komplexität biologischer Systeme notwendig sein würde, die Gesamtheit von Biomolekülen in ihrem Zusammenspiel zu erforschen. Neue Forschungsfelder entstanden, welche nicht nur einzelne Komponenten der zu untersuchenden Systeme, sondern alle involvierten Entitäten erfassen wollen. Diese Forschungsfelder werden heute häufig mit dem Suffix -omik versehen. Das erste Feld, welches sich in dieser Disziplin etablierte, ist die Genomik. Sie beschäftigt sich mit dem Aufbau des Erbmaterials DNA und der Interaktion zwischen Genen. Ausgehend von diesem Gebiet entstanden weitere verwandte Disziplinen: beispielsweise die Transkriptomik, welche alle transkribierten RNA-Moleküle untersucht, oder die Metabolomik, die sich auf an Stoffwechselwegen beteiligte Metaboliten konzentriert. Ein weiteres prominentes Feld beschäftigt sich mit der Gesamtheit aller auftretenden Proteine – die Proteomik. In Abbildung 3.1 werden die Suchergebnisse in der *Pubmed*-Datenbank zu den jeweiligen Forschungsgebieten anhand ihres Publikationsjahres aufgespalten dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass die „-omik“-Gebiete einen rasanten Anstieg an jährlichen Publikationen erleben, was die Aktualität dieser Forschungsfelder betont. Viele der komplexen Fragen, vor welchen die Biologie heutzutage steht, lassen sich nur beantworten, wenn man das zu untersuchende System als Ganzes betrachtet.

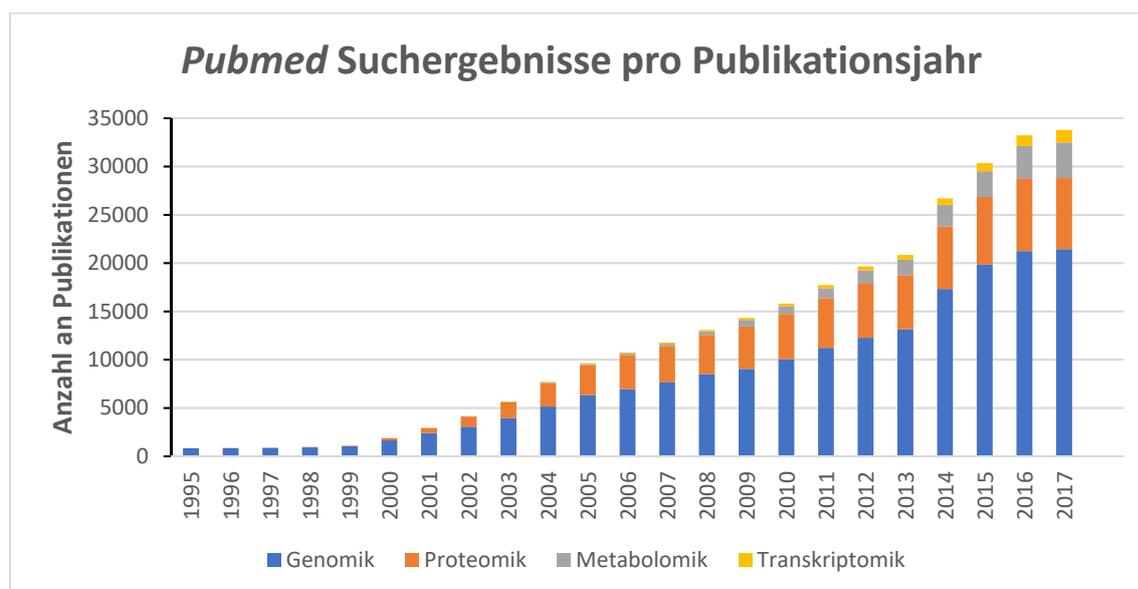


Abbildung 3.1: Anzahl der Suchergebnisse in der Pubmed-Datenbank pro Publikationsjahr. Gesucht wurden die englischsprachigen Begriffe „genomics“, „proteomics“, „metabolomics“ und „transcriptomics“.

Die systemischen Forschungsgebiete der „-omik“, wie unter anderem die Genomik oder die Proteomik, sind dadurch bestens geeignet oder teilweise sogar zwingend erforderlich, um diese neuen Fragestellungen beantworten zu können.

Das humane Genom besteht aus etwa 3.6 Milliarden Basenpaaren^[1] und man geht von etwa 19000 – 20000 Genen aus.^[2] Diese Vielfalt entsteht aus der unterschiedlichen Abfolge von lediglich vier kanonischen Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T), sowie den epigenetischen Basen wie 5-Methylcytosin (mC),^[3] 5-Hydroxymethylcytosin (hmC),^[4-5] 5-Formylcytosin (fC)^[6] und 5-Carboxycytosin (caC).^[7] Proteine hingegen bestehen aus den 20 kanonischen proteinogenen Aminosäuren, um der Natur verschiedenste chemische Funktionalitäten zugänglich zu machen. Aus diesen diversen Bausteinen können in einer menschlichen Zelle aus jedem einzelnen Gen durch Prozesse wie alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen sehr viele verschiedene Proteine entstehen. So könnten sich Schätzungen zufolge in einem einzelnen Zelltyp 100000 oder mehr Proteinspezies gleichzeitig befinden.^[8]

Die Proteomik beschäftigt sich damit, diese immense Vielfalt an verschiedenen Proteinen zu untersuchen. Dabei hat sich – analog zum Begriff des Genoms – der Begriff des Proteoms als Untersuchungsobjekt durchgesetzt. Das Proteom ist die Gesamtheit aller auftretenden Proteine in einer bestimmten Zelle, bestimmten Zelltypen oder gar einem gesamten Organismus zu einem definierten Zeitpunkt.^[9] Im Gegensatz zum Genom, welches als Träger der Erbinformation einen überwiegend statischen Charakter besitzt, sind Proteome üblicherweise höchst dynamisch. So wurden massive Änderungen der exprimierten Proteine in Zellen beispielsweise im Zusammenhang mit dem Fortschreiten des Zellzyklus,^[10] der Behandlung mit Chemotherapeutika^[11] oder der Stimulation durch Hormone^[12] nachgewiesen.

Proteine als Bausteine des Proteoms sind an allen biologischen Prozessen beteiligt. Um die höchst komplizierten und stark regulierten Abläufe von biologischen Systemen durchzuführen kommt es nicht nur darauf an, dass die richtigen Proteine anwesend sind. Vielmehr müssen Proteine in der richtigen Anzahl vorhanden sein und bestimmte Modifikationszustände besitzen, umso mit anderen Biopolymeren, seien es andere Proteine oder DNA sowie RNA, richtig interagieren zu können. Das Feld der Proteomik widmet sich deswegen auch den Gebieten der Proteinquantifizierung, der Analyse von Proteinmodifikationen und dem Nachweis verschiedener Protein-Interaktionen.

Durch diese vielseitige Betrachtung von Proteinen war es durch proteomische Studien bereits möglich, verschiedenste biologische Bereiche detailliert zu untersuchen. So konnte Einblick in den Metabolismus von Krebszellen gewährt,^[13] Phosphorylierungsmuster und der circadiane Rhythmus konnten

korreliert^[14] und Interaktionspartner von Chromatin-Proteinen konnten identifiziert werden,^[15] um nur einige wenige Beispiele zu nennen.

Auch in der klinischen Diagnostik gibt es vielfältige Anwendungsmöglichkeiten für die Proteomik. Es wurden bereits einige Biomarker identifiziert, welche es möglich machen, Krankheitszustände anhand von Proteomen zu identifizieren. Inzwischen können proteomische Studien Indizien dafür liefern, ob eine Person an Krebs,^[16-18] Autoimmunerkrankungen,^[19] Alzheimer^[20] oder Infektionserkrankungen leidet.^[21-23] Durch die ständigen Weiterentwicklungen im Bereich der Genomik und Proteomik erhofft man sich, in Zukunft durch Untersuchungen an individuellen Patienten die Erkennung von Krankheitsbildern personalisieren zu können um dadurch in die Lage zu kommen, im Rahmen einer personalisierten Medizin maßgeschneiderte Therapien mit hohen Erfolgsquoten anbieten zu können.^[24-26]

Zusammengefasst handelt es sich bei der Proteomik um ein breit aufgestelltes Forschungsgebiet, welches genutzt werden kann, um biologische Systeme tiefgehend zu untersuchen und verschiedenste Fragestellungen zu beantworten. Im Folgenden soll detailliert darauf eingegangen werden, warum die Massenspektrometrie heute als Methode der Wahl gilt, um proteomische Studien durchzuführen.

3.1.1 Massenspektrometrie-basierte Proteomik

Im Gegensatz zu Untersuchungsmethoden wie beispielsweise der Kristallstrukturanalyse oder der NMR-Spektroskopie, welche einzelne Proteine genauer betrachten, ist es das Ziel der Proteomik, alle vorkommenden Proteine gleichzeitig zu untersuchen. Dies bedarf der Verwendung bestimmter Methoden, welche in der Lage sind, sehr komplexe Mischungen von Proteinen zu analysieren.

In der Vergangenheit wurde dies zum Beispiel durch die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese realisiert.^[27] Hier werden in einem ersten Schritt die denaturierten, auf ein pH-Gradientengel aufgetragenen Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes durch eine isoelektrische Fokussierung aufgetrennt. Anschließend erfolgt die orthogonal verlaufende Trennung der Proteine anhand ihrer Molekülgrößen in einem Natriumdodecylsulfat-enthaltenden Polyacrylamid-Gel (*SDS-PAGE*). Nach erfolgter zweidimensionaler Trennung werden die Proteine fixiert und auf verschiedene Arten, beispielsweise durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau oder kolloidalem Silber, sichtbar gemacht.^[28-29] Ein Beispiel für die Proteinanalyse durch diese Methode ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

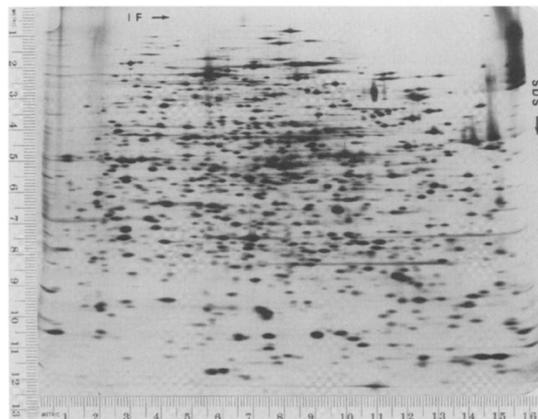


Abbildung 3.2: Beispiel für die Auftrennung einer Proteinnischung durch 2D Gelelektrophorese. Aufgetrennt wurden hier die Proteine eines E. Coli Lysats. Die Visualisierung erfolgte radiometrisch durch die Verwendung einer ^{14}C -markierten Zellkultur. Entnommen aus ^[27].

Die Verwendung der zweidimensionalen Gelelektrophorese macht es mit instrumentell einfachen Experimenten möglich, Tausende individuelle Proteinspezies aufzutrennen, zu visualisieren und sogar zu quantifizieren. Allerdings müssen weitere Methoden verwendet werden, um die einzelnen Signale bestimmten Proteinen zuordnen zu können. Des Weiteren ist es mit dieser Methode nicht möglich, Aussagen über Modifikationen von Proteinen zu treffen, welche nur eine sehr kleine Änderung der Proteinmasse oder des isoelektrischen Punktes bewirken. Diese Schwachstellen der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden durch die Entwicklung neuartiger massenspektrometrischen Methoden zur Proteinanalytik adressiert.

Die Grundlage der Massenspektrometrie wurde 1912 von Sir J. J. Thomson gelegt, welcher erstmals zeigte, dass Ionen anhand ihrer verschiedenen Massen und Ladungen räumlich separiert werden

können.^[30] Nach dem Nobelpreisträger wurde eine inzwischen veraltete Einheit für das Masse-zu-Ladung-Verhältnis, das *Thomson (Th)*, benannt. Heutzutage wird für das Masse-zu-Ladung-Verhältnis die dimensionslose Einheit m/z verwendet. Die Massenspektrometrie ist eine Methode, welche es erlaubt, sehr genaue Informationen über die Masse von Ionen zu generieren. Dafür ist es allerdings nötig, aus neutralen Spezies geladene Ionen zu generieren und in die Gasphase zu transferieren, in welcher dann die massenspektrometrische Analyse stattfinden kann. Viele der frühen Ionisationsmethoden, wie beispielsweise die Elektronenstoßionisation (EI) oder die Californium-252 Plasma-Desorption^[31], sind jedoch nicht dafür geeignet, große Biomoleküle wie Peptide, Proteine oder Nukleinsäuren zu ionisieren, da die Analyten bei diesen Ionisationsmethoden hohen Temperaturen ausgesetzt sind, die Verdampfbarkeit oft gering ist und es zu zahlreicher Fragmentierung bei der Ionisation und innerhalb der Gasphase kommt.

Der Siegeszug der Massenspektrometrie-basierten Proteomik setzte erst Mitte der achtziger Jahre ein, als zwei sanfte Ionisationsmethoden entwickelt wurden, welche auch ideal für Biopolymere geeignet waren: die Elektrospray-Ionisation (ESI) von *J. B. Fenn* 1984 sowie die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) von *F. Hillenkamp* und *M. Karas* 1985.^[32-33] In Abbildung 3.3 sind die Prinzipien dieser Ionisationsmethoden dargestellt, auf welche wegen ihrer enormen Bedeutung für die MS-basierte Proteomik nun genauer eingegangen wird.

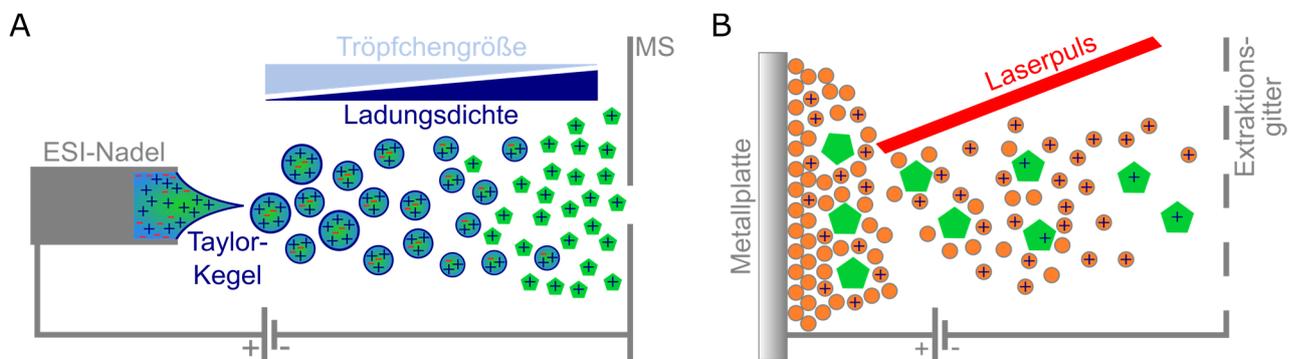


Abbildung 3.3: Funktionsweisen sanfter Ionisationsmethoden, welche zur massenspektrometrischen Untersuchung von Biomolekülen eingesetzt werden. A) Das Prinzip der Elektrospray-Ionisation. Durch Anlegen einer hohen Spannung an eine Flüssigphase kommt es zur Bildung von Tröpfchen. Wegen der Evaporation des Lösungsmittels verringert sich die Tröpfchengröße, was mit einer Steigerung der Ladungsdichte einhergeht und schließlich zur Bildung von Quasimolekülionen (grün) führt. B) Das Prinzip der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation. Die Analytionen (grün) sind in einer Matrix (orange) aus kleinen Molekülen eingebettet, welche die Energie eines Laserpulses absorbieren und zusammen mit den Analyten in die Gasphase überführt werden. Hier kommt es zum Ladungstransfer zu den Analytionen und dadurch zur Bildung von Quasimolekül-Ionen.

Bei ESI handelt es sich um eine Methode, in welcher sich der zu untersuchende Analyt in einer flüssigen Phase gelöst befindet und die Ionisation unter normalen Atmosphärendruck stattfindet. Zwischen der Flüssigphase und dem Eingang des Massenspektrometers wird eine hohe Spannung angelegt, wobei die Spannungsrichtung davon abhängig gemacht wird, ob positive oder negative Ionen gemessen werden sollen. Im hier diskutierten Fall wird eine positive Polarität des Analyten betrachtet (Abbildung

3.3A). Durch die angelegte Spannung bildet sich aufgrund des Gleichgewichts aus hydrostatischem Druck, Oberflächenspannung und der elektrostatischen Repulsion der positiven Ladungen ein Taylor-Kegel aus.^[34] Bei sehr hohen Spannungen – üblicherweise im Bereich von mehreren Kilovolt – ist der Taylor-Kegel instabil und emittiert einen sehr feinen Flüssigkeitsstrahl, welcher schnell in ein Spray aus kleinen Tröpfchen zerfällt. Durch Evaporation der Lösungsmittelmoleküle kommt es zu einer Reduzierung der Tröpfchengröße, was zu einer ständigen Steigerung der Ladungsdichte führt. Überschreitet die Ladungsdichte ein kritisches Maß, das sogenannte Rayleigh-Limit, so wird das Tröpfchen instabil und zerfällt im Rahmen einer Coloumb-Explosion in kleinere Tröpfchen. Dieser Prozess setzt sich durch ständige Evaporation des Lösungsmittels so lange fort, bis sehr kleine Tröpfchen übrig bleiben. Ob die Quasimolekülonen des Analyten letztlich durch Felddesorption in die Gasphase emittiert werden^[35] oder ob nur mit einzelnen Analyten besetzte Tröpfchen vorliegen, welche schließlich das gesamte Lösungsmittel durch Evaporation verlieren,^[36] ist nicht endgültig geklärt und für die meisten Proben wird eine Kombination aus beiden Mechanismen zur Bildung der Gasphasenionen angenommen.

Als Flüssigphasen werden wässrige Lösungsmittelsysteme verwendet, welche aufgrund ihrer hohen Polarität effizient Ladungen auf die Analyten übertragen können. Durch Zusatz von niedrig siedenden Lösungsmitteln, wie Acetonitril oder Methanol, wird die Evaporation des Lösungsmittels verbessert. Die Ionisationseffizienz hängt nicht nur von der Komposition des Lösungsmittels, dem Zusatz von Additiven wie Ameisensäure zur weiteren Steigerung der Polarität, der Stärke der angelegten Spannung und der Verwendung von inerten Zerstäubungsgasen ab, sondern auch von der Größe der initial geformten Tröpfchen. So wird mit niedrigeren Flussraten, meist im Bereich von wenigen Hundert Nanolitern pro Minute, eine gesteigerte Ionisationseffizienz beobachtet.^[37-38] Dadurch, dass die ESI in einer flüssigen Phase durchgeführt wird, kann diese Ionisationsmethode hervorragend mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) als Separationsmethode gekoppelt werden.

Im Falle der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) hingegen findet die Ionisation innerhalb einer festen Phase in einem Vakuumbereich statt (Abbildung 3.3B). Die Analyten werden mit einer Matrix co-kristallisiert, welche in einem hohen molaren Überschuss vorliegt. Als Matrix werden aromatische Substanzen, wie beispielsweise Sinapinsäure oder α -Cyano-4-hydroxymizsäure, verwendet, welche in der Lage sind, die Energie eines Laserstrahls effizient zu absorbieren. Gleichzeitig können die Matrixmoleküle Säure-Base-Reaktionen mit den Analyten eingehen, um geladene Spezies bereits in der Matrix zu erzeugen. Durch den Beschuss mit Laserpulsen, meist im UV-Bereich, nimmt die Matrix Energie auf und wird dadurch zusammen mit den eingebetteten Analyten von der Metallplatte desorbiert. Dabei werden Initialgeschwindigkeiten zwischen 300 und 800 m/s erreicht.^[39] Es entstehen große Matrix-Analyt-Cluster in der Gasphase, welche durch die eingebrachte Laserenergie weiter zerfallen. Während dieses Zerfalls kommt es zur Separation der geladenen Analytionen und derer

Gegenionen, wodurch die detektierbaren Quasimolekülonen gebildet werden. Zusätzlich kann es zur Photoionisation von Analytmolekülen innerhalb der Matrix-Analyt-Cluster kommen.^[40] Das Resultat von MALDI-Experimenten ist das Entstehen von meist einfach geladenen Quasimolekülonen.

Zwar kann MALDI wegen des Bedarfs einer Matrix nicht direkt an HPLC-Separationen gekoppelt werden, allerdings gibt es automatisierte Systeme, welche HPLC-Auftrennungen fraktioniert mit der gewählten Matrix vermischen und das Gemisch zur Co-Kristallisation auf die Probenplatte aufbringen. Zudem ist MALDI weniger anfällig gegenüber Verunreinigungen von Proben, etwa durch Salze oder Detergenzien.^[41]

Die Etablierung beider sanften Ionisationsmethoden hat dazu geführt, dass eine Vielzahl von Biomolekülen für die Massenspektrometrie zugänglich geworden ist. Aufgrund der Tragweite der Entwicklung dieser Methoden wurde der Chemienobelpreis 2002 anteilig an *J. B. Fenn* und *K. Tanaka*, welcher eine Laser-gestützte Methode ähnlich zu MALDI etablierte,^[42] verliehen. Seit der Konzeption und ersten Anwendung dieser Methoden wurden bereits eine Vielzahl von Peptiden,^[43] Proteinen,^[44] Oligonukleotiden^[45-46] und anderen Polymeren^[47] ionisiert und massenspektrometrisch analysiert. Selbst riesige Viruspartikel mit mehreren Millionen Dalton Gewicht konnten unter Zuhilfenahme von ESI erfolgreich gemessen werden.^[48]

Durch ESI und MALDI ist es heutzutage routinemäßig möglich, Proteine und Peptide zu ionisieren und in die Gasphase zu transferieren, was es der Proteomik erlaubt, Massenspektrometer zur Analyse dieser Biomoleküle einzusetzen. Im Folgenden Abschnitt soll erläutert werden, wie Massenspektrometer aufgebaut sind, um die gebildeten Ionen in der Gasphase zu manipulieren und sehr exakte m/z -Verhältnisse zu bestimmen.

3.1.2 Instrumenteller Aufbau von verschiedenen Massenspektrometern

Um die Analyse von komplexen Proteomik-Proben – bestehend aus Proteinen oder Peptiden – nachvollziehen zu können, bedarf es eines groben Überblicks über die eingesetzten Instrumente. In diesem Abschnitt sollen die technischen Grundlagen der in der Proteomik eingesetzten Massenspektrometer erläutert werden. Nach einer Übersicht über den Aufbau der Instrumente wird hier auch auf die in der Proteomik durchgeführten Experimente und einige kommerziell erhältliche Massenspektrometer eingegangen.

Zur Untersuchung von Molekülen anhand ihres m/z -Verhältnisses werden Massenspektrometer verwendet, welche mindestens aus drei Teilen bestehen: einer Ionenquelle zur Erzeugung der zu messenden Ionen, einem Massenanalysator, mit welchem man die Ionen anhand ihrer m/z -Verhältnisse auftrennen kann und schließlich einem Detektor zur Erzeugung auswertbarer Signale.

Sobald ein Analyt ionisiert wurde, kann er aufgrund seines m/z -Verhältnisses und dem Vorzeichen seiner Ladung spezifisch manipuliert werden. Als Ionenquelle wird der Bereich des Massenspektrometers bezeichnet, welcher für die Ionisation der Moleküle und die Fokussierung sowie initiale Weiterleitung der Ionen zuständig ist. Die Ionisation erfolgt dabei im Falle der MS-basierten Proteomik am häufigsten über die im vorherigen Kapitel besprochenen Techniken ESI und MALDI. Gebildete Ionen werden durch eine angelegte Spannung in das Massenspektrometer beschleunigt und können dort weiter manipuliert werden. Durch die gewählte Spannungsrichtung werden zusätzlich Ionen herausgefiltert, welche nicht die zu analysierende Polarität besitzen. Im Falle von ESI findet innerhalb der Ionenquelle auch der Übergang von Normaldruck zu einem Vakuum statt, welches benötigt wird, um eine ausreichende freie Weglänge der Ionen zu gewährleisten. Auch Reste des bei ESI verwendeten Lösungsmittels gehen so leicht in die Gasphase über und können als neutrale Teilchen vom Vakuumsystem entfernt werden. Durch elektrische Felder werden die Ionen innerhalb des Massenspektrometers fokussiert und tiefer in das Instrument geleitet. Diesen Teil der Ionenquelle bezeichnet man auch als Ionenoptik. Abhängig von der Ionisierungs- und Transmissionseffizienz erzeugen ESI-Ionenquellen einen kontinuierlichen Strom an Ionen, welcher analysiert werden kann und damit die sogenannte Helligkeit der Quelle bestimmt. Bei einem hohen Ionenstrom spricht man von einer hellen Ionenquelle.

Im Hochvakuum des Massenspektrometers angekommen, können die Ionen nun in einem Massenanalysator entsprechend ihres m/z -Verhältnisses separiert werden. Über die letzten Jahrzehnte haben sich eine Vielzahl von Massenanalysatoren etabliert, welche auch heute noch in verschiedenen Geräten zum Einsatz kommen. Im folgenden Abschnitt sollen die Funktionsweisen einiger Massenanalysatoren und -detektoren beschrieben werden.

Bereits 1953 wurde das Prinzip eines Massenspektrometers vorgestellt, welches sich die unterschiedlichen Flugzeiten von Ionen nach Beschleunigung in einem elektrischen Feld zu Nutze macht.^[49] Geräte, welche diese Art von Massenanalysator verwenden, werden als Flugzeit-Massenspektrometer (engl. *time-of-flight-MS*, TOF-MS) bezeichnet. Nach der Beschleunigung durch ein elektrisches Feld besitzen Ionen abhängig von ihrem m/z -Verhältnisses verschiedene Geschwindigkeiten. Diesen Unterschied verwendet man zur zeitlichen Trennung der Ionen, indem man diese einen feldfreien Raum bekannter Länge durchqueren lässt. Ionen mit kleinerem m/z besitzen nach Durchflug der Beschleunigerregion eine höhere Geschwindigkeit als Ionen mit größerem m/z und können somit den feldfreien Raum schneller durchqueren. Die Flugzeit der Ionen wird durch das Erreichen eines Detektors bestimmt und dadurch ist es möglich, das m/z -Verhältnis des entsprechenden Ions zu berechnen. In modernen TOF-Geräten kommt häufig ein elektrostatischer Reflektor innerhalb des feldfreien Raums zum Einsatz, welcher die Massenauflösung durch eine Vergrößerung der Flugstrecke erhöht und die Massengenauigkeit durch Normalisierung der Initialgeschwindigkeiten verbessert.^[50] Zur Detektion der Ionen und

damit zur Bestimmung der Flugzeiten kommen verschiedene Varianten von Sekundärelektronenvervielfachern zum Einsatz, wie beispielsweise Mikrokanalplatten oder Kanalelektronenvervielfacher, welche die Signale auftreffender Ionen verstärken und somit zähl- und detektierbar machen. Da typische Flugzeiten von Ionen im Bereich von unter 100 ns liegen, sind TOF-Massenspektrometer in der Lage, Massenspektren sehr schnell aufzunehmen. Mit modernen Geräten ist es möglich, hohe Auflösungen und Massegenauigkeiten zu erhalten.^[51]

Eine andere Variante eines Massenanalysators nutzt den unterschiedlichen Effekt elektrischer Felder auf die unterschiedlichen m/z -Verhältnisse der Ionen. In Quadrupol-Massenanalysatoren sind vier Elektroden quadratisch angeordnet, wobei je zwei diagonale Elektrodenpaare elektrisch miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 3.4A).

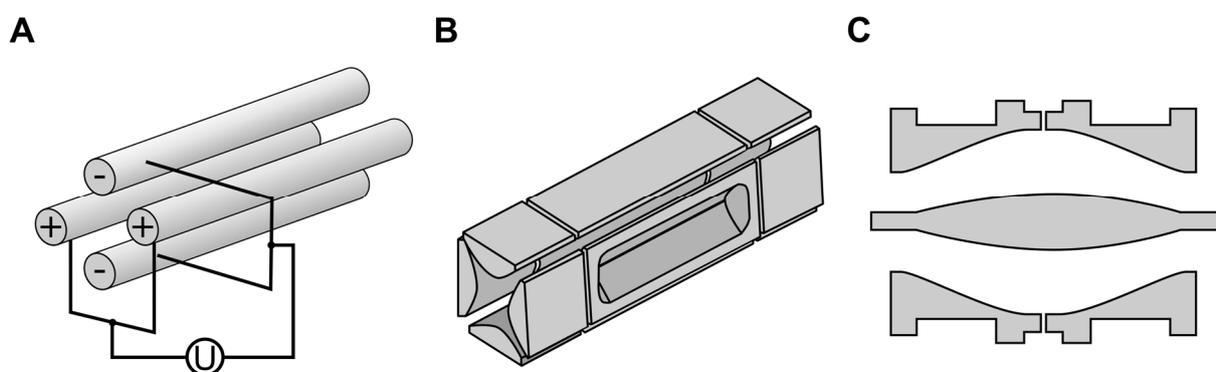


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung einiger Massenanalysatoren. A) Quadrupol-Massenanalysator. Gezeigt sind die vier quadratisch angeordneten Elektroden, wobei jeweils gegenüberliegende Elektroden gemeinsam an eine Spannungsquelle angeschlossen sind. B) Lineare Quadrupol-Ionenfalle. In der hier dargestellten Variante ist einer der Schlitze zu erkennen, welcher zur seitlichen Detektion der gesammelten Ionen verwendet werden kann. Modifiziert nach ^[52]. C) Querschnitt des Orbitrap-Massenanalysators.

Durch das Anlegen einer hochfrequenten Wechsel- und einer Gleichspannung an die Elektroden kommt es zur Ausbildung eines elektrischen Quadrupolfeldes. Bewegen sich die Ionen nun axial durch dieses Quadrupolfeld, so kann über die angelegte Spannung die Trajektorie der Ionen beeinflusst werden. Durch den hochfrequenten Wechselspannungsanteil kommt es zu einer Oszillation der Ionen entlang der Bewegungsachse, wobei die Amplitude der Oszillation abhängig vom m/z -Verhältnis der jeweiligen Ionen ist. Wird die Oszillation eines Ions zu groß, so berührt dieses eine Elektrode des Quadrupols oder eine andere geladene Metallfläche, wird entladen und ist somit nicht mehr zur weiteren Analyse verfügbar – das Ion wurde herausgefiltert. Ionen mit anderen m/z -Verhältnissen können jedoch stabile Trajektorien durch den Quadrupol besitzen und werden so durch das Quadrupolfeld transmittiert. Mithilfe der Mathieu'schen Differenzialgleichungen ist es möglich, die Bahnen der Ionen durch das jeweilige Quadrupolfeld zu berechnen und damit die Spannungen so zu variieren, dass nur Ionen in einem bestimmten m/z -Bereich stabile Bahnen durch den Quadrupol besitzen. Mit dieser Technik können Massenspektren aufgenommen werden, indem die Spannungen kontinuierlich variiert

werden, so dass der gesamte zu analysierende m/z -Bereich nacheinander stabile Bahnen durch den Quadrupol besitzt und ein Detektor gleichzeitig misst, bei welchen Spannungen Ionen transmittiert werden. Zusätzlich kann ein Quadrupol auch nur zur Isolation einer bestimmten Ionenspezies verwendet werden, um nur diese weiter durch das Massenspektrometer zu leiten.

Auch die Paul-Ionenfalle bedient sich elektrischer Felder, um Ionen gemäß ihrer m/z -Verhältnisse manipulieren zu können.^[53] Jedoch ist hier im Gegensatz zum Quadrupol nicht nur die Manipulation von Ionen, sondern auch deren Fokussierung und Speicherung im Raum möglich. Klassischerweise besteht eine Paul-Ionenfalle aus einer ringförmigen Elektrode, welche sich zwischen zwei elektrisch verbundenen Endkappen-Elektroden befindet. Ähnlich wie zum Quadrupol entsteht auch hier durch das Anlegen von hochfrequenten Wechselfspannungen im Inneren der Ionenfalle ein Quadrupolfeld, welches die Ionen in der Mitte der Falle fokussiert. Durch das Ändern der angelegten Spannungen können die stabilen m/z -Bereiche variiert werden, sodass es möglich ist, eine spezifische Ionenpopulation in der Falle zu behalten, aber alle Ionen mit anderen m/z -Verhältnissen aus der Falle zu entfernen. Nach einem sehr ähnlichen Prinzip arbeiten lineare Quadrupol-Fallen (engl. *linear trap quadrupol, LTQ*), welche sich aus drei Quadrupolen aufbaut: statische Gleichspannungen an den beiden Endquadrupolen dienen als Endkappen-Elektroden und beschränken die Ionen axial, während der mittlere Quadrupol durch eine hochfrequente Wechselfspannung die Ionen radial einschränkt (siehe Abbildung 3.4B).^[52] Vorteil dieser Anordnung ist eine erhöhte Ionenspeicherungskapazität, schnellere Aufnahmezeiten der Massenspektren im Vergleich zu einer Paul-Falle und dass sich diese lineare Falle auch wie ein Quadrupol einfach als Massefilter verwenden lassen kann.^[54] Sowohl bei der Paul-Falle als auch bei der linearen Quadrupol-Falle erfolgt die Aufnahme von Massenspektren durch ein kontinuierliches Wechseln der Spannung, der damit verbundenen Ejektion der Ionen mit den entsprechenden m/z -Verhältnissen und der Detektion der Signale über Sekundärelektronenvervielfältiger. Sowohl im Falle von Quadrupol-MS als auch bei Ionenfallen-MS können Spektren mit sehr hohen Geschwindigkeiten erzeugt werden. Allerdings werden in den meisten Fällen nur niederaufgelöste Massen erhalten, welche einen Massenfehler von 0.05 – 0.2 Da besitzen.

Anders als die bisher betrachteten Massenanalysatoren, bei welchen die Ionen sequentiell – getrennt durch die unterschiedliche Flugzeit bei TOF-MS oder durch die elektrischen Felder von Quadrupolen und Ionenfallen – detektiert werden, gibt es auch Massenanalysatoren, welche den kompletten m/z -Bereich gleichzeitig messen können. Dies ist mit sogenannten Fourier-Transformations-Massenspektrometern (FT-MS) möglich. Hierzu zählen das FT-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) und das Orbitrap-Massenspektrometer (OT-MS).

Dem FT-ICR-MS liegt eine modifizierte Penning-Falle zu Grunde, welche hohe Magnetfelder verwendet, um die Bewegung der Ionen auf Kreisbahnen innerhalb der zylindrischen Falle zu beschränken.

Orthogonale elektrische Wechselfeldern können nun Ionen anregen und wenn die Frequenz des elektrischen Feldes mit der m/z -Verhältnis-abhängigen Zyklotronresonanzfrequenz übereinstimmt, so vergrößert sich der Radius der Ionenkreisbahn. Nach der Anregung bewegen sich alle Ionen gleicher m/z -Verhältnisse als diskrete Populationen von Ionen mit ihrer spezifischen Zyklotronresonanzfrequenz und erzeugen dabei Spiegelströme an Elektroden am Rand der ICR-Zellen. Die resultierende Frequenz dieser Spiegelströme kann sehr genau gemessen werden und ist die Überlagerung aller Zyklotronresonanzfrequenzen der analysierten Ionen. Über Fourier-Transformation können aus dieser resultierenden Frequenz wieder alle einzelnen Frequenzen errechnet werden, welche umgekehrt proportional zu den m/z -Verhältnissen der Ionen sind.^[55] Durch kontinuierliche Variation des Wechselfeldes zur Anregung der Ionen und Aufnahme des resultierenden Spiegelstroms ist es somit möglich, alle m/z -Verhältnisse der Ionen gleichzeitig zu bestimmen. Mit FT-ICR-Massenspektrometern erhält man Spektren mit sehr hoher Auflösung und sehr guter Massengenauigkeit. Allerdings ist es zur Erzeugung der benötigten hohen Magnetfelder nötig, flüssiges Helium zur Kühlung der Magnete zu verwenden, was mit hohen Kosten verbunden ist. Des Weiteren können nicht zu viele Ionen gleichzeitig in der Falle analysiert werden, weil es sonst durch Raumladungseffekte zu einer Verringerung der Massengenauigkeit kommt.

Orbitrap-Massenspektrometer (OT-MS) basieren auf einem sehr ähnlichen Prinzip. Als eine Variation der Kingdon-Ionenfalle veröffentlichte A. Makarov im Jahr 2000 die Entwicklung einer Falle, welche sich aus einer zentralen Spindel und einem Gehäuse als Elektroden zusammensetzt und elektrische Felder benutzt, um Ionen einzufangen (siehe Abbildung 3.4C).^[56] Die Ionen bewegen sich auf komplexen Spiralen entlang der zentralen Elektrode, welche durch die schräge Injektion in die Falle und dem Gleichgewicht zwischen elektrostatischer Anziehung und der Trägheit der Ionen zustande kommen. Die Frequenz der axialen Bewegung ist dabei nicht von den Initialbedingungen der Ionen bei der Injektion, sondern nur von deren m/z -Verhältnissen abhängig. So bilden sich diskrete Ringe von Ionen gleicher m/z -Verhältnisse aus, welche entlang der zentralen Elektrode hin- und her schwingen. Ähnlich wie bei FT-ICR-MS kann der resultierende Spiegelstrom als Überlagerung der einzelnen Schwingungsfrequenzen gemessen und über eine Fourier-Transformation von der Zeit- in die m/z -Domäne umgewandelt werden. Zu Beginn konnte die Orbitrap-Technologie nur an gepulste Ionisationsmethoden wie MALDI gekoppelt werden, weil zur Injektion in die Orbitrap diskrete Ionenpakete erzeugt werden müssen. Später wurde diese Einschränkung durch den zusätzlichen Einbau einer vorgeschalteten gekrümmten linearen Ionenfalle, der sogenannten *C-Trap*, aufgehoben, in welcher die zu analysierenden Ionen zunächst gesammelt, auf eine geringe Energie abgekühlt und dann über Anlegen bestimmter Spannungen als gepulste Ionenpakete in die Orbitrap injiziert werden.^[57] OT-MS sind ebenfalls in der Lage, Massenspektren mit sehr hoher Auflösung und exzellenter Massengenauigkeit zu generieren, ohne dass wie beim FT-ICR-MS tiefgekühlte Magnete notwendig sind. Allerdings ist es bei OT-MS, wie bei allen

auf Ionenfallen-basierenden Messungen, nötig, die Anzahl der zu analysierenden Ionen zu beschränken, um Raumladungseffekte und die damit verbundene Abnahme der Massengenauigkeit zu vermeiden. Dies geschieht durch die sog. *automatic gain control (AGC)*, bei welcher in regelmäßigen Abständen Vormessungen vor der eigentlichen Aufnahme von Massenspektren durchgeführt werden. In diesen Vormessungen wird der Ionenstrom bestimmt, um die insgesamt Anzahl an Ladungen abschätzen zu können. Bei der Messung der echten Massenspektren werden die Ionen nun nur solange in der C-Trap gesammelt, bis die maximale Anzahl der zu analysierenden Ionen, abgeschätzt aus der Vormessung, erreicht ist. Die Zeit, in welcher die Ionen für die Injektion gesammelt werden, wird als Injektionszeit bezeichnet. Üblicherweise können in Orbitrap-Fallen bis zu fünf Millionen Ladungen gleichzeitig analysiert werden, die Injektionszeit über den komplett zu analysierenden Massebereich liegt hier bei nur wenigen Millisekunden.

Die hier vorgestellten Massenanalytoren können dazu verwendet werden, um verschiedene MS-Experimente durchzuführen. Eine Übersicht ist in Abbildung 3.5 abgebildet.

A Full Scan (MS)



B MS/MS (MS²)

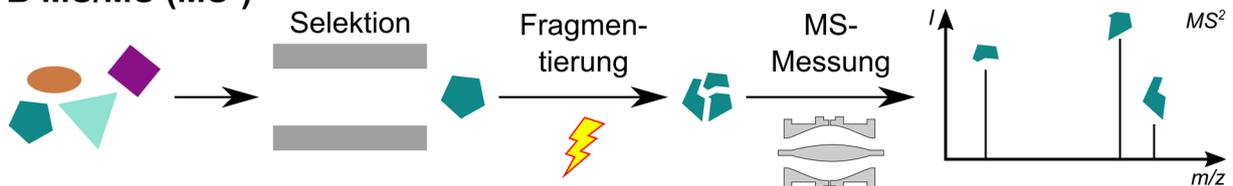


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung verschiedener Messmodi für MS-Experimente. A) Full Scan (MS)-Messmodus. Alle erzeugten Ionen im zu untersuchenden Massebereich werden ohne Selektion zusammen analysiert, um ein Massenspektrum zu generieren. B) MS/MS (MS²)-Messmodus. Hier wird ein Massenfilter, z. B. eine Ionenfalle oder ein Quadrupol, dazu verwendet, Ionen mit spezifischem m/z -Verhältnis zu isolieren. Anschließend erfolgt die Fragmentierung der gesammelten Ionen und die MS-Messung liefert die Massen der entstehenden Fragmentionen.

Im einfachsten Fall wird ein Massenspektrum über einen großen m/z -Bereich aufgenommen, um ein MS-Spektrum (auch: MS¹-Spektrum, engl. *Full MS*) zu erhalten, in dem alle auftretenden m/z -Verhältnisse mit ihrer jeweiligen Intensität abgebildet sind (Abbildung 3.5A). Durch die Fähigkeit der erläuterten Massenanalytoren, einzelne Ionenspezies zu selektieren, sind jedoch auch weitere Experimente möglich. Bei einem Tandem-MS-Experiment (auch: MS², MS/MS, siehe Abbildung 3.5B) wird im ersten Schritt ein MS-Spektrum mit allen Ionen gemessen. Anschließend erfolgt die Selektion einer bestimmten Ionenspezies durch einen Quadrupol oder eine Ionenfalle. Nach der Isolation des Ions in der Gasphase erfolgt dessen Fragmentierung: aus den sog. Mutter- oder Vorläuferionen bilden sich durch

Prozesse, auf die in Kürze genauer eingegangen wird, Produktionen (auch: Tochterionen oder Fragmentationen). Diese neuen Ionen können nun gemessen werden, um das MS/MS-Spektrum zu erhalten. Indem die m/z -Verhältnisse der Produktionen analysiert werden, ist es möglich, aus der Tandem-Massenspektrometrie strukturelle Informationen über die Vorläuferionen zu beziehen. Zusätzlich kann das Experiment auch mit Produktionen durchgeführt werden, um MS-Spektren höherer Ordnung zu erzeugen, sog. MS^n -Spektren. Bei MS^3 -Spektren handelt es sich beispielsweise um Experimente, in welchen das erste Vorläuferion isoliert und fragmentiert wird, um die erste Generation an Produktionen zu erhalten. Nun wird aus diesen Produktionen wieder ein Ion als Vorläuferion isoliert und fragmentiert, um eine zweite Generation an Produktionen zu erhalten, welche gemessen werden können. Diese Art von Experimenten sind nur in Geräten mit Ionenfallen möglich, da die intermediär auftretende erste Generation an Produktionen zur weiteren Isolation des neuen Vorläuferions gespeichert werden muss. Allerdings ist es so möglich, noch mehr strukturelle Informationen durch weitere Fragmentierungen zu gewinnen.

Zur Fragmentierung von Ionen in der Gasphase innerhalb der Massenspektrometer stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, welche sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Hier soll nur auf zwei Typen von Fragmentierungen eingegangen werden, welche in Proteomik-Anwendungen häufig zum Einsatz kommen: die kollisionsinduzierte Fragmentierung (engl. *collision induced dissociation, CID*) und die Elektronentransfer-Fragmentierung (engl. *electron transfer dissociation, ETD*).

Die kollisionsinduzierte Fragmentierung kommt durch den Zusammenstoß der beschleunigten Ionen mit einem Inertgas zustande. Die erhöhte innere Energie durch den Stoß führt zu einer Spaltung der Ionen in kleinere Fragmente. Oft ist dies kein definiert ablaufender Prozess, sondern es wird eine Verteilung verschiedener Fragmente erhalten. Fragmente sind in den Massenspektren nur dann sichtbar, wenn es sich nach der Fragmentierung immer noch um geladene Teilchen handelt. Verliert ein Fragment bei der Spaltung seine Ladung, so wird es für das Massenspektrometer „unsichtbar“ und man spricht von einem Neutralverlust (engl. *neutral loss*).

Es wird zwischen zwei Arten der kollisionsinduzierten Fragmentierung unterschieden: der resonanzbasierten Ionenfallen-CID (im Zuge dieser Arbeit als CID bezeichnet) und der strahlbasierten CID (engl. *beam-type CID*, im Rahmen dieser Arbeit als HCD bezeichnet). Bei dem resonanzbasierten CID-Prozess werden die Ionen nach der Isolation in einer Ionenfalle durch Ändern der Wechselspannung spezifisch angeregt und beginnen mit niedriger Energie (<2 eV) in der Falle zu schwingen.^[58] Die Kollision mit einem Stoßgas, in Ionenfallen meist Helium, führt dann zur Fragmentierung der Vorläuferionen. Da die Anregung der Vorläuferionen abhängig von deren m/z -Verhältnis ist, verläuft die Spaltung sehr spezifisch. Die entstehenden Produktionen befinden sich nicht in Resonanz mit der Wechselspannung und werden so nicht weiter angeregt, weitere Fragmentierungen bleiben somit weitgehend aus. CID in der

Ionenfalle besitzt jedoch den Nachteil, dass Fragmente mit geringem m/z – ab etwa 33 % des m/z -Verhältnis des Vorläuferions – nach der Aktivierung nicht mehr stabil in der Ionenfalle gespeichert werden können und verloren gehen.^[58-59] Zwar gibt es Techniken, welche dieses niedrige-Massen Limit (engl. *low mass cut-off*, *LMCO*) umgehen, jedoch sind diese nicht weit verbreitet.^[60]

Die andere Art der kollisionsinduzierten Fragmentierung, strahlbasierte CID, wurde nach Einführung in kommerzielle Geräte auch HCD genannt, englisch für *higher-energy C-trap dissociation*. Hier werden die Vorläuferionen isoliert, beispielsweise durch einen Quadrupol, und anschließend in eine Oktupol-Kollisionszelle beschleunigt, welche einen höheren Druck besitzt.^[61] Die kinetische Energie der Ionen beträgt hier etwa 100 eV und ist damit höher als bei Ionenfallen-CID-Prozessen.^[58] Dadurch, dass die Anregung hier nicht durch Resonanzprozesse durchgeführt wird, kommt es vermehrt zur weiteren Fragmentierung. Allerdings besitzt HCD kein Limit bei der Analyse niedriger Massen.

Bei der Elektronentransfer-Fragmentierung (ETD) handelt es sich um eine mechanistisch andere Fragmentierungsart. ETD ging aus der früher verwendeten Elektroneneinfang-Fragmentierung (*electron capture dissociation*, *ECD*) hervor, welche technisch in vielen Massenspektrometern etwas schwieriger zu realisieren ist. Bei ETD werden keine inerten Stoßgase, sondern durch chemische Ionisation erzeugte Radikalanionen verwendet, um eine Fragmentierung herbeizuführen.^[62] Als Reagenz der Wahl wird heute meistens Fluoranthen verwendet.^[63] Zur Fragmentierung werden die mehrfach positiv geladenen Vorläuferionen in einer Ionenfalle isoliert und anschließend werden die erzeugten Fluoranthen-Radikalanionen in die Falle eingeleitet und gespeichert. In einer exothermen Reaktion wird ein Elektron auf das Vorläuferion übertragen, wodurch sich ein instabiles Radikalkation bildet. Dieses zerfällt sehr rasch und bildet dabei Fragmente, welche komplementär zu denen der CID- und HCD-Prozessen sind. Bei diesem Prozess bleiben Modifikationen an Biomolekülen, wie beispielsweise Phosphorylierungen, oft intakt, was im Vergleich zu CID- und HCD-Prozessen einen Vorteil darstellt. Jedoch sind die instrumentellen Voraussetzungen komplizierter, da eine zusätzliche chemische Ionisationsquelle sowie eine Ionenfalle benötigt werden. Weil der Ladungszustand der Vorläuferionen durch Transfer des Elektrons um eins reduziert wird, eignet sich ETD nur zur Fragmentierung mehrfach geladener Vorläuferionen.

Bei der Kombination von mehreren Massenanalytoren spricht man von Hybrid-Geräten. Es folgt eine kurze Übersicht über den Aufbau der Geräte, welche in dieser Arbeit verwendet wurden und welche Analysemöglichkeiten sich damit ergeben.

Bei der *LTQ Orbitrap XL* handelt es sich um ein Hybrid-Massenspektrometer, welches eine lineare Quadrupol-Ionenfalle mit einer Orbitrap verbindet. Somit besteht die Möglichkeit, hochaufgelöste Spektren in der Orbitrap und niedrigaufgelöste Spektren mit sehr kurzer Messdauer in der Ionenfalle

aufzunehmen. Zur Fragmentierung stehen neben CID in der Ionenfalle optional auch noch HCD und ETD zur Verfügung, um die Erfassung kleiner Fragmente zu ermöglichen und komplementäre Fragmentierungsdaten zu liefern. Durch Vorhandensein der Ionenfalle können MS^n -Experimente durchgeführt werden.

Im Gegensatz dazu besitzen *Q Exactive HF*-Instrumente nur eine Orbitrap als Massenanalysator, die Selektion von Vorläuferionen wird durch einen Quadrupol ermöglicht. Allerdings kommt in diesem Gerät eine überarbeitete Hochfeld-Orbitrap zum Einsatz, welche kleiner ist und mit höheren elektrischen Spannungen betrieben wird, was die Auflösung und Messrate der Instrumente in Vergleich zu älteren Orbitrap-Analysatoren extrem verbessert.^[64] Da keine Ionenfalle vorhanden ist, können in diesen Instrumenten keine MS^3 - oder höhere MS^n -Experimente durchgeführt werden und zur Fragmentierung steht lediglich HCD zur Verfügung.

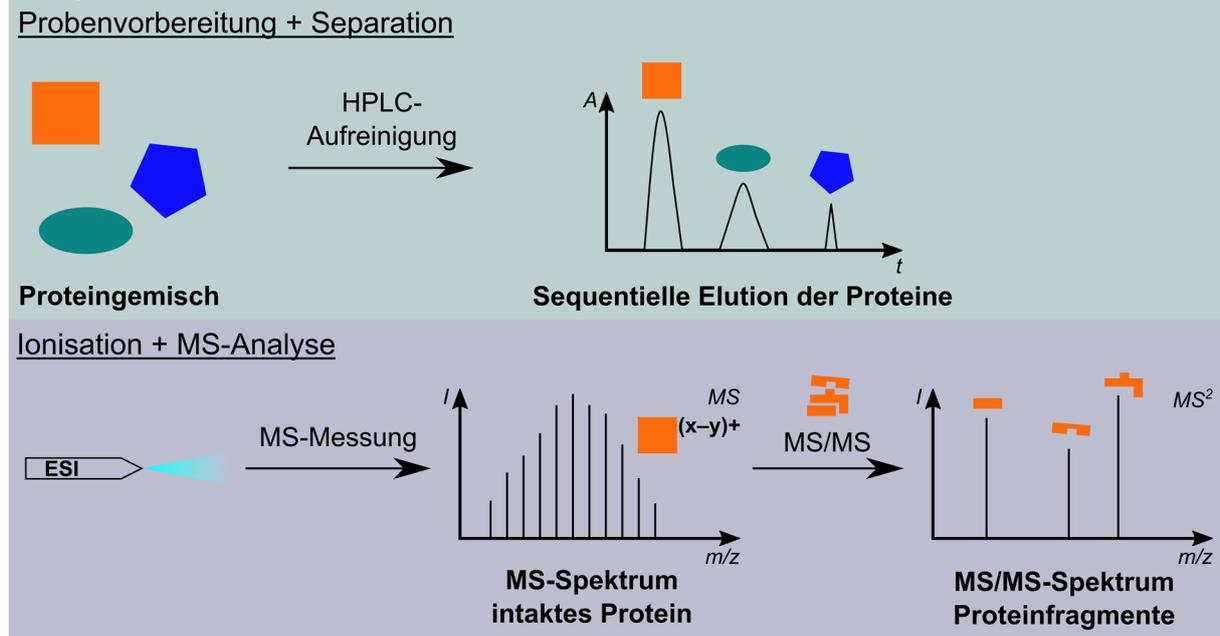
Als eines der modernsten Hybrid-Massenspektrometer vereinigt die *Orbitrap Fusion Lumos* einen Quadrupol, eine überarbeitete, duale lineare Ionenfalle und eine Hochfeld-Orbitrap.^[65] Somit ist es möglich, mit hohen Messraten nieder- oder hochaufgelöste Spektren aufzunehmen. Durch eine überarbeitete Ionenoptik besitzt das Gerät eine hohe Helligkeit der Ionenquelle und ist in der Lage, sehr sensitiv MS^3 - und höhere Experimente durchzuführen. Zur Fragmentierung von Vorläuferionen stehen alle gängigen Methoden zur Verfügung.

Die Massenspektrometrie hat sich vor allem durch die dargelegten technischen Entwicklungen als eines der wichtigsten Werkzeuge für die Proteomik erwiesen. Im folgenden Abschnitt soll nun erläutert werden, wie die per Massenspektrometrie bestimmten m/z -Verhältnisse und die Fragmentierung von Ionen dazu verwendet werden können, Proteine auch aus sehr komplexen Proben zuverlässig nachzuweisen und zu identifizieren.

3.1.3 Prinzip der Protein-Identifikation in der Massenspektrometrie

Ziel von Proteomik-Experimenten ist es sehr häufig, aus einer komplexen Mischung von Proteinen heraus möglichst viele individuelle Proteinspezies robust nachzuweisen. Werden hierfür Massenspektrometer verwendet, so muss diese Identifikation aus den gemessenen m/z -Verhältnissen erfolgen. Zur massenspektrometrischen Identifikation von Proteinen haben sich zwei komplementäre Methoden etabliert: Der „*top-down*“-Ansatz und der „*bottom-up*“-Ansatz. In Abbildung 3.6 sind diese beiden Ansätze schematisch dargestellt.

A top-down-Ansatz



B bottom-up-Ansatz

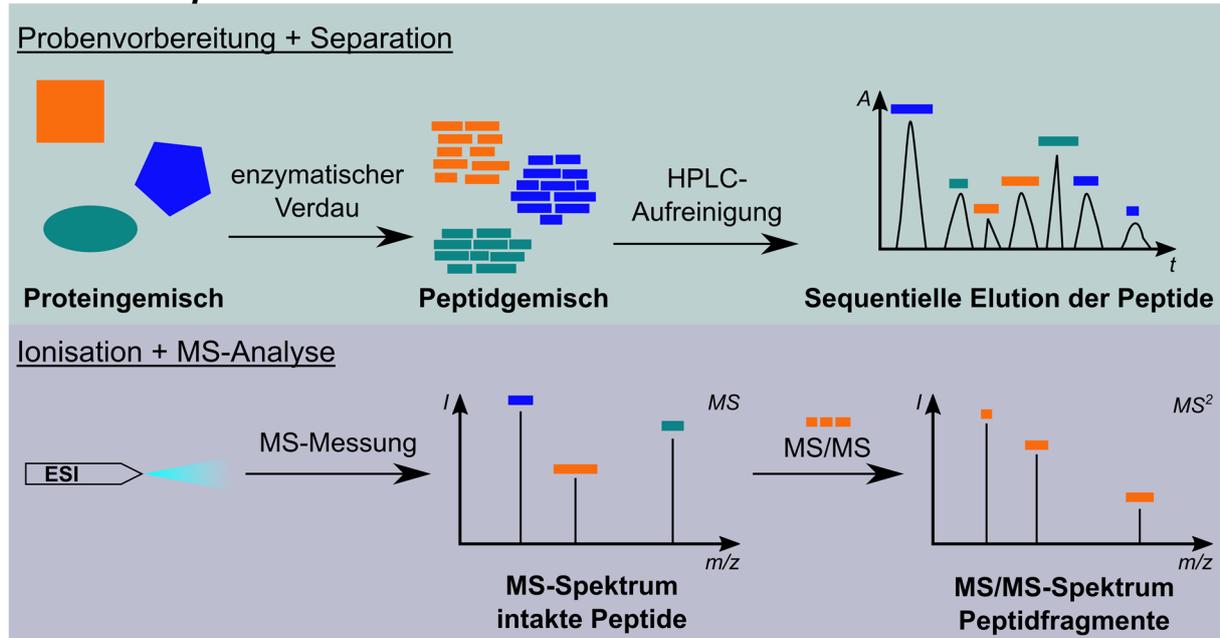


Abbildung 3.6: Prinzipien der zwei am meisten verwendeten Methoden in MS-basierten Proteomikexperimenten. A) „top-down“-Ansatz. Ein Proteingemisch wird über HPLC aufgereinigt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Nach ESI ist im MS-Spektrum eine charakteristische Verteilung von verschiedenen Ladungszuständen zu beobachten. In einem MS/MS-Experiment können die Protein-Ionen in der Gasphase isoliert und fragmentiert werden, um die Massen von Peptiden als Proteinfragmente zu detektieren. B) „bottom-up“-Ansatz. Im Gegensatz zum top-down-Ansatz werden die Proteine hier zunächst enzymatisch verdaut, um eine komplexe Peptidmischung zu generieren, in welcher die Peptide jedoch alle eine vergleichbare Länge besitzen. Auch in dieser Herangehensweise folgt eine HPLC-Separation und ein MS/MS-Experiment. Während im MS¹-Spektrum die Massen der intakten Peptide gemessen werden, folgt im MS²-Spektrum eine Fragmentierung der Peptide, um sequenzspezifische Fragmente zu erhalten und deren Massen zu bestimmen. Zur Vereinfachung wurde auf die Darstellung von Isotopenmustern verzichtet.

Im Falle des „top-down“-Ansatzes werden Proteine intakt gemessen (Abbildung 3.6A). Da im Bereich der Proteomik häufig Proteinmischungen und nicht nur einzelne Proteine analysiert werden sollen, ist es notwendig, die Proteine über HPLC oder andere Methoden voneinander zu separieren. Gleichzeitig

können so auch für die nachfolgende Ionisierung störende Interferenzen, wie Salze oder besser ionisierbare, kleine Moleküle, effektiv abgetrennt werden. Wird als Ionisationsmethode ESI verwendet, so ist es möglich, die Ionisation kontinuierlich durchzuführen und die HPLC direkt an die Ionisationsquelle und das Massenspektrometer anzukoppeln (*online*-Analyse). Nach erfolgreicher Ionisation der Proteine wird in einem ersten Schritt deren intakte Masse bestimmt. Das Massenspektrum zeigt dabei mehrere charakteristische Signale, welche durch die Größe der Proteinionen und der damit verbundenen Vielzahl von unterschiedlichen Ladungszuständen erklärbar sind. Natürlich vorkommende, schwere Isotopologe der Proteinionen führen zum Auftreten spezifischer Isotopenmuster, welche dazu verwendet werden können, die exakten Massen der Proteine aus den gemessenen m/z -Verhältnissen zu berechnen. Bei wenig komplexen Proben oder sich stark unterscheidenden Molekulargewichten reicht dies aus, um Proteine eindeutig zu identifizieren. Spezifischer gelingt dies jedoch, wenn die Proteine einem MS^2 -Experiment unterzogen werden. Dafür werden die Proteinionen innerhalb der Gasphase, durch ihr spezifisches m/z -Verhältnis, isoliert und anschließend mit verschiedenen Methoden fragmentiert. Bei den resultierenden Fragmentionen handelt es sich oft um Peptide, welche durch Bruch des Peptidrückgrats aus dem Protein gebildet werden und weitere Aussagen über die Substruktur des Proteins erlauben.

Mithilfe der „*top-down*“-Methode lassen sich so beispielsweise Antikörper charakterisieren,^[66-67] bei denen es sich um kleine bis mittlere Proteine handelt, welche eine sehr variable Sequenz besitzen und verschiedene Modifikationen tragen können. Des Weiteren ist es möglich, die Anzahl an eingebauten Modifikationen pro Protein durch den „*top-down*“-Ansatz zu bestimmen, was zur Kontrolle von sehr gezielten Proteinmanipulationen verwendet werden kann und die genaue Proteoform des Proteins identifiziert.^[68] Auch die Analyse sehr komplexer Proteinmodifikationen wie Glykosylierungen kann über die Bestimmung der intakten Proteinmasse und anschließender Fragmentierung bewerkstelligt werden.^[69]

Allerdings ist die „*top-down*“-Methode auch mit Herausforderungen verbunden: Mit steigender Größe der zu analysierenden Proteine sinkt auch deren Ionisationseffizienz. Da auch eine geringe Menge an kleineren Molekülen die Ionisation stark beeinträchtigen kann, ist es schwierig, sehr komplexe Proteinproben nach diesem Ansatz zu analysieren. Zusätzlich ist das Erhalten von spezifischer Sequenzinformation stark abhängig davon, an welchen Stellen das intakte Protein während des MS/MS -Experiments fragmentiert.

Aus diesen Gründen wird die „*top-down*“-Methode eher für Proben angewandt, welche nur aus einigen wenigen Proteinen zusammengesetzt sind. Sollen hoch komplexe Proben, wie zum Beispiel komplette Zellysate, analysiert werden, so wird sehr häufig auf den komplementären „*bottom-up*“-Ansatz zurückgegriffen, welcher in Abbildung 3.6B beschrieben wird.

Bei dieser Methode werden die isolierten Proteine in einem ersten Schritt durch Proteasen verdaut, welche sequenzspezifisch Peptidbindungen spalten und so Peptide bilden. Dies hat im Vergleich zum „*top-down*“-Ansatz den großen Vorteil, dass die ursprüngliche Proteingröße keine Rolle mehr spielt, sondern Peptide erhalten werden, welche eine geringere Masse besitzen und somit besser ionisiert werden können. Als Protease für komplexe Proteinproben kommt meistens die Endopeptidase Trypsin zum Einsatz, welche C-terminal zu den Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Da diese beiden Aminosäuren zusammengenommen recht häufig vorkommen, gibt es so ausreichend Stellen in Proteinen, an welchen geschnitten werden kann. Zusätzlich kann so sichergestellt werden, dass jedes entstehende Peptid unter sauren Bedingungen mindestens zwei positive Ladungen besitzt: eine Ladung am N-Terminus und eine an den basischen, C-terminalen Aminosäuren, bei denen es sich nach der Spaltung mit Trypsin um Arginin oder Lysin handeln muss. Dieser Ladungszustand von mindestens +2 erleichtert die Analyse, welche meistens im Positivmodus durchgeführt wird. Auch andere Endopeptidasen können zur Probenvorbereitung verwendet werden, beispielsweise Chymotrypsin, Glu-C oder Asp-N. Je nach spezifischem Experiment werden Proteasen auch gleichzeitig oder sequentiell eingesetzt, um die Verdaueffizienz zu erhöhen oder höhere Sequenzabdeckungen zu erzielen.^[70]

Durch den proteolytischen Verdau bilden sich aus jedem Protein mehrere Peptide, die Komplexität der Probe steigt somit enorm an. Dennoch ist der „*bottom-up*“-Ansatz sensitiver, als die proteomweite Messung intakter Proteine, da Peptide einfacher ionisiert und detektiert werden können. Zusätzlich kann die Position posttranslationaler Modifikationen durch die individuelle Detektion der Peptide häufig spezifischen Peptiden und sogar einzelnen Aminosäuren zugewiesen werden.

Ähnlich zum „*top-down*“-Ansatz wird auch die generierte komplexe Peptidmischung über HPLC-MS aufgetrennt. Zu jedem Zeitpunkt eluieren mehrere Peptide vom Umkehrphasen-Material der Säule, werden *online* durch ESI ionisiert und somit in das Massenspektrometer geleitet.

Um Peptide in der Massenspektrometrie zu identifizieren, ist es nicht ausreichend, nur die Peptidmasse akkurat zu bestimmen. Wegen der enormen Anzahl an möglichen Peptiden kann es viele mögliche Peptidsequenzen geben, welche mit einem gemessenen m/z -Verhältnis innerhalb der geringen Fehlergrenzen übereinstimmen. Auch das Auftreten von Isomeren ist möglich, in welchen sich die exakte Masse gleicht, die Peptide aber eine andere Sequenz besitzen und aus unterschiedlichen Proteinen hervorgehen.

Zur Identifikation der Peptide wird deswegen zunächst ein Massenspektrum über den gesamt betrachteten m/z -Bereich aufgenommen, in welchem die intakten Peptidmassen erfasst werden. Im Spektrum werden Ionen als Peptidkandidaten gesehen, wenn sie einen Ladungszustand von mindestens +2 besitzen, was durch den proteolytischen Verdau angenommen werden kann. Nun werden die

Peptidkandidaten nach und nach im Massenspektrometer selektiert und anschließend fragmentiert, um MS²-Spektren aufzunehmen. Diese MS²-Spektren beinhalten nun die Information über die exakte Masse des intakten Peptids – bei welchem es sich um das selektierte Vorläuferion handelt – sowie über die m/z -Verhältnisse der entstehenden Peptidfragmente.

Werden Peptide in der Gasphase fragmentiert, so bricht bei unmodifizierten Peptiden üblicherweise das Amid-Rückgrat zuerst. Da es sich bei der Fragmentierung um stochastische Prozesse handelt, bilden sich sog. Ionenserien aus, in welchen das Peptid an verschiedenen Stellen entlang der Amidbindungen gespalten wird. Abbildung 3.7A zeigt die Spaltung der Peptide mit den entstehenden Fragmenten, welche *Johnson et al.* 1987 mit der bis heute bestehenden Nomenklatur versehen.^[71]

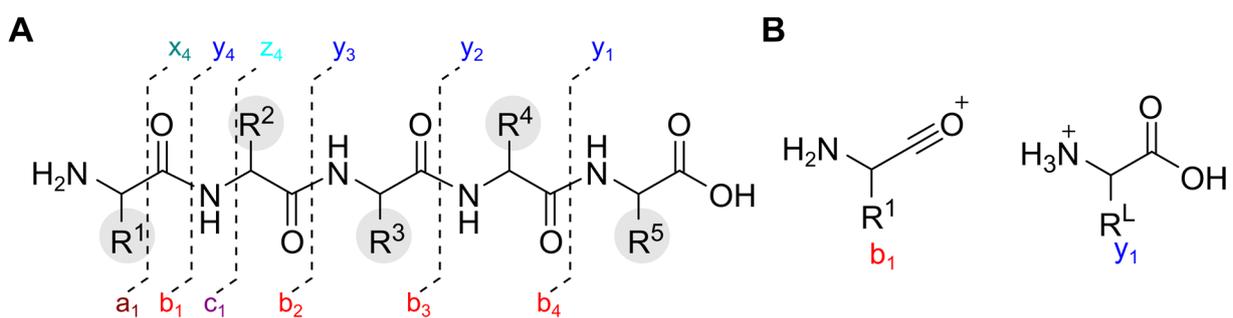


Abbildung 3.7: Bei der Fragmentierung von Peptiden gebildete Ionen. A) Übersicht der nach Johnson et al. benannten Ionenserien. Zur besseren Darstellung wurden weitere Fragmentierungen, welche zu a, c, x und z-Ionen führen, nicht dargestellt. B) Strukturen der entstehenden b₁ und y₁-Ionen im Positivmodus. Die y-Ionen liegen nach Protonentransfer während der Fragmentierung als Ammonium-Ionen geladen vor und können detektiert werden. L steht für die Länge des Peptids.

Je nach gewählter Fragmentierungsmethode können sich verschiedene Ionenserien bevorzugt ausbilden. Werden bei der CID-Fragmentierung hauptsächlich b- und y-Ionen beobachtet (siehe Abbildung 3.7B), so liefert HCD intensivere y-Ionen, da die labileren b-Ionen weiter fragmentieren.^[72] ETD hingegen führt zur bevorzugten Entstehung von c- und z-Ionen.^[62]

In allen Fällen beinhalten die gebildeten Fragmentionen Informationen über die Sequenz des isolierten und fragmentierten Peptids. Allerdings ist es oft nicht möglich, die gesamte Peptidsequenz aus den Fragmentionen zu erschließen, da sich nicht für jedes Peptid alle Fragmentionen bilden. Statt *de novo*-Ansätzen, in welchen die Peptidsequenz nur aus den beobachteten Fragmentionen gebildet wird, bedient sich die MS-basierte Proteomik deswegen dem Prinzip der Datenbankanalyse, um Peptide robust zu identifizieren und schließlich aus den Peptiden auf die Proteine zurückzuschließen.^[73] Durch Genomsequenzierungen und Annotationen ist von sehr vielen Organismen bereits bekannt, welche Proteine sich bilden können und was diese für Sequenzen besitzen. Dieser Zugang zu den Sequenzinformationen ist für die moderne „*bottom-up*“-Proteomik entscheidend.

Zur Datenbankanalyse stehen verschiedene Algorithmen wie beispielsweise *Sequest*, *Mascot* oder *Andromeda* zur Verfügung, welche alle nach einem ähnlichen Prinzip arbeiten.^[74-76] Zunächst wird die

Proteindatenbank von Interesse ausgewählt, welche alle bekannten Primärsequenzen der Proteine enthält. Die Algorithmen führen nun einen Verdau der Proteine *in silico*, d.h. virtuell, mit der verwendeten Protease durch. Den Programmen wird auch mitgeteilt, welche Modifikationen man an welchen Aminosäuren erwartet, um eine Liste mit allen möglichen modifizierten und unmodifizierten Peptiden zu erhalten. Bei diesen Modifikationen kann es sich beispielsweise um Acetylierungen, Methylierungen, Oxidation oder Umsetzungen mit speziellen Reagenzien handeln. Um ein Peptid anhand eines MS²-Spektrums zu identifizieren, wird zuerst eine Liste mit Peptidkandidaten erstellt, welche die geringste Abweichung in Bezug auf das m/z -Verhältnis des Vorläuferions besitzen. Danach werden für jeden Kandidaten die m/z -Verhältnisse aller theoretisch möglichen Fragmentationen mit den experimentell ermittelten m/z -Verhältnissen verglichen. Dies kann beispielweise über Kreuzkorrelation des experimentellen und theoretischen Spektrums erfolgen. Jeder Kandidat wird von den Algorithmen mit einer Punktwertung versehen (engl. *score*), welche besagt, wie gut die theoretischen Spektren der Kandidaten mit dem experimentellen Spektrum übereinstimmen. Der Kandidat mit der höchsten Punktwertung wird schließlich als Identifikation dem Peptid zugeordnet. Die so erhaltene Zuordnung von einem experimentellen Spektrum zu einem Datenbank-Peptid wird als „PSM“ bezeichnet (vgl. engl. „*peptide spectral match*“).

Die moderne „*bottom-up*“-Proteomik basiert somit auf dem Proteindatenbankabgleich und ermöglicht es, Peptide anhand von aufgenommenen MS²-Spektren zu identifizieren. Dabei können auch modifizierte Peptide identifiziert werden, wenn die Modifikation vor der Datenbanksuche als Möglichkeit an bestimmten Aminosäureresten angegeben wurde. Wenn die Modifikationsmasse an spezifischen Fragmentationen der Ionenserien gefunden wird, kann die Modifikation sogar auf die Aminosäure genau in der Sequenz lokalisiert werden. Nach der Peptididentifikation fassen die Algorithmen alle Peptide zusammen, welche nur einem einzigen Protein in der Datenbank zugeordnet werden können (engl. *unique peptide*), um aus den Peptiden die in der Probe vorkommenden Proteine zu identifizieren.

In heutzutage durchgeführten LC-ESI-MS/MS Proteomikanalysen werden oft Zehntausende MS²-Spektren pro Experiment aufgenommen. Um sicherzustellen, dass die Rate der falsch-positiven Identifikationen von Peptiden gering bleibt, setzen Algorithmen auf verschiedene statistische Methoden. Sehr häufig werden die experimentellen Spektren nicht nur mit den Kandidaten aus der gewählten Proteindatenbank verglichen, sondern auch mit einer „*Decoy*“-Datenbank. Diese wird beispielsweise durch das Umdrehen aller Peptidsequenzen der gewählten Proteindatenbank generiert und enthält damit beinahe ausschließlich Kandidatenpeptide, welche in der Realität nicht wirklich existieren. Durch den Vergleich, wie viele Peptide in der echten Datenbank und wie viele in der „*Decoy*“-Datenbank identifiziert werden, kann die Falscherkennungsrate (engl. *False Discovery Rate, FDR*) durch statistische Methoden geschätzt werden.^[77] Inzwischen werden auch Algorithmen eingesetzt, welche die

Falscherkennungsrate durch maschinelles Lernen abschätzen.^[78] Nur Peptididentifikationen, welche eine bestimmte Grenz-Punktewertung überschreiten, werden als validiert angesehen. Durch strikte Einhaltung dieses Prinzips sind trotz der sehr großen Anzahl an aufgenommenen MS²-Spektren robuste Peptididentifikationen möglich.

Mit den hier dargestellten Methoden der „*bottom-up*“-Proteomik ist es inzwischen möglich, sehr viele Proteine gleichzeitig mit hoher Sensitivität zu identifizieren. Dies wird besonders deutlich, wenn man den Versuch betrachtet, das humane Proteom in seiner Gesamtheit zu erfassen: in über 2000 MS-Experimenten wurden aus 30 humanen Zellproben eine enorme Anzahl von etwa 293000 nicht redundanten Peptiden mit hoher Sicherheit identifiziert.^[79] Mit diesen Peptiden wurden Proteine identifiziert, welche aus 84 % aller annotierten Protein-kodierenden Gene im Menschen stammen – eine erstaunliche Tiefe, welche zeigt, zu was die MS-basierte Proteomik fähig ist.

Dieses Kapitel hat aufgezeigt, welche instrumentellen Methoden der MS-basierten Proteomik inzwischen zur Verfügung stehen und wie diese verwendet werden können, um Peptide und Proteine mit hoher Sensitivität auch aus sehr komplexen Proben zu identifizieren. Mit dem Überblick über diese Methoden sollen nun in den nächsten beiden Kapiteln fortgeschrittene Techniken der Proteomik betrachtet werden: die Detektion von Protein-Protein-Crosslinks und die quantitative Proteomik.

3.2 Protein-Protein-Crosslinking

Zum Verständnis der hochkomplexen Abläufe innerhalb einer Zelle ist das Wissen über die darin vorkommenden Proteine allein nicht ausreichend. Vielmehr müssen zum Ergründen von biologischen Funktionen die Interaktionen zwischen Biomolekülen identifiziert und genauer erforscht werden. Es ist nicht überraschend, dass Proteine als Arbeitsmaschinen der Zelle sowohl Interaktionen mit DNA und RNA als auch untereinander eingehen, um ihre vielfältigen Funktionen auszuführen. Inzwischen wurde in einigen Arbeiten aufgezeigt, dass es möglich ist, Protein-DNA-Interaktionen beispielsweise durch quantitative Proteomik oder Labeltransfer zwischen DNA und Proteinen nachzuweisen.^[80-81]

Von mindestens ebenso großer Bedeutung sind jedoch die Interaktionen zwischen Proteinen. In fast ausnahmslos allen biologischen Prozessen liegen Proteine nicht isoliert, sondern in Form von Komplexen vor, um ihre Aufgaben zu erfüllen. Selbst wenn Proteine selbstständig arbeiten können, so interagieren sie häufig mit anderen Proteinen, beispielsweise um diese durch Modifikationen zu regulieren.^[82-83]

Protein-Protein-Interaktionen werden sehr oft indirekt durch Methoden wie das Hefe-Zwei-Hybrid-System, quantitative MS-Messungen oder Co-Immunopräzipitation nachgewiesen.^[84-87] Durch den indirekten Nachweis der Interaktionen entstehen jedoch einige Nachteile. So kann keine Aussage

darüber getroffen werden, ob eine direkte Interaktion der Proteine vorliegt, oder andere Proteine an der Wechselwirkung beteiligt sind. Zusätzlich werden schwache Interaktionen zwischen Proteinen oft nicht erfasst. Gerade bei Nutzung von Co-Immunopräzipitationen kommt es darüber hinaus häufig auch zur unspezifischen Bindung von Proteinen, welche dann fälschlicherweise als Interaktionspartner identifiziert werden können.

Zusätzlich zur reinen Kenntnis von Komplexpartnern ist auch ein Wissen über die räumliche Anordnung der Proteine innerhalb des Komplexes und die Struktur der einzelnen Interaktionspartner selbst Voraussetzung, um Funktionen detailliert aufklären zu können. Traditionelle Methoden zur hochauflösten Strukturaufklärung von Proteinen, wie NMR-Spektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse, benötigen jedoch recht hohe Konzentrationen an aufgereinigten Proteinen bzw. Proteinkomplexen, welche nicht immer zur Verfügung stehen.

Inzwischen besteht jedoch die Möglichkeit, sowohl niederaufgelöste Strukturen von Proteinen als auch den Aufbau von Proteinkomplexen durch massenspektrometrische Analysen zugänglich zu machen. Dies ist möglich, indem chemische Reagenzien, so genannte *Crosslinker*, zusammen mit den MS-Untersuchungen zum Einsatz kommen. In den folgenden Kapiteln soll dieses Prinzip von Crosslinking-MS (XL-MS) genauer erklärt und einige der bekannten Reagenzien vorgestellt werden.

3.2.1 Generelles Prinzip

Wie in vorangegangenen Kapiteln beschrieben, findet die „*bottom-up*“-Analyse auf der Ebene von enzymatisch erzeugten Peptiden statt. Nach dem Verdau sind diese Peptide jedoch komplett unabhängig voneinander und aus der MS-Analyse kann keine Aussage mehr über deren räumliche Position innerhalb einzelner Proteine oder Komplexe getroffen werden. Ziel von Crosslinking-MS ist es, diese Informationen vor dem Proteinverdau zu fixieren. Dazu kommen chemische Reagenzien zum Einsatz, welche mindestens an zwei Stellen mit Aminosäuren innerhalb von Proteinen reagieren können, wenn diese sich in räumlicher Nähe zueinander befinden. Dadurch werden die auf schwachen Wechselwirkungen basierenden Interaktionen durch kovalente Bindungen zwischen dem eingesetzten Crosslinker und den beteiligten Aminosäuren fixiert und bleiben auch nach dem proteolytischen Verdau der Proteine in Lösung erhalten. Abbildung 3.8 zeigt den typischen Ablauf eines solchen XL-MS-Experiments.

Sehr häufig wird das Crosslinking als erster Schritt *in vivo* durchgeführt, um Verluste von Interaktionen bei der Isolation der Proteine zu vermeiden. Hierbei ist es wichtig, die Zellpermeabilität der Crosslinking-Reagenzien zu berücksichtigen. Nach erfolgter Fixierung der Interaktionen wird noch vorhandenes, aktives Reagenz gequenchet, damit sich keine unspezifischen kovalenten Bindungen zwischen denaturierten Proteinen ausbilden können. Zu diesem Zeitpunkt kann der Erfolg der Crosslinking-Reaktion durch SDS-PAGE-Analyse abgeschätzt werden. Anschließend erfolgt der enzymatische Verdau der

Proteine, um die Peptide für die MS-Analyse zu erhalten. So ist es möglich, die Proteolyse im SDS-Polyacrylamidgel nach der SDS-PAGE-Analyse durchzuführen, um hochmolekulare, quervernetzte Proteinkomplexe von unmodifizierten, einzelnen Proteinen abzutrennen. Jedoch können hierbei häufig nicht alle Peptide aus dem Gel extrahiert werden und gehen so für die weitere Analyse verloren.

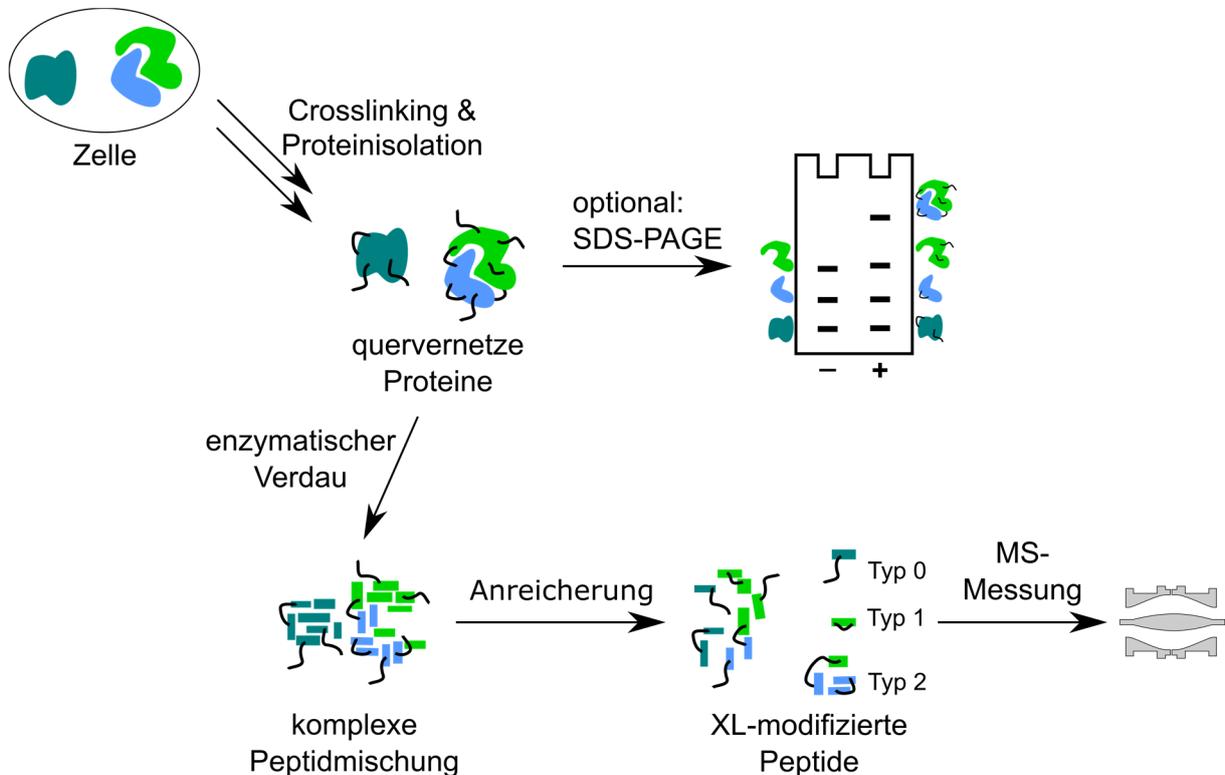


Abbildung 3.8: Übersicht über ein Crosslinking-Experiment. Häufig wird das Crosslinking wie hier dargestellt *in vivo* durchgeführt. Anschließend werden die Proteine isoliert und über SDS-PAGE kann der Erfolg der Crosslinking-Reaktion analysiert werden. Zur Vorbereitung der MS-Analyse werden die Proteine enzymatisch verdaut und die Crosslink-modifizierten Peptide werden aus der komplexen Peptidmischung angereichert. Es können drei Arten modifizierter Peptide vorliegen: Typ 0 Monolinks, Typ 1 *Looplinks* oder Typ 2 Intra- oder Inter-Protein-Crosslinks.

Dies kann durch Verwendung bestimmter Protokolle verbessert werden,^[88] aber dennoch wird der Proteinverdau meist in Lösung durchgeführt, um eine optimale Peptidausbeute zu erzielen. Da der Verdau durch die zusätzliche Quervernetzung der Proteine erschwert wird, können Kombinationen aus Proteasen, beispielsweise Trypsin zusammen mit Lys-C, eingesetzt werden, um die Verdaueffizienz zu steigern.^[89]

Resultat des Proteinverdaus ist eine hochkomplexe Mischung an unmodifizierten und modifizierten Peptiden. Je nach Resultat der Crosslinking-Reaktion wird bei den modifizierten Peptiden von verschiedenen Crosslink-Typen gesprochen (siehe Abbildung 3.8):^[90] bei Typ 2-Crosslinks sind zwei Peptide miteinander verbunden, sie können innerhalb eines Proteins (Intraprotein-XL) oder zwischen Proteinen (Interprotein-XL) auftreten. Vernetzt der Crosslinker zwei Seitenketten desselben Peptids, so handelt es sich um einen Typ 1-Crosslink (auch engl. „*looplink*“). Konnte die Reaktion des Crosslink-Reagenzes hingegen nur an einer Seite des Reagenzes stattfinden, so entsteht ein Monolink (Typ 0) als

Modifikation eines einzelnen Peptids. Zwar lassen Typ 0-Links keine Aussagen über Protein-Protein-Interaktionen zu, aber Informationen zur Oberflächenzugänglichkeit der Proteine können aus ihnen abgeleitet werden. Am informativsten sind Typ 2-Crosslinks, aus welchen sich nicht nur Protein-Protein-Interaktionen identifizieren lassen, sondern auch niederaufgelöste Strukturinformationen gewonnen werden können. Dies ist durch Protein-Modelling-Studien möglich, in welchen identifizierte Crosslinks dazu verwendet werden, eine obere Grenze der maximal möglichen Distanz zwischen den quervernetzten Aminosäureseitenketten zu liefern.^[91]

In vielen Fällen ist die erhaltene Peptidmischung zu komplex, um die sehr informativen, aber wenig abundanten Typ 2-Crosslinks robust identifizieren zu können. Deswegen ist es nötig, die Crosslinks vor der MS-Analyse anzureichern. Dazu können verschiedene Chromatographie-Methoden verwendet werden, welche die spezifischen Eigenschaften quervernetzter Peptide ausnutzen. Diese besitzen üblicherweise höhere Ladungszustände in Lösung und höhere Molekulargewichte als unmodifizierte, tryptische Peptide. Deswegen kommen sowohl Kationenaustausch- (engl. „*strong cation exchange*“, SCX) als auch Größenausschluss-Chromatographie (engl. „*size-exclusion chromatography*“, SEC) zum Einsatz, um Typ 2-Crosslinks anzureichern.^[89, 92-94] Noch spezifischer gelingt die Anreicherung, wenn das Crosslinking-Reagenz funktionelle Gruppen besitzt, welche durch Affinitätschromatographie aufgereinigt werden können. Hier werden häufig Biotin-Gruppen eingesetzt, welche durch eine starke Wechselwirkung an Streptavidin gebunden werden können.^[95] Auch andere Funktionalitäten werden verwendet, welche bioorthogonal modifiziert werden, um die Affinitätsgruppe erst nach erfolgter Crosslink-Reaktion einzuführen. Hier sind vor allem Alkin- und Azid-Gruppen zu nennen, welche durch kupferkatalysierte oder spannungs-induzierte Cycloadditionen selektiv mit Affinitätsgruppen konjugiert werden können.^[96-97] Auch eine Kopplung der Crosslinks an feste Trägermaterialien ist mit dieser Technologie möglich.^[98] Gerade in komplexen Proben ist das Durchführen einer Crosslink-Anreicherung entscheidend für die erfolgreiche Identifikation von quervernetzten Peptiden.

Nach der Anreicherung und der weiteren Probenpräparation folgt schließlich die MS-Analyse der quervernetzten Peptide. Allerdings ist die Auswertung der erhaltenen Daten mit einer besonderen Herausforderung verbunden: wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben erfolgt die Peptididentifikation heute in vielen Fällen nach dem „*bottom-up*“-Prinzip und basiert damit auf einem Datenbankabgleich. In den Datenbanken wird das m/z -Verhältnis des isolierten Vorläuferions dazu verwendet, eine Liste an theoretisch möglichen Peptidkandidaten zu erstellen, aus welcher der beste Kandidat anhand der gemessenen Fragmentionen ermittelt wird. Bei Crosslinks ist dies jedoch nicht ohne weiteres möglich, da die Masse des Vorläuferions sich aus den Massen beider quervernetzter Peptide und des Crosslinking-Reagenzes zusammensetzt. Um die Liste an Peptidkandidaten zu erstellen, müssen somit zusätzlich zur konstanten Masse des Crosslinkers alle möglichen Kombinationen zweier Peptide berücksichtigt werden – die

zu durchsuchende Größe der Datenbank quadriert sich. Im Falle von proteomweiten Untersuchungen und der damit verbundenen Verwendung von sehr großen Proteindatenbanken müssen sehr viele theoretische Crosslink-Kandidaten berücksichtigt werden, was zum einen lange Rechenzeiten erzeugt und zum anderen die Kontrolle der Falscherkennungsrate stark limitiert. Eine konservative Abschätzung von *Leitner et al.* erwartet, dass bei Verwendung einer humanen Datenbank etwa die 600000-fache Anzahl an Peptidkandidaten im Vergleich zu nicht-XL-Messungen berücksichtigt werden muss.^[99]

Bei Proben geringer Komplexität mit nur wenigen zu berücksichtigenden Proteinen ist es dennoch möglich, MS/MS-Experimente zur Identifikation der Crosslinks durchzuführen. Hierzu ist es notwendig, spezielle Software zu verwenden, welche in der Lage ist mit der durch das Crosslinking erweiterten Datenbank umzugehen und alle theoretisch möglichen Fragmentationen beider quervernetzter Peptide zu berücksichtigen. Soll die verwendete Software alle möglichen Peptidkombinationen überprüfen, ist dies beispielsweise durch die Verwendung modifizierter Algorithmen zum Bewerten der einzelnen Crosslink-Kandidaten möglich.^[100] Weitere Softwarepakete, wie zum Beispiel das 2015 von *Götze et al.* veröffentlichte Programm *MeroX*, verfolgen eine andere Strategie: von allen möglichen Peptidpaar-Kombinationen werden durch geschicktes Anordnen aller Kandidaten der Masse nach nur diejenigen in Betracht gezogen, welche zusammengenommen eine ähnliche Masse wie die des gemessenen Crosslinks besitzen.^[101] Somit wird die Anzahl der zu betrachtenden Peptid-Kandidaten deutlich reduziert. Als Beispiel nennen *Götze et al.* einen Fall, in welchem die Software einen Crosslink aus 60 möglichen Peptiden heraus identifizieren soll. Anstatt 3600 (60^2) mögliche Kombinationen zu untersuchen, reicht es dem Algorithmus in diesem Fall aus, lediglich 89 Kombinationen zu evaluieren, um die möglichen Peptid-Kandidatenpaare zu identifizieren. Zur Analyse wenig komplexer Proben, welche oft auf dem Bereich des strukturellen Crosslinkings stammen, bei welchem nur einzelne Proteine oder definierte Komplexe betrachtet werden, stehen neben dem genannten Beispiel noch viele weitere Softwarepakete zur Verfügung.^[102-104]

Selbst mit diesen Softwarepaketen ist es jedoch nicht möglich, Protein-Protein-Interaktionen aus komplexen Proben nachzuweisen, bei denen die gesamte, unbegrenzte Protein-Datenbank durchsucht werden muss. Um dies zu ermöglichen, bedarf es der Verwendung von speziellen Crosslink-Reagenzien, welche in der Gasphase innerhalb des Massenspektrometers bei niedrigen Energien gespalten werden können. Wenn die Energie zur Spaltung des Crosslinkers unterhalb der Peptidfragmentierungsenergien liegt, so können mit Verwendung dieser massespaltbaren Crosslinker MS³-Experimente durchgeführt werden (siehe Abbildung 3.9).

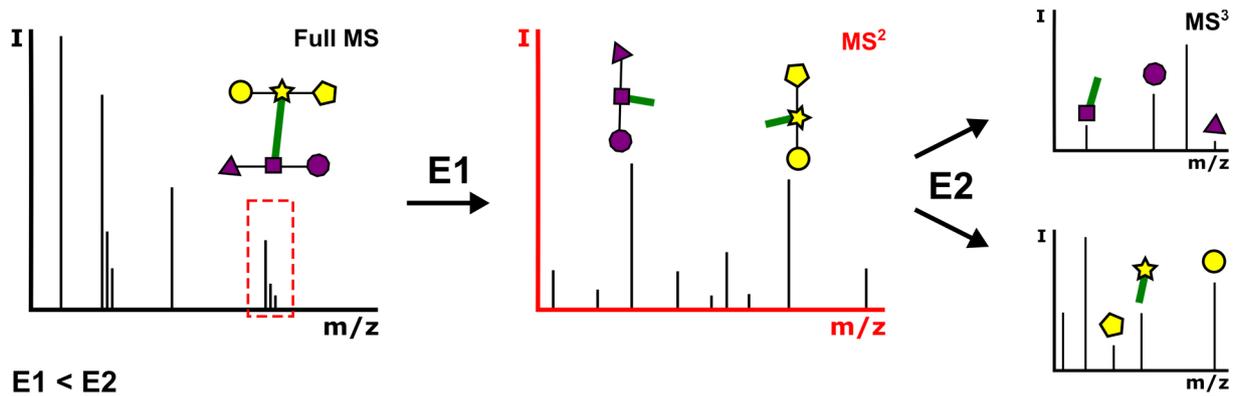


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung eines MS³-Experiments zur Crosslinker-Identifikation. Im MS¹-Scan wird zunächst die gesamte Masse der quervernetzten Peptide inklusive Crosslinker (grün) erfasst. Bei einer niedrigen Energie E1 wird anschließend nur der Crosslinker fragmentiert, um die beiden Massen der separierten Peptide im MS²-Scan zugänglich zu machen. Diese Peptide können nun wie in der *bottom-up*-Methode üblich nacheinander isoliert und bei einer höheren Energie E2 fragmentiert werden, um die Peptide im MS³-Scan zu identifizieren. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung von Isotopenmustern in MSⁿ-Scans (n>1) verzichtet.

Nach Bestimmung der intakten Crosslink-Masse im MS¹-Scan wird das Vorläuferion isoliert und bei so geringer Energie fragmentiert, dass hauptsächlich der Crosslinker gespalten wird, die Peptide aber weitgehend intakt bleiben. Somit werden die beiden quervernetzten Peptide separiert und können anschließend sequenziell isoliert und bei höherer Energie fragmentiert werden, um MS³-Spektren der einzelnen Peptid-Fragmentationen zu erhalten. Da so die individuellen Peptid-Massen im MS²-Scan erfasst werden, kann eine normale Datenbanksuche für die beiden einzelnen Peptide durchgeführt werden, wie sie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben wurde. Damit ermöglichen MS³-Experimente, die Datenkomplexität von Protein-Protein-Crosslinking massiv zu reduzieren.

Um proteomweite Protein-Protein-Interaktionen zu erfassen, ist es somit notwendig, MS³-Experimente durchzuführen. Allerdings bedarf dies komplexerer Instrumentation, weswegen nicht alle Massenspektrometer zur Identifikation von Crosslinks gleichermaßen geeignet sind. So muss das Massenspektrometer über eine Ionenfalle verfügen, um die MS³-Isolation und Fragmentierung durchführen zu können. Damit auch Geräte ohne Ionenfalle zur Analyse komplexer Crosslink-Proben verwendet werden können, beispielsweise *Q Exactive*-Instrumente, kann man auf eine *pseudo-MS³*-Messmethode zurückgreifen, welche in Abbildung 3.10 beschrieben ist.

Hier werden wie bei der normalen MS³-Methode in einem ersten Schritt die Massen der intakten Crosslinks bestimmt. Danach erfolgt jedoch keine Isolation einzelner Ionen, sondern eine Fragmentierung aller vorhandenen Ionen in der Quelle des Massenspektrometers. Dies wird durch das Anlegen einer geringen, zusätzlichen Spannung innerhalb der Quelle realisiert. Da in dieser Region noch ein vergleichsweise hoher Druck von einigen mbar Stickstoff herrscht, reicht diese zusätzliche Spannung aus, um eine kollisionsinduzierte Fragmentierung der Ionen auszulösen, weswegen diese Fragmentierungsmethode als *in-source* CID bezeichnet wird.^[105] Wird die Spannung richtig gewählt, kommt es

auch in dieser Methode zur bevorzugten Fragmentierung der labilen Crosslinker-Bindungen, so dass die Peptide auch durch diese Methode intakt separiert werden können. Mit angelegter Spannung wird so ein zweites MS¹-Spektrum erhalten, welchem die individuellen Peptidmassen entnommen werden können (*pseudo*-MS²-Scan).

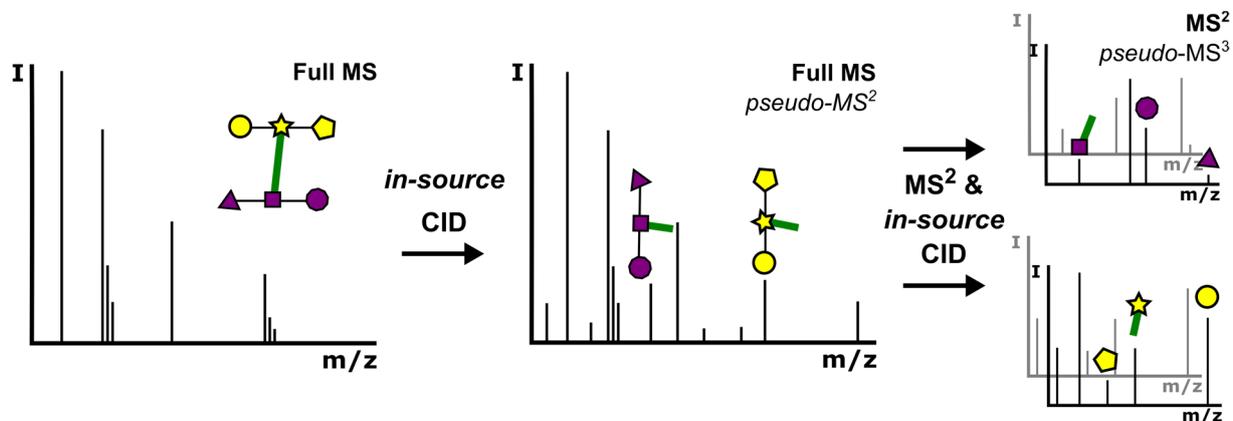


Abbildung 3.10: pseudo-MS³-Methode zur Identifikation von Crosslinks auf Massenspektrometern ohne Ionenfalle. Wie bei der MS³-Methode wird in einem ersten MS-Scan die intakte Masse der quervernetzten Peptide inklusive Crosslinker gemessen. Durch Anlegen einer Spannung innerhalb der MS-Quelle kommt es anschließend zur Fragmentierung des labilen Crosslinkers durch *in-source* CID und zur Separation der Peptide. Es folgen MS²-Messungen zur Peptididentifikation, während die Spannung weiterhin aufrechterhalten wird. Formal resultiert dies in der Aufnahme von *pseudo*-MS³-Spektren.

Anschließend erfolgt die Aufnahme von MS²-Spektren, wobei die Spannung aktiv bleibt und somit *in-source* CID in Kombination mit MS² durchgeführt wird, was formal in *pseudo*-MS³ resultiert. Zusammengefasst werden die intakte Crosslink-Masse im ersten Full-Scan, die individuellen Peptidmassen im zweiten Scan mit *in-source* CID und die Fragmentionen-Massen in einem MS/MS-Scan mit *in-source* CID bestimmt. Auch hier erfolgt die Peptididentifikation durch eine normale Datenbanksuche, die Zuordnung der einzelnen Peptide zu einem Crosslink erfolgt durch Vergleich des ersten MS-Scans mit dem *pseudo*-MS²-Scan.

Mit dieser Methode war es durch den Einsatz spaltbarer Crosslinker möglich, zusammen mit Cryo-EM die Struktur eines *CRISPR RNA Silencing*-Komplexes aufzuklären.^[106] Die *pseudo*-MS³-Methode besitzt jedoch auch erhebliche Limitationen: durch die fehlende Gasphasenisolation des Crosslinkers vor Separation der einzelnen Peptide ist der *pseudo*-MS²-Scan sehr komplex und alle gleichzeitig eluierenden Ionenspezies werden erfasst, was die Robustheit der Crosslink-Identifikation stark beeinträchtigt. Außerdem handelt es sich bei *in-source* CID um keine sehr spezifische Fragmentierungsmethode, da es durch den relativ hohen Druck und noch vorhandene Solventreste zu sehr komplizierten Fragmentierungen kommen kann. Dies mindert die Sensitivität im Vergleich zu normalen MS³-Methoden, was gerade bei der Analyse von weniger abundanten Crosslinks wichtig ist.

Die Messmethoden zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen haben sich ebenso wie die zur Analyse zur Verfügung stehende Softwarelösungen in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt.

Die zum Einsatz kommenden spaltbaren Crosslinking-Reagenzien wurden ebenfalls variiert und für verschiedene Experimente spezifisch angepasst. Im folgenden Abschnitt soll auf das allgemeine Design von Crosslinkern eingegangen und einige bereits bekannte Crosslinker sollen vorgestellt werden.

3.2.2 Design der Reagenzien

Wie bereits erläutert, ist die chemische Fixierung schwacher Wechselwirkungen entscheidend für das Aufklären von Proteinstrukturen und die Identifikation von Interaktionspartnern. Hierfür werden maßgeschneiderte Crosslinking-Reagenzien benötigt, welche bestimmte Anforderungen erfüllen müssen, um die MS-Experimente möglichst effizient durchführen zu können.

Abbildung 3.11 zeigt den schematischen Aufbau von Crosslinking-Reagenzien. Üblicherweise besteht ein Crosslinker aus mindestens zwei reaktiven Gruppen, welche durch einen sog. *Spacer* verbunden sind. Auf die einzelnen Bestandteile und die damit verbundenen Eigenschaften der kompletten Reagenzien soll nun kurz eingegangen werden.

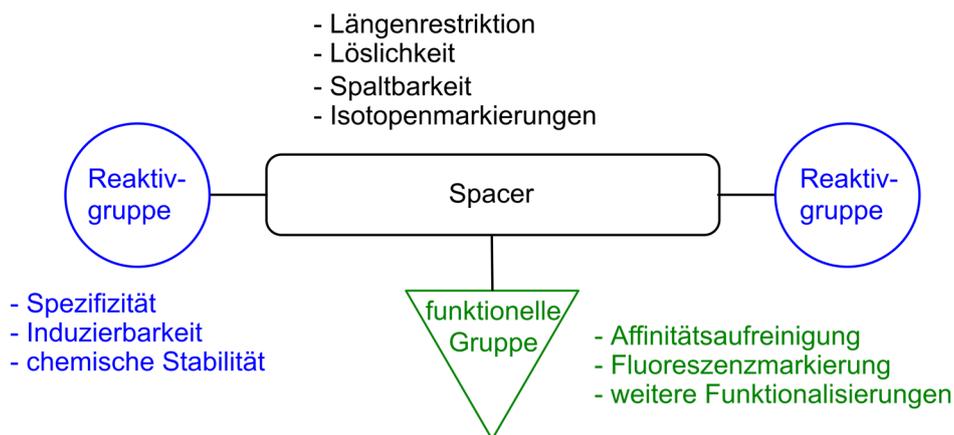


Abbildung 3.11: Schematischer Aufbau von Crosslinking Reagenzien. Dargestellt sind die Reaktivgruppen in blau, die *Spacerregion* in schwarz und eine optionale funktionelle Gruppe in grün. Modifiziert nach ^[107].

Zur kovalenten Reaktion mit den Peptiden werden verschiedene Reaktivgruppen verwendet, welche mit den diversen Funktionalitäten der Aminosäureseitenketten reagieren können. Wird zweimal die gleiche Reaktivgruppe verwendet, spricht man von homo-bi-funktionalen Crosslinkern, bei zwei unterschiedlichen Reaktivgruppen von hetero-bi-funktionalen Reagenzien. Am häufigsten werden für Crosslinking-Reagenzien aminreaktive NHS-Ester verwendet, welche bevorzugt mit den Protein-N-Termini und den Lysin-Seitenketten reagieren. In geringerem Umfang können, je nach pH-Wert während des Crosslinkings und der räumlichen Nähe zu anderen Aminosäuren, auch Reaktionen mit den Hydroxy-Funktionalitäten von Serin, Threonin und Tyrosin beobachtet werden.^[108] Ein Vorteil des Einsatzes von NHS-Estern ist das relativ hohe Vorkommen an Lysinen in Proteinen, wodurch viele reaktive Stellen für

die Crosslinking-Reaktion zwischen Proteinen zur Verfügung stehen. Allerdings sind NHS-Ester hydrolyseempfindlich und die Bildung von Typ 0 Monolinks ist damit unumgebar, was zu einem signifikanten Anteil an teils ungewollten Nebenreaktionen führt und die Abundanz quervernetzter Peptide verringert. Soll die Zellpermeabilität für das Crosslinking von Zelloberflächenproteinen verringert und die Wasserlöslichkeit der Crosslinker erhöht werden, so kommen Sulfo-NHS-Ester zum Einsatz.

Mit den Thiolen von Cystein-Seitenketten gibt es eine weitere Funktionalität, welche sehr spezifisch adressiert werden kann. Dazu werden vor allem Iodacetamide und Maleimide verwendet, welche über nukleophile Reaktionen stabile kovalente Thioether ausbilden. Die Hydrolyse der Reaktivgruppen ist hierbei ein geringeres Problem, was dazu führt, dass nur äußerst wenige Typ 0 Monolinks erhalten werden. Die Verwendung von Thiol-Reaktivgruppen wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass Cysteine sehr oft in Disulfidbrücken gebunden oder unzugänglich im Inneren von Proteinen vorliegen und somit nicht zur Reaktion gebracht werden können.

Hydrazinderivate können in Verbindung mit Aktivatoren wie DMTMM dazu verwendet werden, um Säurefunktionen in Glutaminsäure und Asparaginsäure zur Reaktion zu bringen.^[109] Allerdings ist es durch die Aktivierung der Säuregruppen auch möglich, dass zusätzliche Reaktionen mit Aminfunktionalitäten stattfinden.

Unspezifischer reagieren dahingegen photoreaktive Crosslinker, beispielsweise Diazirine oder Benzophenone, welche durch Erzeugung aktiver Radikalspezies nach Irradiation mit UV-Licht mit vielen unterschiedlichen Aminosäuren reagieren können.^[110-111] Zwar ist der Zeitpunkt der Reaktion frei durch die Bestrahlung bestimmbar, allerdings wird die Analyse der entstehenden Crosslinks durch die fehlende Spezifität stark erschwert.

Reaktivgruppen werden üblicherweise durch die *Spacerregion* verbunden. Durch diesen Bereich erhält das Crosslinking-Reagenz eine definierte Länge und eine bestimmte Rigidität, was gerade für strukturelles Crosslinking wichtig ist. Hier sind kürzere Crosslinker mit *Spacerlängen* zwischen acht und 15 Å interessant, welche die sinnvollsten Informationen für Strukturmodellierung liefern.^[112] Zusätzlich bietet die *Spacerregion* die Möglichkeit zur Einführung von Isotopenmarkierungen. Wird eine Mischung von markierten und unmarkierten Crosslinking-Reagenzien verwendet, so entstehen im MS¹-Spektrum spezifische Dubletts, was die Detektion der Crosslinks erleichtert.^[113] Auch allgemeine Eigenschaften des Crosslinkers wie die Löslichkeit können durch Modifikation der *Spacerregion* bewerkstelligt werden. Erwähnenswert sind auch Reagenzien, welche komplett auf das Vorhandensein eines *Spacers* verzichten. Diese „*zero-length*“-Crosslinker verknüpfen Aminfunktionalitäten direkt mit säurehaltigen Peptidseitenketten. Als „Crosslinker“ kommen hier häufig Carbodiimide zum Einsatz.^[114]

Wie weiter oben beschrieben ist es zur Analyse komplexer Crosslinking-Proben besonders wichtig, die Reagenzien in der Gasphase bei niedrigen Energien zur Separation der intakten Peptide spalten zu können. Hierfür müssen bestimmte, massespaltbare Gruppen im Reagenz vorkommen. Da sich die Bruchstelle zwischen den Peptiden befinden muss, wird diese üblicherweise in den *Spacer* des Crosslinkers eingebaut. Für den Ablauf der Spaltung gibt es im Wesentlichen zwei Möglichkeiten, welche in Abbildung 3.12 aufgezeigt sind: die Fragmentierung kann entweder asymmetrisch in nur eine Richtung erfolgen (Abbildung 3.12A), oder sie ist symmetrisch in beide Richtungen möglich (Abbildung 3.12B). Durch den spiegelbildlichen Einbau zweier asymmetrischer Bruchstellen kann ebenfalls eine symmetrische Fragmentierung erzeugt werden.

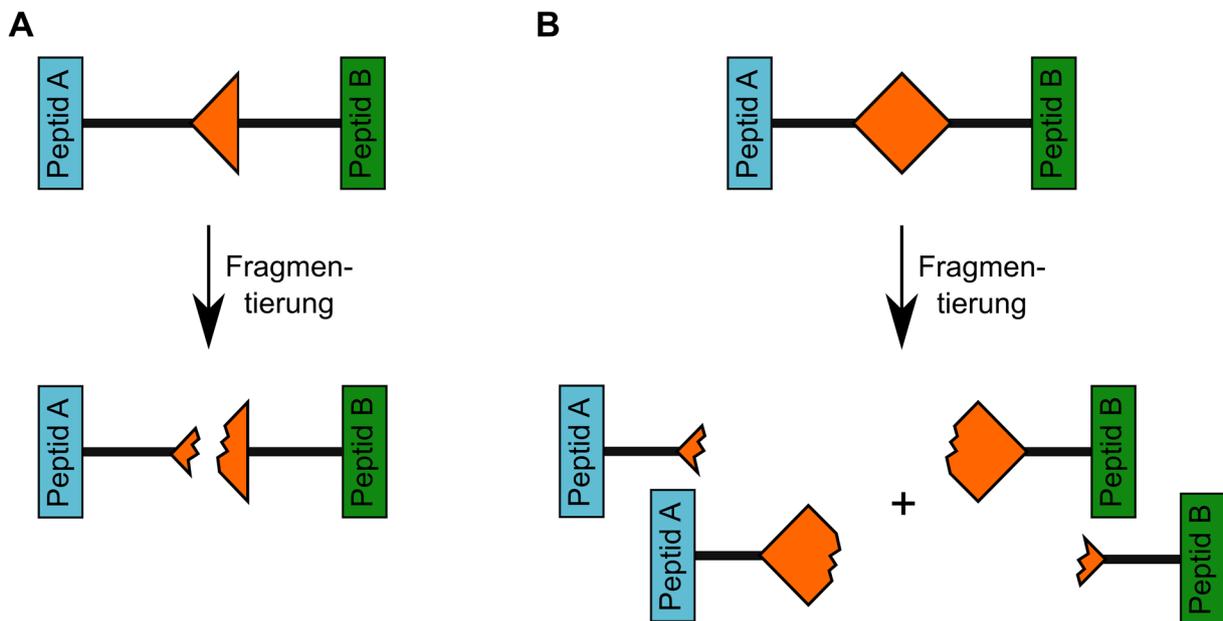


Abbildung 3.12: Übersicht über das mögliche Fragmentierungsverhalten von Crosslinkern. A) Beispiel für eine asymmetrische Fragmentierung. Die Peptide A und B tragen nach Spaltung des Crosslinkers (orange) verschiedene Modifikationen, da die Spaltung nur in eine bestimmte Richtung ablaufen kann. So entsteht pro Peptid eine bestimmte Spezies. B) Beispiel für eine symmetrische Fragmentierung. Da der Crosslinker hier in beide Richtungen fragmentieren kann, kommt es zur Bildung von je zwei Spezies pro Peptid. Dies resultiert in spezifischen Massenpaaren im MS^1 -Spektrum, da der Unterschied zwischen den modifizierten Peptidmassen nur von den Crosslinkerfragmenten abhängt und peptidunabhängig ist.

Die Strukturen einiger Crosslinker sind in Abbildung 3.13A dargestellt. Zunächst wurden Reagenzien entwickelt, welche an einer einzelnen Stelle asymmetrisch in der Gasphase fragmentieren können, wie beispielsweise das SuDP-Reagenz oder der Edman-Linker (auch als BuTuGPG-Linker bezeichnet).^[115-116] Beide Reagenzien bedienen sich hier der präferentiellen Spaltung einer Prolyl-Peptidbindung, vermittelt durch die intramolekulare Reaktion mit einem Aspartat-Rest im Falle von SuDP und einer Thioharnstoff-Gruppe im Falle des Edman-Linkers. Somit tragen die gespaltenen Peptide jeweils eine fixe Modifikation, welche aus der asymmetrischen Spaltung des Crosslinkers resultiert.

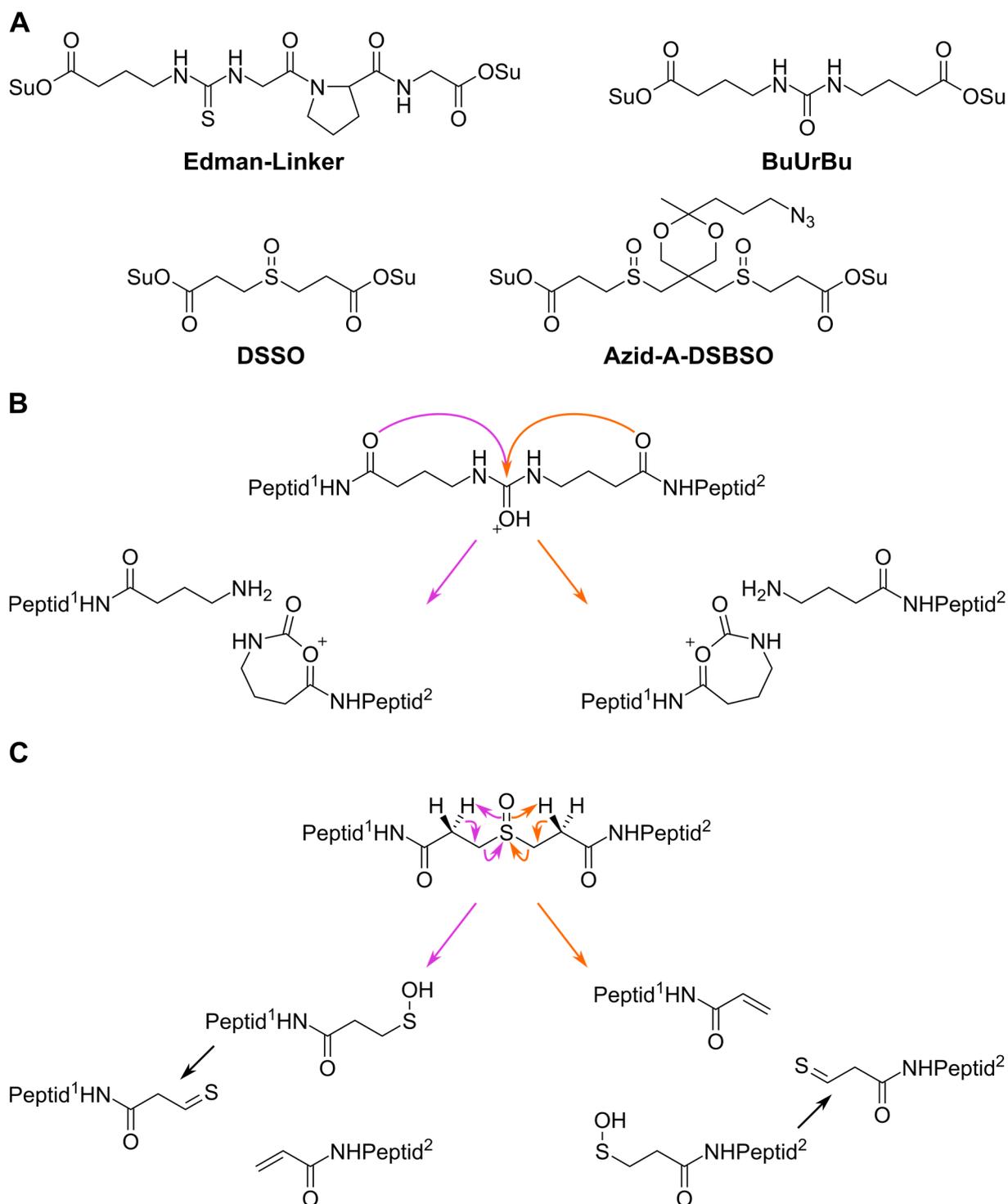


Abbildung 3.13: Übersicht über einige Crosslinking-Reagenzien und Fragmentierungsmuster in der Gasphase. A) Strukturen von erwähnten Crosslinkern. Der Edman-Linker gehört zur Klasse der asymmetrisch spaltbaren Crosslinker, bei BuUrBu und DSSO hingegen handelt es sich um symmetrisch brechende Crosslinker. Azid-A-DSBSO ist ein Beispiel für eine modifizierte DSSO-Struktur. B) Fragmentierung von BuUrBu-quervernetzten Peptiden in der Gasphase. Für jedes Peptid kann sich ein Amin- und ein geladenes Carbamat-Fragment ausbilden. Die zwei verschiedenen Fragmentierungsrichtungen sind durch schwarze und graue Pfeile dargestellt. Modifiziert nach ^[117]. C) Gasphasenfragmentierung von DSSO-quervernetzten Peptiden. Hier bildet sich pro Peptid zunächst ein Alken- und ein Sulfensäurefragment, wobei Letzteres weiter zu einem Thial zerfallen kann.

Die andere Art der Reagenzien enthält massespaltbare Gruppen, welche symmetrisch in beide Richtungen fragmentieren können. Zu nennen ist hier beispielsweise der BuUrBu-Crosslinker, welcher eine

Harnstoff-Gruppe enthält.^[117] Die Fragmentierung ist in Abbildung 3.13B aufgezeigt. Nach Aktivierung in der Gasphase können die Sauerstoffatome der δ -ständigen Amidgruppen nukleophil an den Carboxylkohlenstoff des Harnstoffs angreifen, was unter Ausbildung eines Amins und eines cyclischen Carbamats zur Spaltung der Peptide führt. Da die Fragmentierung je nach Protonierungszustand in beide Richtungen ablaufen kann, werden beide separierten Peptide mit jeweils beiden möglichen Modifikationen, dem Amin oder dem Carbamat, gebildet.

Bei DSSO (Disuccinimidylsulfoxid) handelt es sich ebenfalls um einen weit verbreiteten Vertreter dieser Art von Crosslinkern (siehe Abbildung 3.13C).^[118] Als symmetrisch fragmentierende Gruppe kommt hier ein Sulfoxid zum Einsatz. Dieses kann nach der Aktivierung in einer pericyclischen Reaktion vorhandene β -Wasserstoffatome abstrahieren, wodurch ein Alken- und ein Sulfensäurefragment gebildet werden. Häufig kommt es während der Fragmentierung des Crosslinkers zu einem weiteren Zerfall des Sulfensäurefragmentes, welches unter Wasserabspaltung in einem Thioaldehyd bzw. nach Tautomerisierung in einem ungesättigten Thiol resultiert.

Bei den symmetrisch spaltenden Crosslinkern werden die separierten Peptide jeweils mit zwei möglichen Modifikationen gebildet. Dies führt zum Auftreten spezifischer Dubletts im Massenspektrum, welche sich in ihrer Masse um einen festen, von der Fragmentierung hervorgerufenen Wert unterscheiden (siehe Abbildung 3.12B). Mit Hilfe dieser Dubletts ist es möglich, sowohl die Anzahl an aufgenommenen Massenspektren zu reduzieren als auch die Crosslink-Identifikation zu verbessern, was nun erläutert wird.

Wie bereits erwähnt ist es zur Analyse komplexer Crosslinking-Proben notwendig, MS^3 -Messungen durchzuführen. Die zusätzliche Gasphasenisolation und Fragmentierung der separierten Peptide führt jedoch dazu, dass ein kompletter Scanzzyklus mehr Zeit benötigt als normale MS^2 -Messungen. Dadurch können weniger Peptide identifiziert werden. Bei der Verwendung symmetrisch spaltbarer Crosslinker ist es nun möglich, die MS^3 -Fragmentierungen nur dann durchzuführen, wenn ein Dublett mit spezifischer Massendifferenz im MS^2 -Scan nach Separation der Peptide detektiert wird (siehe Abbildung 3.14). So können die beiden Peptid-Dubletts spezifisch selektiert und fragmentiert werden. MS^3 -Scans werden deswegen nur dann aufgenommen, wenn die Peptidsignale im MS^2 -Spektrum auch vom Crosslinker-stammende Modifikationen besitzen, die Aufnahme unnützer MS^3 -Spektren wird vermieden.

Auch bei der softwarebasierten Datenanalyse hilft das Auftreten der Dubletts. Diese Dubletts werden anhand der spezifischen Massendifferenz (Δm) zwischen den beiden möglichen Crosslink-Fragmentierungsmodifikationen identifiziert und müssen deswegen durch ein Peptid erzeugt worden sein, welches durch die Crosslinker-Fragmentierung von dem quervernetzten Peptid separiert wurde. Da die

Massen dieser Modifikationen konstant sind, kann über die Masse der Signale recht einfach die Masse des intakten, unmodifizierten Peptids errechnet werden.^[119]

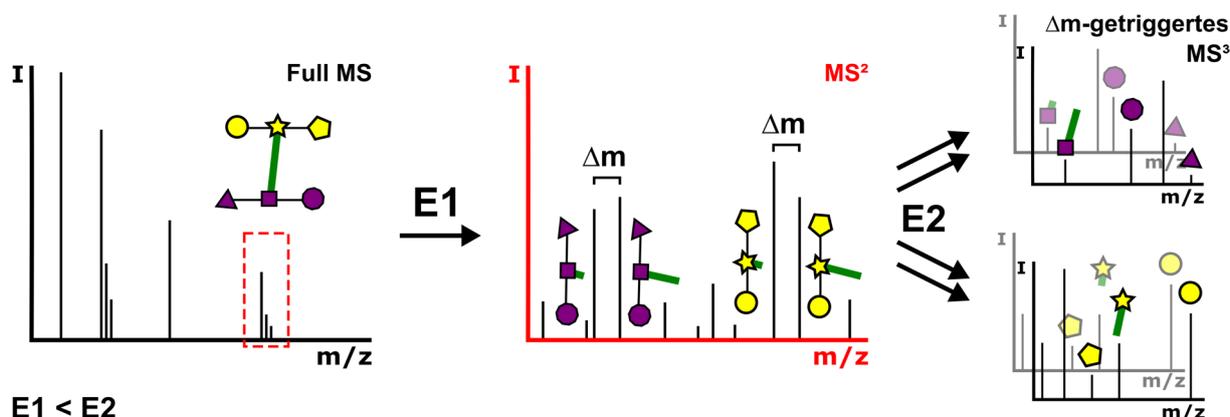


Abbildung 3.14: MS³-Experimente mit symmetrisch spaltbaren Crosslinkern. Da die Fragmentierung des Crosslinkers in zwei Richtungen erfolgen kann, bilden sich im MS²-Spektrum zwei Massenpaare mit einem fixen Massenunterschied Δm aus. MS³-Spektren werden nun nur von den Ionen aufgenommen, welche in den spezifischen Dublett-Signalen vorkommen. Die zeitaufwändige Analyse weiterer Ionen, bei welchen es sich nicht um die separierten Peptide handelt, entfällt dadurch.

Dies macht die Peptididentifikation in MS³-Experimenten robuster und verbessert die Crosslink-Identifikation in MS²-Experimenten, da in diesen die Massen der einzelnen Peptide ohne das Auftreten der Dubletts nicht bekannt wären. Der Suchraum für die Datenbankanalyse kann damit eingeschränkt werden.

Mit Hilfe dieser Methoden ist es heute möglich, durch extensive Probenfraktionierung einige Tausend Protein-Protein-Interaktionen innerhalb von humanen Zellen nachzuweisen. *Liu et al.* setzten DSSO als Crosslinker ein und konnten mit einer Kombination von MS³-Experimenten, dem zusätzlichen Einsatz von ETD-Fragmentierungen zur Generierung von komplementären Fragmentationen und der Berücksichtigung der spezifischen Massepaare sowie von intensiven Signalen zur Peptididentifikation in *HeLa*-Lysaten 3301 Crosslinks nachweisen.^[119]

Inzwischen wurden auch schon komplexere, spaltbare Crosslinker synthetisiert, mit welchen auch die Anreicherung der wenig abundanten Crosslinks möglich ist. So wurde bereits 2010 von *Tang et al.* das Prinzip der Protein-Interaktionsreporter-Reagenzien (PIR) vorgestellt, in welchem zwei massespaltbare Gruppen und eine Biotin-Funktionalität zur Anreicherung enthalten sind.^[120] DSSO wurde ebenfalls weiterentwickelt, indem andere Reaktivgruppen zum Einsatz kamen,^[109] Isotopenmarkierungen eingeführt,^[121] oder Gruppen zur Affinitätsanreicherung hinzugefügt wurden (siehe DSBSO, Abbildung 3.13A).^[97] Obwohl die Reagenzien modifiziert wurden, kam es bis jetzt häufig nur zu *proof-of-principle*-Demonstrationen, da die modifizierten Moleküle die Experimente durch höhere Komplexität erschweren. Neue, weiter modifizierte Reagenzien sowie die stattfindende Weiterentwicklung der MS-Methoden und Auswertalgorithmen sollten dazu führen, dass Crosslinking noch sehr viel breiter im Feld der

Proteomik eingesetzt wird, um einen noch größeren Teil der Protein-Protein-Interaktionen identifizieren zu können.

3.3 Quantitative Proteomik durch Isobarenmarkierung

Um biologische Prozesse detailliert verstehen zu können, ist es meistens nicht ausreichend, Informationen zu nur einem Proteom zu erhalten. Vielmehr müssen zur Aufklärung zellulärer Prozesse mehrere Proteome miteinander verglichen werden, um Aussagen über die relative Abundanz der Proteine zwischen verschiedenen Zellzuständen zu erhalten. Bei der Massenspektrometrie handelt es sich allerdings prinzipiell um eine intrinsisch nicht quantitative Methode, da Unterschiede bei der Ionisationseffizienz der Analyten dazu führen, dass Signalintensitäten nicht direkt miteinander verglichen werden können. Deswegen wurden Methoden entwickelt, welche dennoch eine meist relative Quantifizierung von Analyten zwischen Proben und in besonderen Fällen sogar die absolute Quantifizierung erlauben. In den nächsten Abschnitten soll ein kurzer Überblick über diese Methoden gegeben werden, um dann im Besonderen auf die Isobarenmarkierung von Peptiden einzugehen.

Bei der markierungsfreien Quantifizierung (engl. *label-free quantification, LFQ*) handelt es sich um eine der am häufigsten verwendeten Quantifizierungsmethoden in der Proteomik, bei welcher komplett auf eine Markierung der Peptide verzichtet wird. Als Grundlage dieser Methode dienen die Signalintensitäten der intakten Peptide in den MS^1 -Spektren, welche jeweils über deren gesamte Retentionszeit zusammengefasst werden. Unter der Annahme, dass die Bedingungen während der Elution der jeweiligen Peptide zwischen den Proben nahezu identisch sind, können die Integrale der Peptidsignale direkt miteinander verglichen werden, aus welchen sich auch die relativen Verhältnisse der jeweiligen Proteine ergeben.^[122-123] Um diese Art der Quantifizierung anzuwenden, werden die zu vergleichenden Proben nacheinander gemessen. Dies geschieht üblicherweise mit mehreren Replikaten pro Probe, um die Ergebnisse der Quantifizierung mit statistischen Methoden validieren zu können. Zwar ist es mit dieser Methode möglich, ohne weitere Probenvorbereitung viele verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, allerdings wird hierfür auch sehr viel Messzeit benötigt. Des Weiteren sind die Variationskoeffizienten der so bestimmten Proteinverhältnisse mit etwa 20 % oft recht hoch und wenig abundante Proteine können noch unpräziser quantifiziert werden.^[123] Zusätzlich kommt es häufig dazu, dass nicht alle Peptide in allen Messungen detektiert werden können. Dies führt zu „fehlenden Werten“ (engl. *missing values*), wodurch nicht alle Peptide relativ zueinander quantifiziert werden können.

Für eine robustere Quantifizierung werden Methoden verwendet, welche Isotopenmarkierungen zur Unterscheidung der jeweiligen Proben verwenden. Dies wird beispielsweise bei SILAC eingesetzt, der stabilen Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in der Zellkultur (engl. *Stable Isotope Labelling by*

Amino acids in Cell culture).^[124-125] Die zu vergleichenden Proben werden hierbei in der Zellkultur mit unterschiedlichen Nährböden inkubiert, welche sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden. Während ein Medium nur natürliche Aminosäuren enthält, werden in den anderen Medien teilweise schwere Isotopologe der Aminosäuren verwendet, häufig $^{13}\text{C}_6$ -markiertes Arginin und Lysin. Diese Aminosäuren werden während der Proteinbiosynthese in die Proteine der Zellen eingebaut, wodurch diese markiert sind und sich deren Herkunft nachverfolgen lässt. Zur massenspektrometrischen Analyse werden die zu vergleichenden Zellen kombiniert, gemeinsam für die Analyse vorbereitet und schließlich gemessen. In den MS^1 -Spektren ergeben sich nun Dubletts der Peptidsignale, welche aus dem spezifischen Massenunterschied zwischen der natürlichen und der schwereren, isotopologen Aminosäure hervorgehen. Dadurch ist es möglich, die relative Quantifizierung auf dem MS^1 -Level in derselben Messung durchzuführen, indem die Intensitäten der Dublettsignale direkt miteinander verglichen werden. Durch die Kombination der zu vergleichenden Proben ergeben sich mehrere Vorteile: durch die gemeinsame Probenvorbereitung ist die Quantifizierung robuster, die benötigte Messzeit zur Quantifizierung wird reduziert und es kommt im Gegensatz zur markierungsfreien Quantifizierung nicht zu „fehlenden Werten“, da die Quantifizierung in einem gemeinsamen MS^1 -Spektrum erfolgt.^[126] Die Analyse mehrerer Proben gleichzeitig in einer Messung wird als *Multiplexing* bezeichnet.

Allerdings können – mit wenigen Ausnahmen – nur Proben aus Zellkulturen über SILAC quantifiziert werden. Um diese Limitation zu umgehen, wurden auch Methoden entwickelt, bei welchen die Proteine erst nach der Isolation *in vitro* markiert werden. Hier kommen zum Beispiel die Cystein-reaktiven ICAT-Reagenzien (engl. *isotope-coded affinity tags*) zum Einsatz, welche zusätzlich zu einer variablen, die Isotopenmarkierungen enthaltenden Linkerregion noch über eine Biotin-Gruppe zur Affinitätsanreicherung der markierten Peptide verfügen.^[127] Durch die Kombination von Proben, welche entweder mit leichten oder schweren ICAT-Labeln markiert wurden, kann die Quantifizierung auch hier im MS^1 -Spektrum anhand der entstehenden Dubletts erfolgen. Nach dem gleichen Prinzip ist auch die absolute Quantifizierung (engl. *absolute quantification, AQUA*) von Proteinen möglich, wenn isotopenmarkierte Peptidstandards in bekannten Mengen nach der Proteinisolation zur Probe hinzugegeben werden.

Ein gemeinsamer Nachteil dieser Quantifizierungsmethoden, welche auf Bildung von mehreren Signalen im MS^1 -Spektrum basieren, ist die Entstehung eines komplexeren MS^1 -Spektrums. Für jede zusätzliche Probe, welche verglichen werden soll, ist ein weiteres Signal im MS^1 -Spektrum notwendig, weswegen üblicherweise nur wenige Proben in einem Experiment verglichen werden können, bevor das MS^1 -Spektrum zu komplex wird.^[126]

Aus diesem Grund wird häufig eine andere Methode verwendet, bei welcher die Quantifizierung nicht auf dem MS^1 -, sondern auf dem MS^2 -Level stattfindet. Im folgenden Abschnitt soll diese Methode, welche als Isobarenmarkierung (engl. *isobaric labeling*) bezeichnet wird, vorgestellt werden.

3.3.1 Grundprinzip der Isobarenmarkierung

Die Isobarenmarkierung verwendet chemische Reagenzien, welche aus drei Teilen bestehen (siehe Abbildung 3.15). Zunächst ist eine Reaktivgruppe enthalten, welche zur Konjugation des Reagenzes mit Peptiden verwendet wird. Üblicherweise kommen hier NHS-Ester zum Einsatz, welche mit den N-Termini und den Lysin-Seitenketten der Peptide reagieren. Für spezielle Applikationen stehen jedoch auch Reagenziensets zur Verfügung, welche zum Beispiel Cystein- oder Carbonyl-reaktiv sind.

Für die Quantifizierung entscheidend sind jedoch die zwei verbleibenden Teile eines isobaren Markierungsreagenzes: die Reportergruppe und die Massenausgleichgruppe (engl. *mass balancer*). Diese beiden Teile sind mit einer durch Fragmentierung spaltbaren Gruppe verbunden, um die Reportergruppe vom Rest des Reagenz-Peptidkonjugats zu trennen. So werden im MS^2 -Spektrum zusätzlich zu den Signalen der Peptidfragmente ein Signal für die Reportergruppe und ein Signal für das Massenausgleich-Peptidkonjugat erhalten.

Um die zu vergleichenden Proben nun individuell markieren zu können, wird je Reagenz in der Reportergruppe eine unterschiedliche Anzahl an natürlichen Isotopen durch schwere Isotope ersetzt. Nach der Fragmentierung im Massenspektrometer unterscheiden sich so die Massen der abgespaltenen Reportergruppen und können den zu vergleichenden Proben zugeordnet werden.

Damit die Gesamtmasse des Reagenzes allerdings konstant bleibt, werden auch in den Masseausgleich-Teil des Moleküls schwere Isotope eingebaut. Durch eine geschickte Kombination verschieden markierter Reporter- und Massenausgleichgruppen werden so Reagenzien erhalten, welche isobar sind – die Gesamtmasse der Reagenzien ist dadurch identisch. Dies hat den entscheidenden Vorteil, dass auch die markierten Peptide aus den zu vergleichenden Proben isobar sind und dasselbe m/z -Verhältnis besitzen. Im MS^1 -Spektrum entsteht nur ein Signal pro Peptid, unabhängig davon, wie viele Proben miteinander verglichen werden. Erst nach der Fragmentierung im MS^2 -Spektrum werden die verschiedenen Reporterionen sichtbar und können zur relativen Quantifizierung der Peptide direkt miteinander verglichen werden. Somit ist es möglich, mehrere Proben innerhalb eines Experimentes zu quantifizieren, ohne die Komplexität des MS^1 -Spektrums zu erhöhen.

Der Ablauf eines isobaren Markierungsexperimentes ist in Abbildung 3.15 gezeigt. Für die relative Quantifizierung werden die Peptide jeder Probe wie üblich proteolytisch erzeugt. Jede Bedingung wird anschließend mit einer isotopomeren Variante des isobaren Reagenziensets markiert. Nach erfolgter Markierung können die Proben kombiniert und gemeinsam in einem Experiment analysiert werden, die Experimente erfolgen daher mit *Multiplexing*. Wird nun ein MS^2 -Experiment durchgeführt, werden in einem MS^1 -Scan die intakten, isobar markierten Peptidmassen als ein Signal gemessen. Nach Isolation und Fragmentierung werden im MS^2 -Scan die individuell isotopenmarkierten Reporterionen

freigesetzt und können zur relativen Quantifizierung der Proben verwendet werden. Die Peptidentifikation erfolgt wie bei anderen Experimenten aus den Peptidfragmenten.

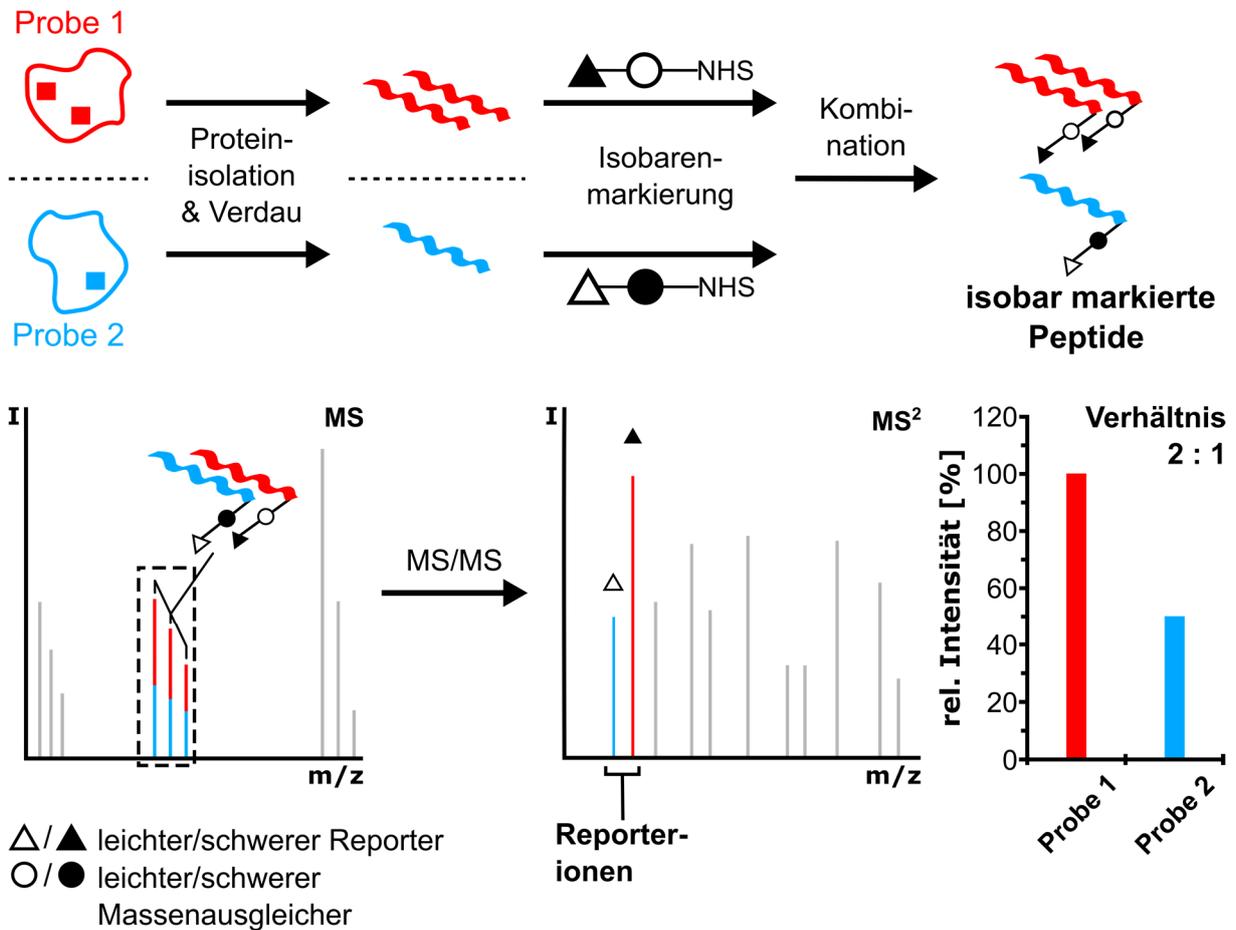


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung eines isobaren Markierungsexperiments zur relativen Quantifizierung zweier Proben. Proteine (beispielhaft dargestellt durch Quadrate) werden aus den beiden Proben isoliert und anschließend proteolytisch verdaut. Die erzeugten Peptide (rot für Probe 1 und blau für Probe 2) werden daraufhin mit den isobaren Markierungsreagenzien umgesetzt und zur gemeinsamen Analyse kombiniert. Durch die isobare Markierung zeigen die Peptide im MS¹-Scan das gleiche m/z-Verhältnis und werden gemeinsam selektiert und fragmentiert. Im entstehenden MS²-Spektrum sind die abgespaltenen Reporterionen sichtbar und können zur relativen Quantifizierung herangezogen werden, während die restlichen Peptidfragmente für die Peptidentifikation verantwortlich sind. Im gezeigten Beispiel ergibt sich ein Verhältnis der beiden Peptide von 2:1. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Isotopenmuster im MS²-Scan verzichtet. Modifiziert nach ^[128].

Thompson *et al.* veröffentlichten 2003 die Struktur der ersten Reagenzien zur Isobarenmarkierung, welche sie *tandem mass tags* (TMT) nannten.^[129] Diese Reagenzien bestanden aus Deuterium-markierten, über Festphasensynthese hergestellten Peptiden, welche über NHS-Ester aminreaktiv gemacht wurden. In modernen Reagenzien wird auf die Verwendung von Deuteriumisotopen verzichtet, da diese durch Isotopeneffekte zu geänderten Retentionszeiten während der Chromatographie führen können. Da so eine exakte Coelution der isobar markierten Peptide nicht garantiert ist, führt dies zu Fehlern in der Quantifizierung. Stattdessen werden andere schwere Isotope wie ¹³C, ¹⁵N oder ¹⁸O verwendet.

Die Struktur wurde durch eine Verkleinerung des Moleküls weiterentwickelt und schließlich kommerzialisiert. Heute ist das TMT-Reagenz als 2-plex, 6-plex, 10-plex und 11-plex erhältlich (siehe Abbildung 3.16A).^[130-131] Im Falle des 10-plex und 11-plex Reagenzes werden sehr geringe Massenunterschiede zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffisotopologen von lediglich 6 mDa verwendet. Damit können die Reportergruppen bei hohen Messauflösungen voneinander unterschieden werden.

Auf demselben Prinzip basieren die DiLeu-Tags^[132] und die iTRAQ-Reagenzien (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) (Abbildung 3.16B, C).^[133] Eine Besonderheit stellen die 2015 von Braun et al. entwickelten *Combinatorial isobaric Mass Tags (CMT)* dar (Abbildung 3.16D).^[134] Durch die gleichzeitige Bildung zweier Reportergruppen wird hier das *Multiplexing*-Potential der Reagenzien erhöht, ohne weitere Isotopenmarkierungen in das Molekül einbauen zu müssen.

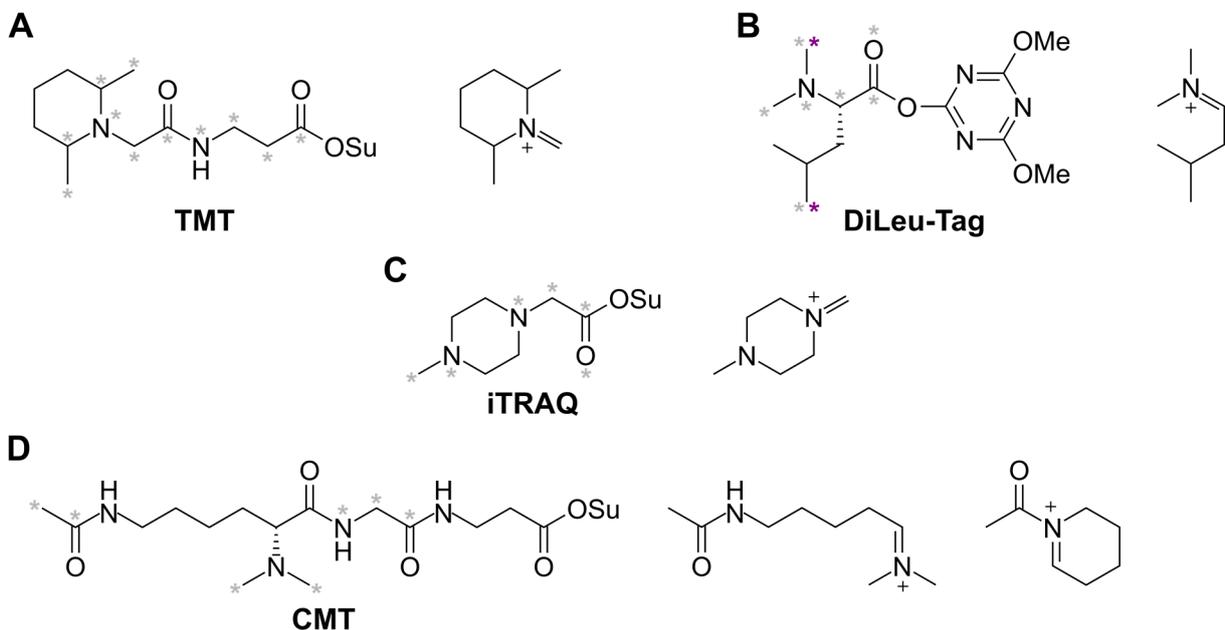


Abbildung 3.16: Strukturen von verschiedenen isobaren Markierungsreagenzien und der gebildeten Reporterionen. Mögliche Stellen zur Isotopenmarkierungen sind durch graue (für ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) oder violette ($^2\text{H}_3$) Sterne gekennzeichnet. A) Aktuelle Struktur der *tandem mass tags*. Mit dieser Struktur können bis zu elf Proben miteinander verglichen werden. B) DiLeu-Tag. Die Peptidkonjugation erfolgt hier durch einen Triazin-Ester. C) *iTRAQ*-Reagenz in der 4-Plex Version. Die Struktur des ebenfalls kommerziell erhältlichen 8-Plex-Reagenzes ist nicht veröffentlicht. D) *Combinatorial isobaric Mass Tag*-Struktur. Bei der Fragmentierung in der Gasphase bilden sich zwei verschiedene Reporterionen aus.

Die Methode der Isobarenmarkierung bietet den Vorteil einer robusten Quantifizierung mit geringen Variationskoeffizienten, hohen *Multiplexing*-Kapazitäten und damit verbundenen hohen Proben-durchsätzen.^[126] Auf einen Nachteil dieser Methode, die so genannte *ratio distortion*, einer Verzerrung der gemessenen Verhältnisse der Reportergruppen, soll zusammen mit Lösungsansätzen im nächsten Kapitel eingegangen werden.

3.3.2 Herausforderungen und Methodenvariationen

Für eine akkurate Quantifizierung über die Isobarenmarkierung ist es notwendig, dass die Signale der Reportergruppen nur von dem zu quantifizierenden, markierten Peptid stammen. In komplexen Proben ist dies jedoch nicht immer der Fall, wie in Abbildung 3.17 dargestellt.

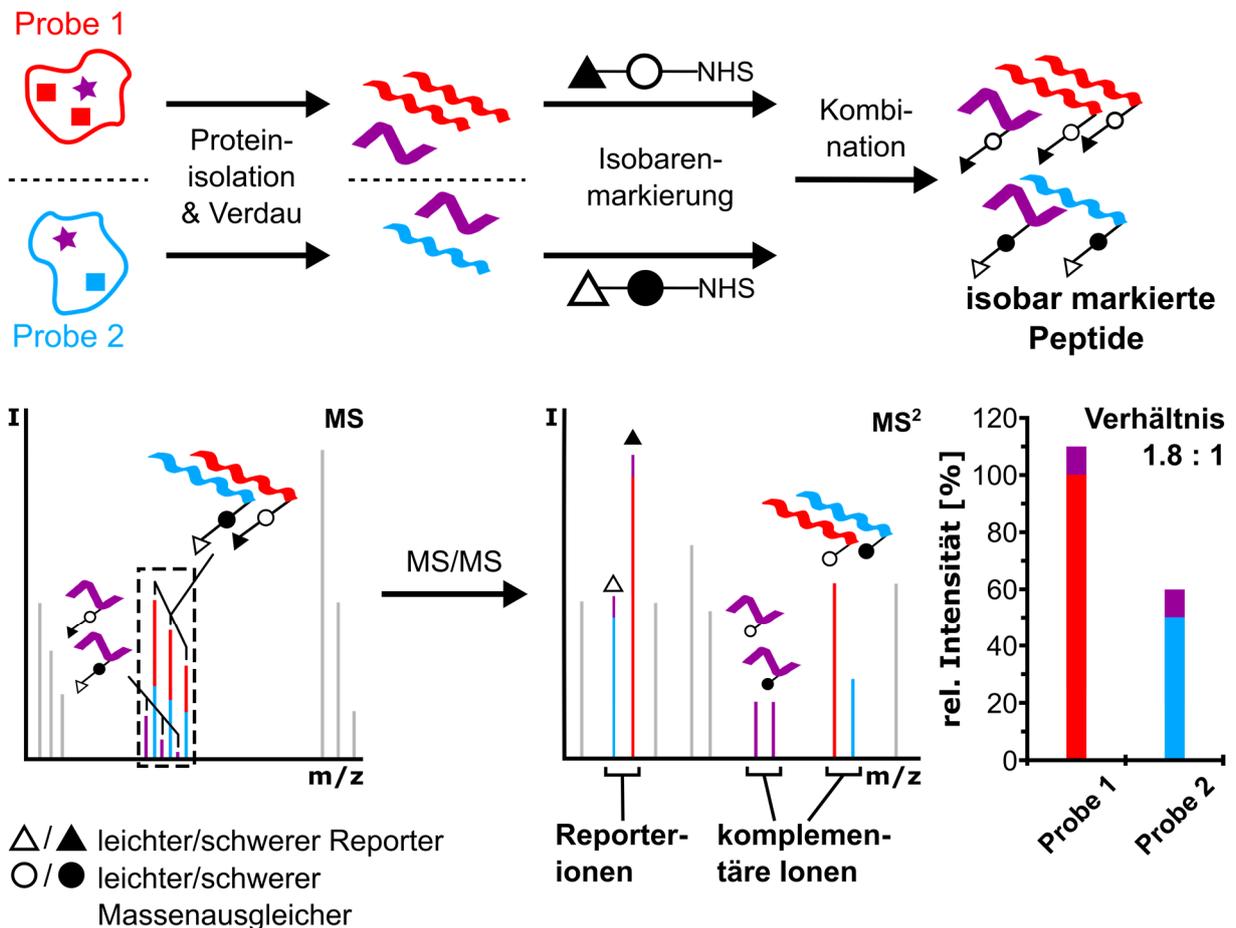


Abbildung 3.17: Darstellung des ratio distortion Effektes. Zusammen mit den Zielpeptiden können im MS¹-Scan auch ungewollte, zusätzliche Peptide, sogenannte Interferenzen (violett), co-isoliert werden. Da diese auch im Laufe des Experimentes mit den isobaren Markierungsreagenzien umgesetzt worden sind, bilden im MS²-Scan auch ungewollte Interferenzen dieselben Reporterionen. Da die Reporterionen der jeweiligen Proben stets die gleiche Masse besitzen, kann nicht unterschieden werden, aus welchen Peptiden die Reporterionen hervorgehen und die Signalintensität aus Zielpeptiden und Interferenzen addiert sich. So wird das errechnete Verhältnis der Zielpeptide verfälscht – im gezeigten Beispiel normalisiert sich das Verhältnis von 2:1 auf 1.8:1. Die gleichzeitig bei der Fragmentierung gebildeten komplementären Ionen hingegen bestehen aus den Peptiden und den Massenausgleicher-Regionen, sind somit peptidabhängig und können voneinander unterschieden werden, wodurch eine verzerrungsfreie Quantifizierung möglich ist. Modifiziert nach ^[128].

Auch markierte Peptide mit sehr ähnlichen *m/z*-Verhältnissen können gemeinsam mit dem eigentlichen Zielpeptid isoliert werden – man spricht hier von einer Co-Isolation und bezeichnet alle zusätzlich isolierten Ionen als Interferenzen. Da alle Peptide in den Proben mit den isobaren Reagenzien markiert worden sind, erzeugen diese Interferenzen durch die Fragmentierung ebenfalls Reporterionen. An der statischen Struktur der Reporterionen kann im MS²-Spektrum nicht unterschieden werden, ob das Signal von dem eigentlich zu quantifizierenden Peptid oder von den Interferenzen stammt. Vielmehr besteht das Signal des Reporterions aus einer additiven Überlagerung beider Quellen, wodurch die

Quantifizierung verfälscht wird. Dieser Effekt wird als *ratio distortion* bezeichnet und tritt gerade in komplexen Proben sehr häufig auf.^[135] In den meisten Experimenten, bei welchen die Isobarenmarkierung zum Einsatz kommt, ist die Mehrzahl der Proteine statisch und deren Abundanz verändert sich zwischen den verschiedenen, untersuchten Bedingungen kaum. Deswegen wird sehr häufig eine Verschiebung der gemessenen Quantifizierungsverhältnisse in Richtung eins zu eins beobachtet, wenn die *ratio distortion* auftritt.^[136]

Um akkurate Quantifizierungsergebnisse erhalten zu können, muss die Methode der Isobarenmarkierung modifiziert werden. Hierfür wurden in den vergangenen Jahren einige Konzepte vorgestellt.

Die Gasphasenaufreinigung der zu analysierenden Peptide stellt eine Möglichkeit dar, um die Interferenzen zu verringern und damit die Quantifizierung zu verbessern. So stellten *Wenger et al.* eine Methode vor, welche Protonentransferreaktionen in der Gasphase verwendet, um den Ladungszustand der Ionen zu reduzieren.^[137] Dadurch wird der m/z -Abstand möglicher Interferenzen zum Zielpeptid vergrößert und die Wahrscheinlichkeit der Co-Isolation von Interferenzen sinkt, was zu einer unverfälschten Quantifizierung führt. In dem *QuantMode* genannten Verfahren wird der Ladungszustand des Zielpeptids durch Reaktion mit einem Fluoranthen-Radikalanion-Stickstoff-Addukt in einem ETD-ähnlichem Prozess verringert, das ladungsreduzierte Vorläuferion HCD-fragmentiert, um die unverfälschten Reporterionen zu erhalten und zusätzlich eine CID-Fragmentierung des Vorläuferions durchgeführt, um mehrere Peptidfragmente zur Identifikation zu generieren. Zwar kann der Interferenzefekt durch *QuantMode* deutlich reduziert werden, allerdings ist die Methode zur Aufnahme der Spektren kompliziert und erhöht die Dauer des Scanzzyklus.

Im gleichen Jahr stellten *Ting et al.* eine Methode vor, welche ebenfalls auf der Gasphasenaufreinigung der Zielpeptid-Ionen beruht.^[138] In diesem Ansatz werden MS^3 - anstelle von MS^2 -Experimenten zur Quantifizierung durchgeführt. Die erste Fragmentierung zur Aufnahme des MS^2 -Spektrums erfolgt hier mit CID, um die Peptidfragmente zur Identifikation zu bilden. Anschließend wird das intensivste MS^2 -Ion isoliert und mit HCD fragmentiert, damit die Reporterionen entstehen und im MS^3 -Spektrum zur Quantifizierung herangezogen werden können. Durch die zweite Gasphasenisolation wird auch mit dieser Methode die Co-Isolation möglicher Interferenzen deutlich reduziert, was zu einer enormen Steigerung der Quantifizierungsgenauigkeit führt. Später wurde diese Methode weiterentwickelt, um nicht nur das intensivste, sondern mehrere MS^2 -Ionen zusammen zu isolieren und zu fragmentieren.^[139] Die gleichzeitige Isolation mehrerer Vorläuferionen für ein MS^3 -Spektrum wird durch die Verwendung spezieller Isolationswellenformen in der Ionenfalle realisiert (synchrone Vorläuferionen-Selektion, engl. *Synchronous Precursor Selection, SPS*). Diese als *MultiNotch-MS³* bezeichnete Methode erhöht die Anzahl der gebildeten Reporterionen im Vergleich mit der normalen MS^3 -Methode deutlich, was zu einer reduzierten Varianz der gemessenen Verhältnisse führt und den dynamischen Bereich der

Methode verbessert. Deswegen hat sich *MultiNotch-MS*³ heute als eine Methode der Wahl für eine unverfälschte Quantifizierung über Isobarenmarkierung etabliert.

Beide hier vorgestellten Methoden der Gasphasenaufreinigung bringen jedoch eine Erhöhung der Scanzklus-Dauer mit sich, wodurch weniger Peptide identifiziert und quantifiziert werden können. Zusätzlich ist das Vorhandensein einer Ionenfalle in beiden Experimenten notwendig, was die Wahl der Massenspektrometer einschränkt und die Methoden weniger zugänglich macht.

Eine Alternative zur akkuraten Quantifizierung auf dem MS²-Level wurde daher 2012 von *Wühr et al.* vorgestellt.^[140] Diese als TMT^C bezeichnete Methode macht sich zu Nutze, dass nicht nur die Reporterionen der isobaren Reagenzien schwere Isotopenmarkierungen enthalten, sondern auch die Massenausgleicher-Regionen. Dadurch ist auch in diesen Massenausgleicher-Regionen die Probenherkunft durch verschiedene Isotopenzusammensetzungen kodiert. Bei der Fragmentierung der isobar markierten Peptide entstehen somit zum einen die Reporterionen, aber auch die Massenausgleicher-Peptidkonjugate, welche als komplementäre Ionen bezeichnet werden. Durch die Analyse dieser komplementären Ionen ist eine interferenzfreie Quantifizierung möglich, da die m/z-Werte hier anders als bei den Reporterionen direkt von dem zu quantifizierenden Peptid abhängen. Damit ist es sogar möglich, auch die vorkommenden Interferenzen in dem gemeinsamen MS²-Spektrum zusammen mit dem Zielpeptid zu quantifizieren. Für eine noch exaktere Quantifizierung wird inzwischen zusätzlich der Isolationsbereich des MS²-Scans in dem verwendeten Algorithmus berücksichtigt, wodurch die natürliche Isotopenverteilung der Peptide besser herausgerechnet werden kann.^[141] Mit dieser TMTc+ genannten Weiterentwicklung können die Quantifizierungen nun ohne Verlängerung des Scanzklus auf einer breiten Auswahl an modernen Massenspektrometern durchgeführt werden. Die Quantifizierungsgenauigkeit ist dabei vergleichbar zur MS³-Methode, allerdings wird die Sensitivität durch Umgehung des zusätzlichen Gasphasenisolationsschrittes deutlich erhöht.

Eine Limitation der TMT^C und TMTc+-Methode ist die ineffiziente Generierung der komplementären Ionen.^[140] Die vorgestellten isobaren Quantifizierungsreagenzien wurden nicht dafür entworfen, effizient in der Gasphase zu fragmentieren. Selbst die Fragmentierung eines kleinen Teils der Ionenpopulation ist ausreichend, um deutlich sichtbare Reporterionen zu generieren, welche zur klassischen Quantifizierung nach MS² oder SPS-MS³ verwendet werden können. Da für die Quantifizierung über TMT^C und TMTc+ aber intensive Signale der komplementären Ionen sehr vorteilhaft sind, muss die Spaltung der Reagenzien effizienter erfolgen.

2018 wurden zwei isobare Reagenzien vorgestellt, welche diese Limitation adressieren und eine Sulfoxid-Gruppe zur effektiven Fragmentierung und Bildung der komplementären Ionen enthalten: das SOT-Reagenz,^[128] welches im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, und das EASI-Tag-Reagenz von

Winter *et al.*^[142] Die neu entwickelten Strukturen sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Während das SOT-Reagenz sowohl gut sichtbare Reporterionen als auch komplementäre Ionen bildet und damit für alle Quantifizierungsmethoden herangezogen werden kann, kommt es bei Fragmentierung des EASI-Tags zu einem Neutralverlust, weswegen hier die Quantifizierung nur über die komplementären Ionen möglich ist.

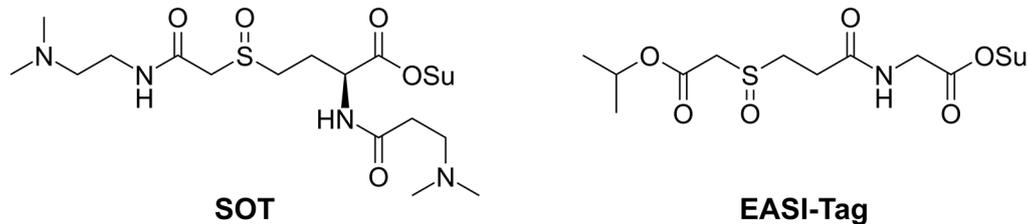


Abbildung 3.18: Struktur der Sulfoxid-basierten isobaren Markierungsreagenzien SOT und EASI-Tag.

Für Informationen zu Synthese und MS-Eigenschaften des SOT-Reagenzes wird auf den Ergebnis- und Diskussionsteil dieser Arbeit verwiesen.

Mit der Weiterentwicklung der Quantifizierungsmethoden und dem Design neuer Reagenzien, welche spezifisch auf das Umgehen vorhandener Limitationen zugeschnitten sind, ist die Isobarenmarkierung in der Lage, eine hochakkurate Quantifizierung bei gleichzeitiger, massiver Erhöhung des Probendurchsatzes zu ermöglichen. Damit steht der Proteomik ein mächtiges Werkzeug zur Verfügung, um die inhärent nicht-quantitative Massenspektrometrie dennoch zur Quantifizierung hoch komplexer Proben verwenden zu können, was die Beantwortung komplexer biologischer Fragestellungen und selbst die Anwendung in der medizinischen Diagnostik möglich macht.

4 Zielsetzung

Viele Methoden im Feld der MS-basierten Proteomik sind vom Einsatz chemischer Reagenzien abhängig, wie z.B. das in der Einleitung beschriebene Crosslinking oder die Isobarenmarkierung in der quantitativen Proteomik. Um in diesen Gebieten Fortschritte zu erzielen, ist die ständige Verbesserung der Massenspektrometer und der Analysemethoden allein nicht ausreichend. Vielmehr müssen auch die verwendeten Reagenzien evaluiert, verbessert und weiterentwickelt werden, um mit der Proteomik die modernen Fragestellungen der Lebenswissenschaften adressieren zu können.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten daher neue Moleküle für Proteomik-Applikationen entwickelt und durch organische Synthese zugänglich gemacht werden, welche dabei helfen, Fortschritte in den Gebieten des Protein-Protein-Crosslinkings und der Isobarenmarkierung zu erzielen. Des Weiteren sollten die hergestellten Reagenzien massenspektrometrisch evaluiert werden. Hierzu sollten verschiedene Proteomik-Experimente geplant und durchgeführt werden. Um dies erfolgreich bewerkstelligen zu können, sollten sowohl MS²- und MS³-Methoden etabliert als auch die Datenauswertung möglich gemacht werden.

Die MS-Analyse von Protein-Protein-Crosslinks wird durch die üblicherweise geringe Abundanz der Crosslinks in den hoch komplexen Peptidmischungen erschwert. Deswegen werden Crosslinker benötigt, welche spezifisch aus den Proben angereichert werden können. Gleichzeitig müssen die quervernetzten Peptide zur vereinfachten Analyse durch eine massenspaltbare Gruppe verbunden sein, um in der Gasphase effektiv voneinander getrennt werden zu können. Ein Ziel dieser Arbeit war es deswegen, neue Crosslinking-Reagenzien zu entwickeln, mit denen Protein-Protein-Interaktionen auch in komplexen Proben identifiziert werden können. Hierfür sollten zunächst sowohl verschiedene massenspaltbare Gruppen als auch Gruppen zur Affinitätsanreicherung in Crosslinking-Reagenzien eingebaut werden. Als nächstes sollten die hergestellten Reagenzien in Crosslinking-Experimenten bezüglich ihrer Spaltungseigenschaften untersucht werden. Die Anreicherung der gebildeten Crosslinks sollte in einem nächsten Schritt durch kupferkatalysierte Cycloaddition ermöglicht werden.

Auch für die Isobarenmarkierung zur quantitativen Analyse von Proteomik-Proben werden neuartige Reagenzien benötigt, um verschiedene Herausforderungen der Methode zu adressieren. Beispielsweise werden zur relativen Quantifizierung von mehr als sechs Proben häufig Reagenzien verwendet, bei welchen sich die Reporterionen (und dadurch auch die komplementären Ionen) nur durch die sehr geringen Massenunterschiede zwischen ¹³C- und ¹⁵N-Isotopen unterscheiden. Um diese Massen dennoch voneinander unterscheiden zu können, sind Messungen mit hohen Auflösungen nötig, was die Dauer eines Scanzklus erhöht und die Anzahl an identifizierten Peptiden verringert. Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Reportergruppen zu entwickeln, in denen sich die einzelnen

Isotopologe um 1 Da unterscheiden und damit die Messung bei niedrigen Auflösungen zu ermöglichen, ohne die *Multiplexing*-Kapazitäten zu verringern.

Eine zusätzliche Limitation der relativen Quantifizierung durch Isobarenmarkierung besteht im Auftreten der *ratio distortion*, wodurch die gemessenen Verhältnisse verfälscht werden. Zwar gibt es Methodenvariationen, welche dieses Problem vermindern, allerdings sind diese nicht auf allen Instrumenten anwendbar oder müssen Markierungsreagenzien verwenden, welche nicht spezifisch für die modifizierten Methoden entwickelt wurden. So wird die TMTc+-Methode, welche das Problem der *ratio distortion* durch Analyse der komplementären Ionen auf dem MS²-Level umgeht, durch deren ineffektive Generierung bei der Verwendung kommerzieller Reagenzien wie TMT limitiert. Um diese Herausforderung zu umgehen, sollte ein neuartiges Quantifizierungsreagenz entwickelt werden, welches labilere massespaltbare Gruppen enthält. Dadurch sollte es möglich gemacht werden, die komplementären Ionen, welche zur verzerrungsfreien Quantifizierung auf dem MS²-Level notwendig sind, effizienter zu bilden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Design, Synthese und Anwendung von Protein-Protein-Crosslinkern

5.1.1 Modifikation eines Crosslinkers mit Pyrrol-Grundstruktur

Für die niederaufgelöste Strukturaufklärung und zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionspartnern werden chemische Reagenzien, sogenannte Crosslinker, eingesetzt, welche räumliche Wechselwirkungen durch kovalente Bindungen fixieren und so nach proteolytischem Verdau quervernetzte Peptide zur MS-Analyse erzeugen. Wie bereits erläutert müssen die Reagenzien dabei bestimmte Anforderungen erfüllen, damit die quervernetzten Peptide robust identifiziert werden können. Zum einen müssen sie eine massenspaltbare Gruppe besitzen, um die verbundenen Peptide in der Gasphase voneinander trennen zu können. Zusätzlich ist es in komplexeren Proben notwendig, die in geringer Abundanz vorkommenden Crosslinks durch Affinitätschromatographie anzureichern.

Im Rahmen meiner Masterarbeit im Arbeitskreis *Carell* wurden so bereits Crosslinker synthetisiert und untersucht, welche auf einer Pyrrol-Grundstruktur basieren.^[107] Die Strukturen der synthetisierten Crosslinker **1** und **2** sind in Abbildung 5.1A dargestellt.

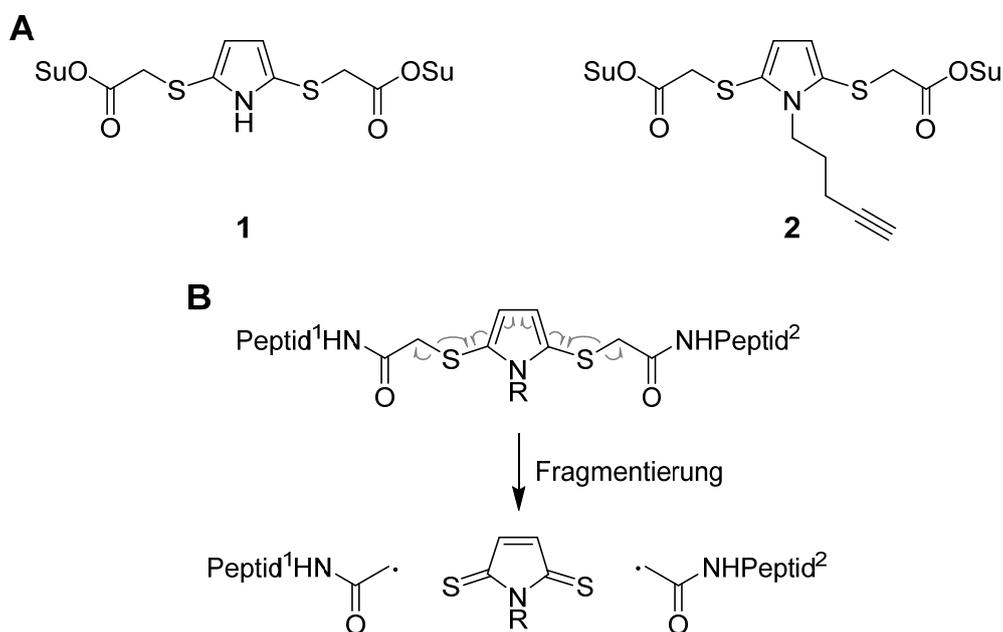
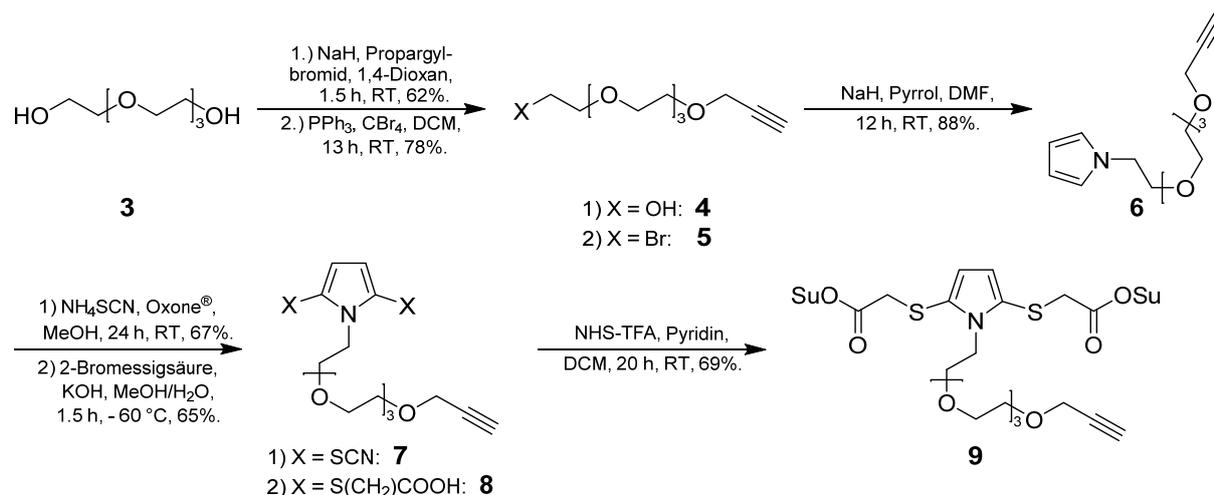


Abbildung 5.1: Während der Masterarbeit untersuchte Crosslinker mit Dithiopyrrol-Struktur. A) Synthetisierte Strukturen. Die Dithiopyrrol-Struktur zur Massenspaltbarkeit wurde für Molekül **2** mit einem Pentin-Rest funktionalisiert, um eine Affinitätsanreicherung durch CuAAC (Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition) zu ermöglichen. B) Fragmentierungsmechanismus der Dithiopyrrolstruktur. Durch homolytische Spaltung werden die Peptide separiert und zusätzlich entsteht ein stabilisiertes Dithial, welches als Reporterion das Vorhandensein quervernetzter Peptide anzeigt.

Als massenspaltbare Gruppe wurde hier eine zentrale Dithiopyrrol-Einheit gewählt, welche bei geringer Energie homolytisch fragmentieren sollte (Abbildung 5.1B). Durch die Fragmentierung werden die verbundenen Peptide als Radikale voneinander getrennt, während der zentrale Pyrrol-Kern als

stabilisiertes Dithial freigesetzt wird. Die Masse dieses Dithials ist bekannt und peptidunabhängig. Dadurch kann diese Spezies als Reporterion verwendet werden, welche das Vorhandensein eines Crosslinks im MS²-Spektrum anzeigt. Nachdem das Fragmentierungsverhalten der Teststruktur **1** in einer Kooperation mit der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Matthias Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried untersucht wurde, sollte die Möglichkeit zur Anreicherung in das Molekül eingeführt werden. Dies wurde durch Crosslinker **2** realisiert, welcher eine Alkinfunktionalität besitzt, um diverse Affinitätsgruppen durch CuAAC (Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition) an die modifizierten Peptide anbringen zu können. Jedoch zeigte diese Struktur eine geringe Wasserlöslichkeit, was das Durchführen des Crosslinkings in den gängigen, wässrigen Puffersystemen erschwerte. Aus diesem Grund musste zusätzlich die Wasserlöslichkeit des Reagenzes erhöht werden. Gleichzeitig sollte auch der Abstand zwischen der Alkin-Funktionalität und der Dithiopyrrol-Gruppe erhöht werden, um eine mögliche sterische Hinderung der CuAA-Cycloaddition zu minimieren.

Die so entwickelte Synthese zur Darstellung einer modifizierten Crosslinkerstruktur ist in Schema 5.1 gezeigt.



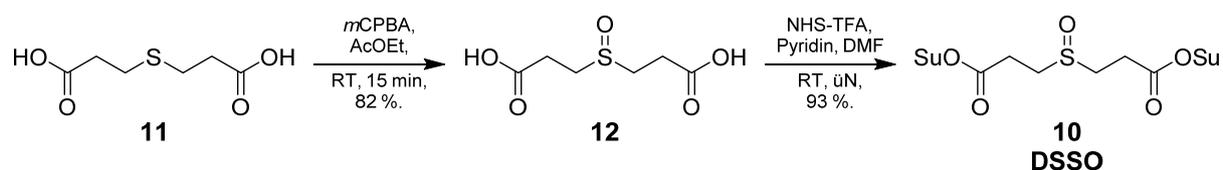
Schema 5.1: Synthese des modifizierten Pyrrollinkers **9**.

Um sowohl die Wasserlöslichkeit des Crosslinkers als auch die Distanz zwischen Pyrrolkern und Alkin zu erhöhen, wurde Tetraethylglycol (**3**) als Linker gewählt. Im ersten Schritt der Synthese wurde Propargylbromid zur Einführung der Alkinfunktionalität verwendet. Die Deprotonierung erfolgte dabei mit Natriumhydrid im Überschuss, um die ausreichende Bildung der Monoalkoxy-Spezies zu begünstigen. Somit konnte Alkin **4** trotz fehlender Regioselektivität in zufriedenstellender Ausbeute erhalten werden. Bromid **5** war durch eine Appel-Reaktion mit Tetrabrommethan in guten Ausbeuten zugänglich. Um mögliche Nebenreaktionen mit späteren funktionellen Gruppen zu umgehen, wurde die N-Alkylierung der Pyrrol-Grundstruktur zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Frisch destilliertes Pyrrol wurde hierzu mit Natriumhydrid an der N1-Position deprotoniert und mit Bromid **5** umgesetzt, um

Verbindung **6** in hoher Ausbeute zu erhalten. Es folgte die Einführung der Schwefelatome durch Umsetzung mit Ammoniumthiocyanat und Oxone® als Oxidationsmittel. *Wu et al.* postulieren für diese Reaktion einen Mechanismus, welcher mit der Bildung eines aromatischen Radikalkations durch Oxone® initiiert wird. Anschließend kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Thiocyanato-Anions und der abschließenden Rearomatisierung des elektronenreichen Aromaten.^[143] Dithiocyanat **7** wurde anschließend in einer Eintopfreaktion unter basischen Bedingungen bei tiefen Temperaturen hydrolysiert und die entstehende Dithiopyrrol-Verbindung durch 2-Bromessigsäure alkyliert. Die polare Disäure **8** konnte durch Säulenchromatographie mit einem Toluol-Ethylacetat-Essigsäure-Eluentengemisch in hoher Reinheit isoliert werden. Zum Abschluss der Synthese wurden die Aktivester durch Umsetzung mit NHS-TFA gebildet. Das Rohprodukt konnte durch zügiges Waschen der organischen Phase mit saurem und basischem Wasser von Nebenprodukten befreit werden. So wurde der Crosslinker **9** in hoher Reinheit erhalten.

Wie durch Einführung des Tetraethylglycol-Linkers erwartet zeigte Crosslinker **9** eine erhöhte Wasserlöslichkeit im Vergleich mit dem unpolaren Reagenz **2**. So konnte keine Trübung einer 25 mM wässrigen Lösung des Crosslinkers beobachtet werden, welche 5 % Acetonitril enthielt. Da gängige Crosslinking-Experimente mit weitaus geringeren Crosslinking-Konzentrationen von unter 5 mM durchgeführt werden, ist die Wasserlöslichkeit des Reagenzes **9** damit ideal für den Einsatz als Crosslinker.

Zusätzlich wurde der literaturbekannte, spaltbare Crosslinker DSSO (**10**) synthetisiert, um einen Vergleich zu den entwickelten Reagenzien zu ermöglichen.^[118] Die durchgeführte Synthese ist in Schema 5.2 dargestellt. Zunächst erfolgte die Oxidation von Sulfid **11** mit *meta*-Chlorperbenzoesäure zum Sulfoxid **12**, welches durch Filtration abgetrennt werden konnte. Im zweiten Schritt wurden die Aktivester durch Umsetzung mit NHS-TFA in Gegenwart von Pyridin eingeführt. Die Aufreinigung des Produkts erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit Aceton, wodurch DSSO (**10**) in hoher Reinheit erhalten werden konnte. Im Gegensatz zur von *A. Kao et al.* publizierten Synthese wurde der Aktivester erst im zweiten Syntheseschritt eingeführt. So wurde der Crosslinker **10** in wesentlich höherer Reinheit erhalten.



Schema 5.2: Synthese des literaturbekannten DSSO-Crosslinkers 10.

Als Nächstes sollte überprüft werden, ob Crosslinks mit dem modifizierten Pyrrolinker **9** per MS-Analyse detektiert werden können. Dazu wurde ein tryptischer Verdau von Rinder-Serumalbumin (BSA) in hohen Konzentrationen (5 µg/µL) verwendet, um die Peptide mit den eingesetzten Crosslinkern,

Pyrrol **9** und DSSO (**10**), zur Reaktion zu bringen. Die Analyse erfolgte mit einer *pseudo*-MS³-Methode (siehe Abbildung 3.10), da eine modifizierte MaxQuant-Betaversion zur Auswertung der Daten zur Verfügung stand.^[106] Nach einem Full-Scan (MS¹) zur Detektion der intakten Crosslinkmassen folgte die Aufnahme eines weiteren Full-Scans mit einer *in-source* CID-Energie von 35–50 eV, um den eingesetzten Crosslinker zu spalten und die Peptide zu separieren (*pseudo*-MS²). Anschließend wurden bei angelegter *in-source*-Spannung MS²-Messungen durchgeführt, um die modifizierten Peptide zu identifizieren (*pseudo*-MS³). Interessanterweise konnten für den Pyrrolcrosslinker **9** keine quervernetzten Peptide identifiziert werden, sondern nur Monolink-modifizierte Peptide. Auch bei der Verwendung von DSSO (**10**) konnten nur sehr wenige (1–3) Crosslinks zwischen Peptiden identifiziert werden. Für beide verwendeten Reagenzien wurden die Menge an eingesetztem Crosslinker oder die Höhe der *in-source* CID-Energie variiert, jedoch ohne die Ergebnisse zu verbessern.

Um ein Problem der Auswertesoftware auszuschließen, wurde stattdessen auf ein weniger komplexes Testsystem zurückgegriffen, um eine manuelle Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen. Hierzu wurde die Aminosäure Arginin ausgewählt. Der Crosslink zwischen zwei Arginin-Molekülen stellt ein ideales Testsystem zur Evaluation der Fragmentierungseigenschaften dar, da die Reaktion nur zwischen den zwei Aminogruppen möglich ist und gleichzeitig eine sehr hohe Ladungsdichte durch die positiv geladenen Guanidiniumgruppen der Seitenketten erreicht wird. Gerade durch die hohe Ladungsdichte des Crosslinks wird so ein sehr günstiges, „*best-case*“-Szenario für die Fragmentierung erreicht.

Nach Umsetzung der Crosslinker **9** und **10** mit einer konzentrierten Arginin-Lösung erfolgte die massenspektrometrische Analyse. Für beide Reagenzien konnten Arginin-Crosslinks in hohen Intensitäten beobachtet werden, was zeigt, dass die Amin-Reaktivität der Crosslinker wie erwartet vorhanden ist. Die gebildeten, zweifach positiv geladenen Arginin-XL-Arginin-Ionen wurden isoliert und mit einer CID-Energie von 15 eV fragmentiert. Abbildung 5.2 zeigt die beobachteten Fragmentierungsmuster und die jeweiligen MS²-Spektren.

In Abbildung 5.2A ist die Fragmentierung der mit Pyrrolinker **9** verknüpften Arginine gezeigt. Das zweifach positiv geladene Vorläuferion kann durch die Spaltung zwei geladene Fragmente bilden: das Amidradikal als Fragment A und das gut stabilisierte Thiopyrrolradikal als Fragment B. In der Tat können diese beiden Ionen im MS²-Spektrum identifiziert werden. Allerdings zeigt das MS²-Spektrum auch, dass das Vorläuferion nach der Fragmentierung größtenteils intakt vorliegt und nicht gespalten wurde.

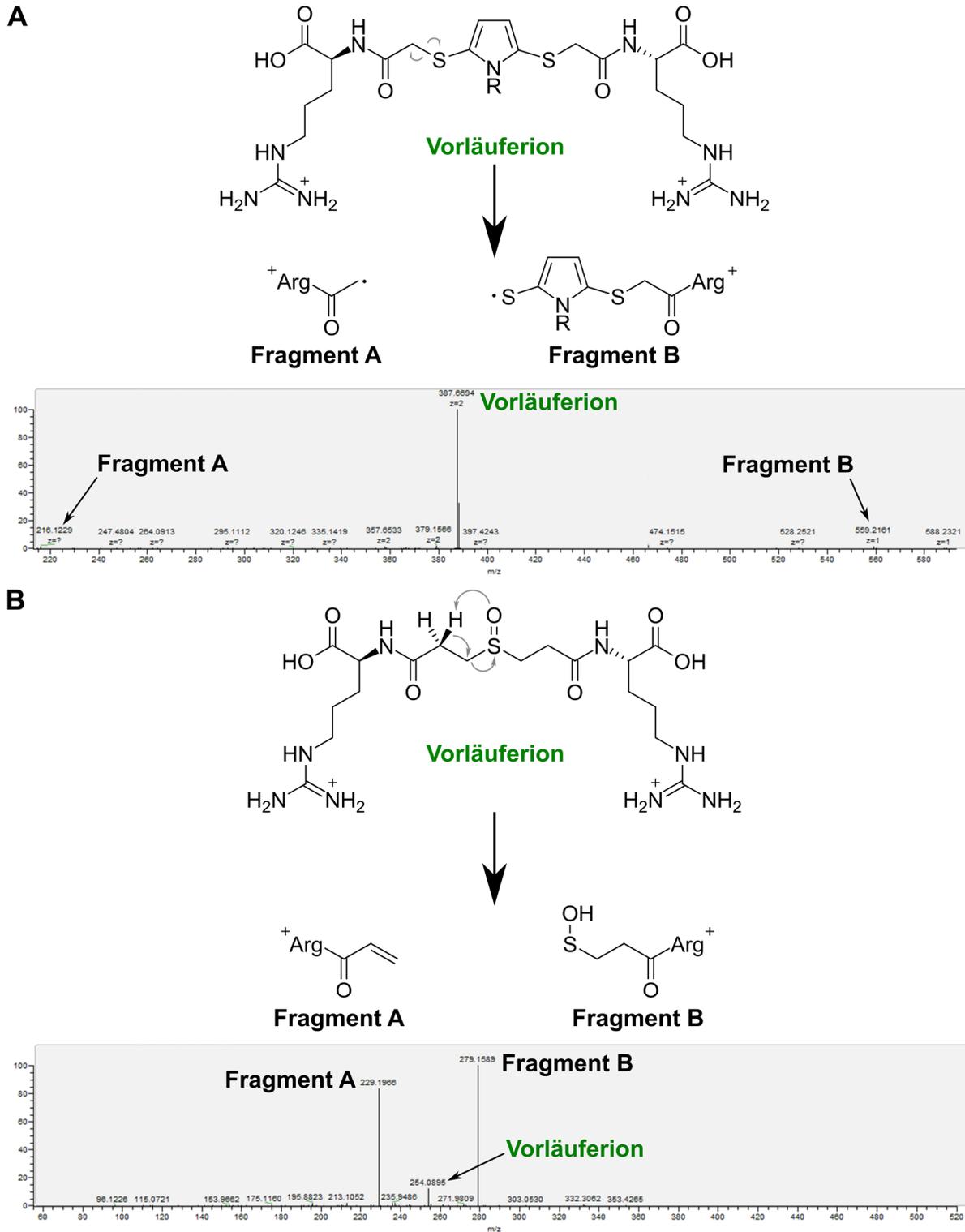


Abbildung 5.2: Fragmentierung von Arginin-XL-Arginin-Ionen. A) Der Pyrrollinker **9** wurde als Crosslinker verwendet. Bei der Fragmentierung kommt es zur homolytischen Bindungsspaltung unter Ausbildung eines Amidradikals (Fragment A) und eines stabilisierten Thiopyrrol-Radikals (Fragment B). Das MS²-Spektrum nach Fragmentierung durch CID mit einer Energie von 15 eV zeigt jedoch, dass die Fragmentierung nicht effizient verläuft und das Vorläuferion größtenteils intakt bleibt. B) Verwendung von DSSO (**10**) als Crosslinker. Die Fragmentierung des Sulfoxids verläuft in einer pericyclischen Reaktion unter Bildung eines Alken-Fragments (Fragment A) und eines Sulfensäurefragments (Fragment B). Das niederaufgelöste CID-MS²-Spektrum zeigt, dass bei der gleichen Energie von 15 eV das Vorläuferion effizient gespalten wird und die erwarteten Fragmente intensiv gebildet werden.

Die beobachteten Fragmentationen können lediglich in sehr geringen Intensitäten beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Fragmentierung des Pyrrolinkers **9** selbst unter den optimalen Bedingungen einer sehr hohen Ladungsdichte nicht effizient gelingt. Auch eine Erhöhung der CID-Energie auf bis zu 30 eV zeigte keine deutliche Verbesserung der Spaltungseffizienz. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Verwendung der Dithiopyrrol-Grundstruktur für den Einsatz als isobares Markierungsreagenz erhalten werden, welche in einem späteren Kapitel (Kapitel 5.2.2) genauer dargestellt werden.

Im Gegensatz dazu zeigten DSSO-verknüpfte Arginine das erwartete Verhalten während der Fragmentierung bei 15 eV CID (Abbildung 5.2B). Sowohl das Alkenfragment A als auch das Sulfensäurefragment B können in hohen Intensitäten beobachtet werden. Das zweifach positiv geladene Vorläuferion hingegen kann nur noch mit etwa 10 % Intensität detektiert werden.

Für die Verwendung als spaltbarer Crosslinker ist eine maximale Spaltungseffizienz Grundvoraussetzung, da nur bei einer effektiven Separation der Peptide genügend Ionen für die (*pseudo*-)MS³-Peptididentifikation gebildet werden können. Die mit Arginin durchgeführten Fragmentierungsexperimente zeigten jedoch, dass der Einsatz der Dithiopyrrol-Struktur diese Voraussetzung vermutlich nicht erfüllt, da die Fragmentierung nicht effizient genug verläuft. Eine manuelle Inspektion der Daten aus der Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Dr. M. Mann*, welche die Spaltbarkeit des Pyrrol-Kerns anhand von Linker **1** untersucht hatten, zeigten Abweichungen zwischen den entstehenden Fragmentmassen und den untersuchten m/z-Verhältnissen.

Da in den durchgeführten Experimenten eine effektive Spaltung der Dithiopyrrol-Grundstruktur weder durch *in-source* CID noch durch Ionenfallen-CID beobachtet werden konnte, wurde Pyrrolinker **9** nicht weiter für Crosslinking-Experimente in Betracht gezogen.

5.1.2 Etablierung von Crosslinking-Experimenten mit DSSO **10**

Um einen besseren Vergleich mit geplanten selbst entwickelten Crosslinking-Reagenzien zu ermöglichen, sollte die Durchführung von Crosslinking-Experimenten zunächst mit dem bekannten Sulfoxid-Crosslinker DSSO (**10**) etabliert werden.

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass die Reaktion und anschließende Fragmentierung von DSSO (**10**) mit Arginin erfolgreich verläuft, sollten Proben mit steigender Komplexität analysiert werden. Bei den bisher durchgeführten Crosslinking-Experimenten wurde bereits verdautes BSA in hohen Konzentrationen verwendet, um eine komplexe Peptidmischung zu simulieren. In diesen Proben werden Crosslinks jedoch zufällig ausgebildet, da keinerlei fixe, durch die Proteinstruktur vorgegebene räumliche Nähe zwischen Lysin-Seitenketten vorliegt. Dadurch wird die Abundanz von einheitlichen, querverknüpften Peptidspezies deutlich verringert. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten intaktes BSA verwendet. Nach Durchführung der Crosslinking-Reaktion durch Zugabe von DSSO

wurde die Proteinprobe mit TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) reduziert, Cysteine mit Iodacetamid (IAA) alkyliert und anschließend durch Einsatz von Trypsin verdaut.

Die in diesen Proben vorkommenden Intraprotein-Crosslinks sind durch die Proteinstruktur vorgegeben, wodurch Crosslinks zwischen den gleichen Peptiden häufiger vorkommen. Zur MS-Analyse wurde für diese Proben erneut eine *pseudo*-MS³-Methode gewählt, um auf die modifizierte MaxQuant-Version zurückgreifen zu können und die Messung auf einem *Q Exactive HF*-Massenspektrometer ohne Ionenfalle zu ermöglichen. Allerdings war es in der BSA-Probe nicht möglich, Crosslinks zu identifizieren. Das Ablaufen der Crosslink-Reaktion mit DSSO konnte jedoch durch das Auftreten von mehreren Monolinks in der Probe bestätigt werden.

Es wurde vermutet, dass die Crosslinks nicht in ausreichender Häufigkeit vorkommen, um mit der wenig sensitiven *pseudo*-MS³-Methode analysiert werden zu können. Aus diesem Grund sollte zunächst eine Anreicherung von Crosslinks durch Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) erfolgen. Als Testsystem wurde der Komplex des heterotrimeren Replikationsproteins A (*tRPA*) gewählt, welcher einzelsträngige DNA bindet und damit eine zentrale Rolle während der Replikation und der DNA-Reparatur spielt.^[144] Dieser Komplex, in welchem die Untereinheiten RPA1, RPA2 und RPA3 stark miteinander interagieren, konnte von *Dr. Nina Simon* und *Johanna Bretzler, M. Sc.*, aufgereinigt und isoliert werden. Durch die Verwendung von *tRPA* als Testsystem stand eine reine Proteinprobe zur Verfügung, in welcher sowohl Intraprotein- als auch Interprotein-Crosslinks zwischen den Untereinheiten des Komplexes vorkommen können.

Die Crosslinking-Reaktion mit DSSO (**10**) wurde im gleichen Puffersystem, in welchem der RPA-Komplex auch isoliert wurde, bei 37 °C durchgeführt, um eine native Proteinstruktur zu gewährleisten. Der Erfolg der Crosslinking-Reaktion konnte durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) visualisiert werden (Abbildung 5.3A). Nach der Crosslinking-Reaktion waren zusätzliche Gelbanden mit hohen Molekulargewichten sichtbar, welche durch die kovalente Fixierung der einzelnen Komplexpartner aneinander entstehen. Die zusätzliche Gelbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht zwischen 110 kDa und 200 kDa ist diffus und erstreckt sich über einen größeren Bereich im Gel, lässt sich jedoch durch die Summe der Molekulargewichte der individuellen RPA-Proteine erklären (14 kDa + 30 kDa + 68 kDa = 112 kDa). Eine zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht von über 200 kDa könnte auf die Quervernetzung mehrerer *tRPA*-Komplexe hindeuten. Die MS-Analyse der einzelnen Banden nach tryptischen in-Gel-Verdau führte jedoch nicht zur Detektion von Crosslinks, was durch die bekannte, schlechte Extraktionsfähigkeit großer Peptide aus SDS-PA-Gelen erklärt werden könnte.^[88] Um diese zu umgehen, erfolgte die Aufreinigung der quervernetzten Proteine durch eine Acetonfällung und der anschließende tryptische Verdau in Lösung.

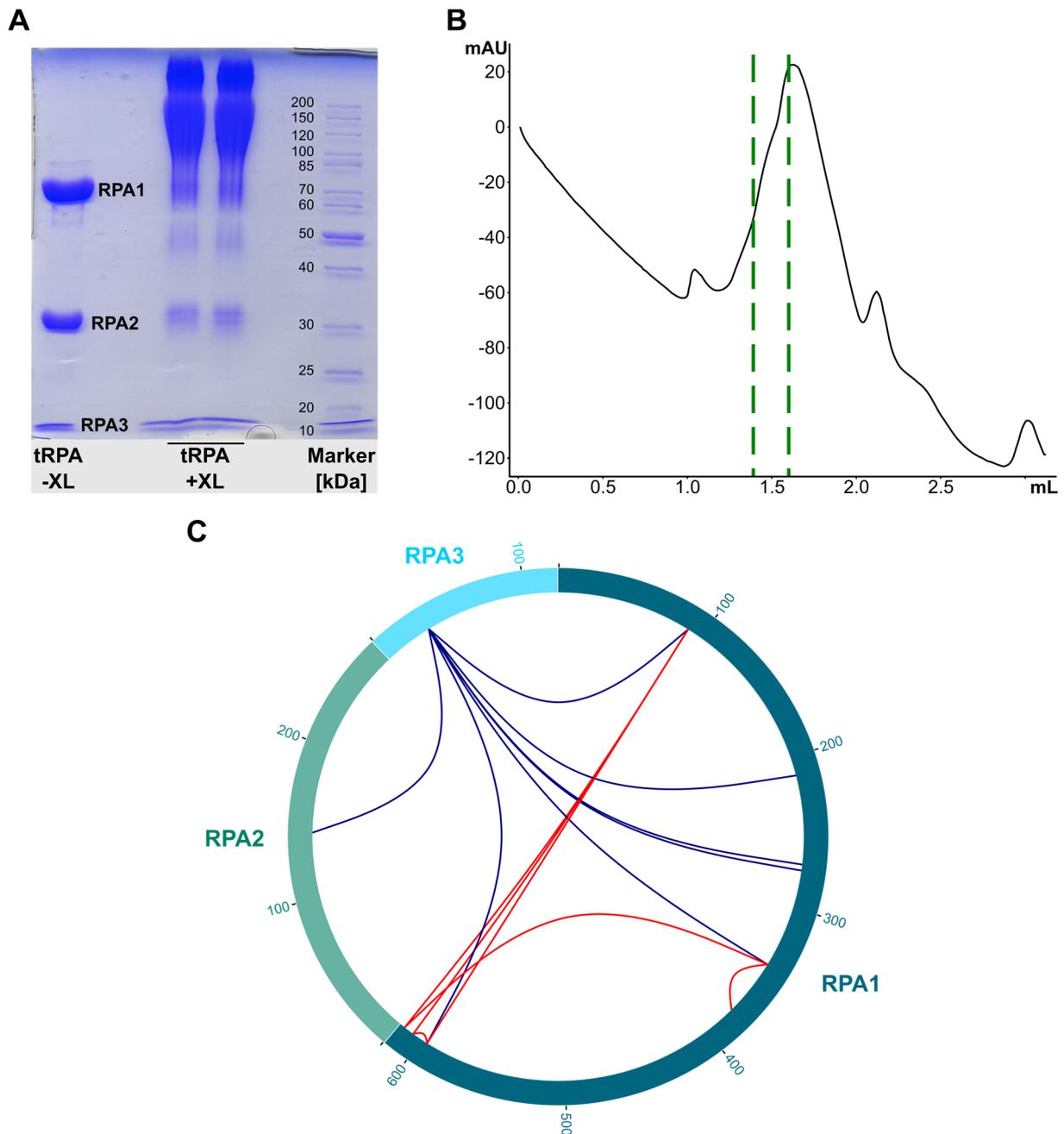


Abbildung 5.3: Crosslinking von tRPA mit DSSO und anschließende Analyse. A) SDS-PAGE des aufgereinigten Proteinkomplexes vor (tRPA -XL) und nach (tRPA +XL) Zugabe des Crosslinkers, angefärbt mit Coomassie Blau. In den beiden mittleren Gelbahnen sind deutlich neue Banden mit höherem Molekulargewicht zu erkennen, welche sich durch die Crosslinking-Reaktion ausbilden. B) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie (SEC) von quervernetzten RPA-Peptiden. Die Detektion der Peptide erfolgte bei einer Wellenlänge von 215 nm. Trotz einer stetigen Abnahme des UV-Signals sind deutliche Signale der Peptide zu erkennen. In der MS-Analyse konnten Crosslinks im Elutionsvolumen zwischen 1.4 und 1.6 mL identifiziert werden (grüne Markierung). C) Ergebnisse der *pseudo*-MS³-Analyse der SEC-Fractionen. Die Proteinsequenzen der Proteine RPA1 (dunkelblau), RPA2 (türkis) und RPA3 (hellblau) sind durch den Kreis dargestellt. In den Messungen konnten 6 Intraprotein- (rot) und 7 Interprotein-Crosslinks (blau) identifiziert werden (FDR 5 %). Die Visualisierung erfolgte durch den xVis-Server der LMU München.^[145]

Etwa 88 µg der so erhaltenen, komplexen Peptidmischung wurden daraufhin über Peptid-Größenausschlusschromatographie fraktioniert. Aufgrund der geringen Flussraten von lediglich 50 µL/min war es entscheidend, Totvolumina im ÄKTA-Chromatographiesystem zu minimieren, welches üblicherweise für Flussraten im mL/min-Bereich verwendet wird. Dazu wurde die Säule direkt an den UV-Detektor

gekoppelt, Detektoren zur Bestimmung der Leitfähigkeit und des pH-Werts wurden aus dem Flusspfad entfernt und Quarzglas-Kapillaren mit geringem Innendurchmesser von 150 μm wurden verwendet. Das resultierende Chromatogramm der fraktionierten Peptidmischung mit einer Detektion bei 215 nm ist in Abbildung 5.3B gezeigt. Obwohl in diesem Experiment die UV-Absorption über den Experimentverlauf abnahm, sind trotzdem deutliche Signale der Peptidmischung zu erkennen. Da die durch den Crosslinker quervernetzten Peptide größere Molekulargewichte besitzen, sollten sie während der SEC vor kürzeren, nicht gecrosslinkten Peptiden eluieren.

Zur Fraktionierung wurden Fraktionen mit 100 μL Volumen aufgefangen. Nach Entsalzen und Konzentration der Proben erfolgte die MS-Analyse der SEC-Fraktionen durch eine modifizierte *pseudo*-MS³-Methode. Um die benötigte Zeit für einen Scanzzyklus auf etwa 1.6 s zu reduzieren, wurden die Auflösungen des MS- und *pseudo*-MS²-Scans von 120k auf 60k verringert. Dies führt dazu, dass mehrere, auch weniger abundante Ionen für den *pseudo*-MS³-Scan selektiert werden können. Die Spaltung des Crosslinkers erfolgte durch eine *in-source* CID-Energie von lediglich 35 eV, um Peptidfragmentierungen zu vermeiden. Die Auswertung der erhaltenen Massenspektren erfolgte erneut durch die modifizierte MaxQuant-Version.

Durch die SEC-Fraktionierung der Probe war es in diesem Experiment möglich, mehrere Crosslinks zu detektieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.3C durch eine Darstellung visualisiert, welche mit dem *xVis*-Server von *Grimm et al.* angefertigt wurde.^[145] In dieser werden die Proteinsequenzen durch einen äußeren Kreis dargestellt und rote (Intraprotein-) sowie blaue (Interprotein-Crosslinks) Linien verbinden die quervernetzten Positionen der Proteine. Mit Hilfe des *pseudo*-MS³-Experiments konnten in zwei der ersten Peptid-enthaltenden Fraktionen (Elutionsvolumen 1.4 – 1.6 mL) 6 Intraprotein- und 7 Interprotein-Crosslinks zwischen Lysin-Seitenketten bei einer Falschidentifikationsrate von 5 % identifiziert werden. So konnte durch die Identifikation der Crosslinks gezeigt werden, dass RPA3 sowohl mit RPA2 als auch mit RPA1 in direktem Kontakt steht.

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Identifikation von Crosslinks auch in komplexeren Proben möglich ist. Dazu wurde der Komplex zwischen trimerem RPA und dem DNA-Reparaturprotein XPA gewählt, da sowohl tRPA als auch XPA von *Dr. Nina Simon* und *Johanna Bretzler, M. Sc.*, aufgereinigt werden konnten. Dieser Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Nukleotidexzisionsreparatur und bildet sich in Gegenwart geschädigter DNA-Stränge.^[144] Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen den Komplexpartnern wurden die aufgereinigten Proteine in der Gegenwart von einem mit Fluorescein-modifizierten ssDNA 48-mer gemeinsam zur Ausbildung des Komplexes inkubiert und anschließend mit DSSO umgesetzt. Nach Reduktion, Alkylierung der Cystein-Seitenketten durch Iodacetamid und Aufreinigung durch eine Acetonfällung wurden die Proteine mit Trypsin

verdaut. Die erhaltene Peptidmischung wurde erneut mit SEC fraktioniert, um die Crosslinks anzureichern. Abbildung 5.4 zeigt die Ergebnisse der *pseudo*-MS³-Analyse.

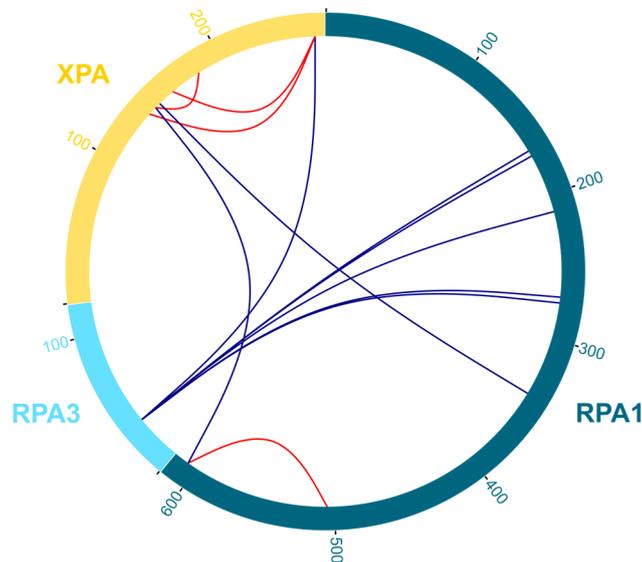


Abbildung 5.4: Identifizierte Crosslinks im Komplex von trPA und XPA. Die Crosslinking-Reaktion wurde mit DSSO (10) in der Gegenwart von geschädigter DNA durchgeführt, um einen nativen Komplex zu bilden. Nach Fraktionierung über SEC konnten in drei Fraktionen von Experimenten mit zwei verschiedenen DNA-Konzentrationen Crosslinks durch *pseudo*-MS³-Messungen identifiziert werden. So war es möglich, einen Crosslink zwischen XPA und RPA3 und zwei Crosslinks zwischen XPA und RPA1 zusätzlich zu mehreren Interprotein-Crosslinks zwischen RPA1 und RPA 3 zu detektieren. Intra- oder Interprotein-Crosslinks von RPA2 konnten in diesem Experiment nicht detektiert werden.

In drei Fraktionen der SEC aus Experimenten mit zwei verschiedenen Konzentrationen der geschädigten DNA konnten 4 Intraprotein- und 8 Interprotein-Crosslinks bei einer Falscherkennungsrate von 5 % identifiziert werden. Die identifizierten Crosslinks legen nahe, dass XPA in engem Kontakt zu sowohl RPA1 als auch RPA3 steht. Gleichzeitig konnten weiterhin Crosslinks zwischen RPA1 und RPA3 detektiert werden, welche auch in der Abwesenheit von XPA ausgebildet wurden. In den durchgeführten Messungen war es jedoch nicht möglich, Intra- oder Interprotein-Crosslinks von RPA2 zu finden.

Zwar war es durch die Etablierung der SEC-Fraktionierung und die Modifikation der *pseudo*-MS³-Methode möglich, Crosslinks in aufgereinigten Proteinkomplexen zu identifizieren, allerdings konnte nur eine geringe Anzahl erfolgreich in den Proben detektiert werden. Ein Grund hierfür könnte in der geringen Sensitivität der *pseudo*-MS³-Methode begründet sein. In dieser kann es durch die *in-source*-Fragmentierung in den vorderen Regionen der Ionenquelle mit noch vorhandenen Atmosphäregas- und Lösungsmittelresten zu unerwünschten Ladungsverlusten oder Peptidmodifizierungen der Crosslinks kommen. Des Weiteren war auch die korrekte Funktionsweise der modifizierten MaxQuant-Version ungewiss, da manuell detektierte Crosslinks synthetischer Peptide nicht von der Software identifiziert werden konnten.

Durch das Aufkommen neuer Softwarepakete, wie *MeroX* von Götze *et al.* und der Implementation des *xLinkx*-Algorithmus in die *Proteome Discoverer* Software, entstand jedoch die Möglichkeit, auch MS²-Messungen zur Identifikation von Crosslinks wenig komplexer Proben durchzuführen.^[101, 119] Zwar kommt es hier nicht zur Separation der Peptide vor deren Identifikation, jedoch profitieren auch diese Messungen deutlich von leicht spaltbaren Crosslinkern wie DSSO (**10**), da sich bei deren Einsatz XL-spezifische Ionen ausbilden können und die Peptidfragmentierung deutlich vereinfacht wird. Gleichzeitig ist das verwendete *Q Exactive HF*-Massenspektrometer durch dessen hohen Scanraten ausgezeichnet zur hochsensitiven Durchführung von MS²-Experimenten geeignet.

Als Testsystem für die Etablierung einer MS²-Methode wurde erneut BSA gewählt. Die Crosslinking-Reaktion erfolgte dabei wie für die *pseudo*-MS³-Experimente, um einen direkten Vergleich zwischen den Methoden zu ermöglichen. Die verwendete MS²-Methode zeichnet sich durch eine hohe maximale Injektionszeit von 100 ms für die MS²-Scans aus, um genügend Ionen geringer Abundanz zu sammeln und identifizierbare MS²-Spektren zu erhalten. Da es sich bei quervernetzten Peptiden in den meisten Fällen um höhergeladene Ionen handelt, wurden nur Ionen mit einer Ladung von $\geq 3+$ zur Isolation und Fragmentierung ausgewählt. Dadurch werden deutlich weniger lineare, unmodifizierte Peptide für MS²-Messungen ausgewählt und mehrere höhergeladene Ionen können analysiert werden. Die Fragmentierung erfolgte in zwei Stufen bei 25 % und 30 % normalisierter HCD-Energie, um zum einen die vollständige Fragmentierung der quervernetzten Peptide bei der hohen Energie zu erreichen, zum anderen aber gleichzeitig eine möglichst selektive Spaltung der Crosslinker-Struktur zu ermöglichen und die spezifischen Crosslinker-Fragmente zu erzeugen. Sowohl bei der Benutzung von *MeroX* als auch von *xLinkx* können letztere dazu verwendet werden, die Crosslink-Identifikation robuster zu machen. Die durch die abgestuften HCD-Energien gebildeten Fragmentionen werden in einem gemeinsamen MS²-Scan in der Orbitrap analysiert, um eine geringe Scanzykusdauer zu gewährleisten.

Die Ergebnisse der Analyse von mit DSSO (**10**) gecrosslinktem BSA sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Das Experiment wurde sowohl ohne als auch mit Fraktionierung durch SEC durchgeführt, um die Effekte der Fraktionierung genauer untersuchen zu können. In beiden Fällen konnten durch die Verwendung der MS²-Methode und der alternativen Auswerteprogramme deutlich mehr Crosslinks detektiert werden als mit der *pseudo*-MS³-Methode. Dabei war es zusätzlich möglich, strikter vorzugehen und nur Crosslinks zu berücksichtigen, welche bei einer Falscherkennungsrate von 1 % anstatt von 5 % identifiziert werden. In Abbildung 5.5A ist die *xVis*-Darstellung aller vor der Fraktionierung identifizierten Crosslinks gezeigt, welche in einer einzigen 60-Minuten-Methode detektiert werden konnten.

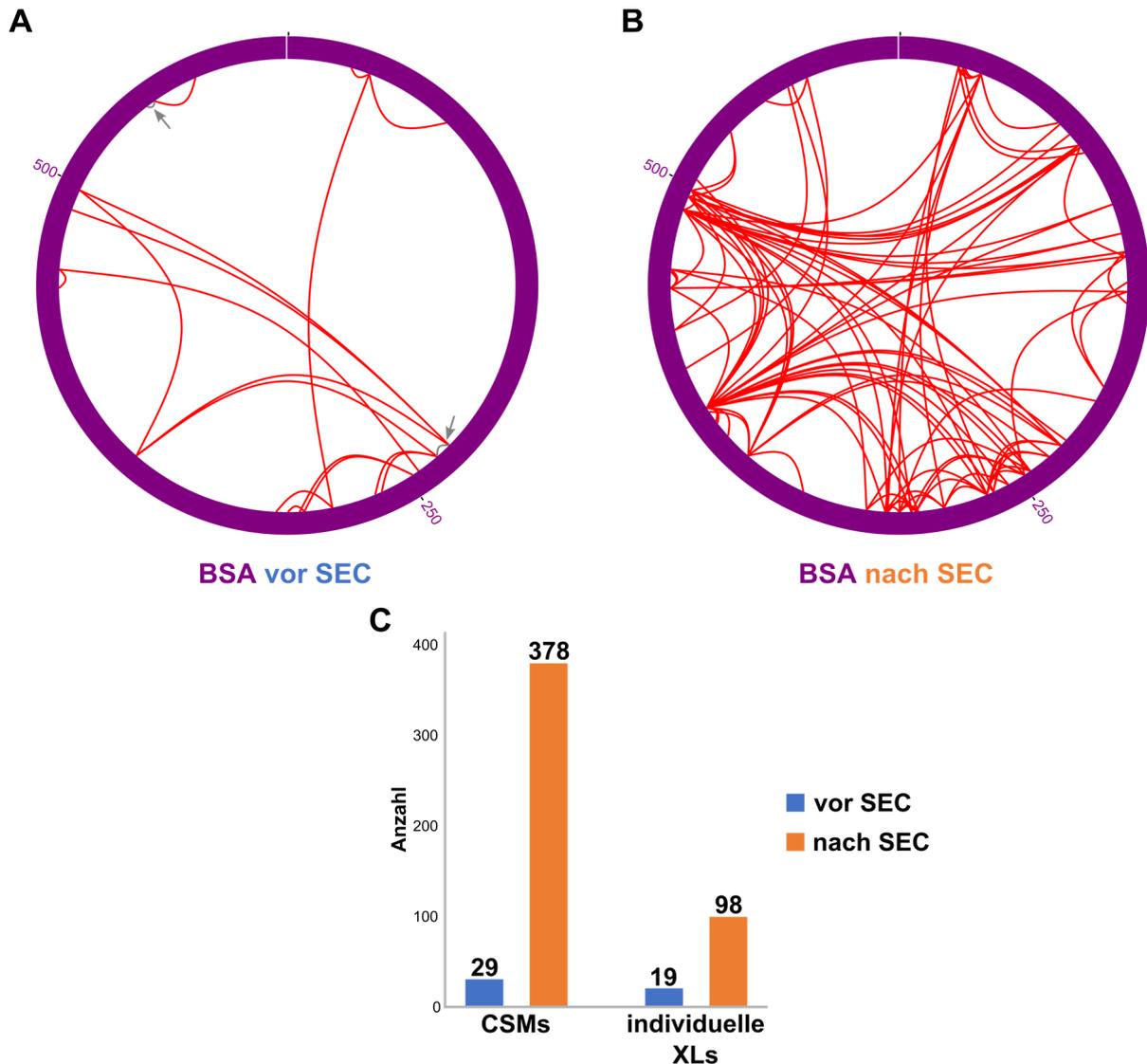


Abbildung 5.5: MS²-Experimente zur Detektion von DSSO-Crosslinks in BSA. A) Identifizierte BSA-Intraprotein-Crosslinks (rote Linien) vor Durchführung der SEC. Bei den beiden durch graue Pfeile markierten Crosslinks handelt es sich um Typ1-*Looplinks* innerhalb eines Peptids. B) Ergebnisse der MS²-Analyse der Probe nach Anreicherung der Crosslinks durch SEC. Sowohl die Zahl der identifizierten XL-Spektren als auch die Zahl an individuell detektierbaren Crosslinks steigt nach der Fraktionierung signifikant an. Mit Ausnahme der beiden linearen Typ1-*Looplinks* (graue Pfeile, A)) besteht eine vollständige Überschneidung der detektierten Crosslinks vor und nach der SEC. C) Balkendiagramm über die Anzahl der zugeordneten XL-Spektren (CSMs) und der individuellen Crosslinks vor (blau) und nach (orange) Fraktionierung. Durch die SEC konnte die Anzahl der CSMs um den Faktor 13 und die Anzahl der individuellen Crosslinks um Faktor 5 erhöht werden. Alle Crosslinks wurden unter Berücksichtigung einer strikten Falscherkennungsrate von 1 % identifiziert.

So konnten 29 CSMs (*engl. Crosslink Spectral Matches*, XL-Spektrumszuordnungen) detektiert werden, was in 19 individuellen Crosslinks zwischen Lysin-Seitenketten resultiert. Damit war es durch die Verwendung der optimierten MS²-Methode möglich, XL-Experimente einzelner Proteine mit deutlich weniger Material und deutlich kürzerer Messzeit durchführen zu können.

Zusätzlich konnte der deutliche Nutzen der SEC-Fraktionierung für Proben, welche in ausreichenden Mengen zugänglich sind, durch die Fraktionierung der BSA-Probe gezeigt werden. In Abbildung 5.5B ist das Ergebnis der MS²-Analyse nach der SEC-Fraktionierung von 40 µg BSA-Verdau gezeigt. Hier konnten deutlich mehr individuelle Crosslinks identifiziert werden, wodurch erheblich mehr

strukturelle Informationen aus dem XL-Experiment gewonnen werden können. Ein Vergleich zwischen den vor und nach der Fraktionierung erhaltenen XL-Daten zeigt, dass ein sehr großer Überlapp zwischen den Datensätzen besteht. Lediglich zwei Typ1-Looplinks (Abbildung 5.5A, graue Pfeile) können nur vor der Fraktionierung detektiert werden, da es sich hier um lineare Peptide handelt, welche erst in späteren Elutionsfraktionen mit anderen linearen, unmodifizierten Peptiden vorkommen. Durch den direkten Vergleich konnte sichergestellt werden, dass durch die Fraktionierung keine strukturellen Daten quervernetzter Peptide verloren gehen.

Zusammenfassend zeigt das Balkendiagramm in Abbildung 5.5C den enormen Gewinn an XL-Daten durch die SEC-Fraktionierung. So konnte die Anzahl der CSMs um den Faktor 15 gesteigert werden. Dies resultiert auch in einer fünffach höheren Anzahl an individuellen Crosslinks, welche für Modelling-Studien entscheidend sind.

Zur weiteren Analyse der SEC-Fraktionierung wurde als Kontrolle auch ein BSA-Verdau ohne vorheriges Crosslinking durchgeführt und ebenfalls fraktioniert. Die UV-Spektren der Fraktionierung sind in Abbildung 5.6A gezeigt. Durch die erfolgreiche Crosslinking-Reaktion kann eine zusätzliche UV-Absorption bei früheren Elutionsvolumina beobachtet werden, welche durch die hochmolekularen, quervernetzten Peptide hervorgerufen wird (orangefarbenes Spektrum). Diese zusätzlichen Spezies liegen bei der SEC-Fraktionierung von 40 µg in ausreichender Menge vor, um sich deutlich von der BSA-Kontrolle (graues Spektrum) abzuheben. Dadurch ist es möglich, den Erfolg der Crosslink-Reaktion anhand des Chromatogramms während der Fraktionierung abschätzen zu können und auf SDS-PAGE-Analysen zu verzichten. In Abbildung 5.6B ist im Balkendiagramm dargestellt, in welchen SEC-Fractionen die 378 detektierten CSMs vorkommen. Während frühere Fraktionen oft nicht genügend Material enthalten, um bei der MS²-Messung ein ausreichendes Signal zu erzeugen, kommen in späteren Fraktionen überwiegend Monolinks und unmodifizierte, lineare Peptide vor. Über zwei Drittel der Crosslinks konnten durch die hohe Anreicherung in lediglich zwei Fraktionen detektiert werden. Dadurch kann die MS-Analyse bei limitierter Messzeit auf wenige Messungen beschränkt werden, ohne dass der Vorteil der SEC-Fraktionierung gegenüber der Analyse von unfraktionierten Proben verloren geht.

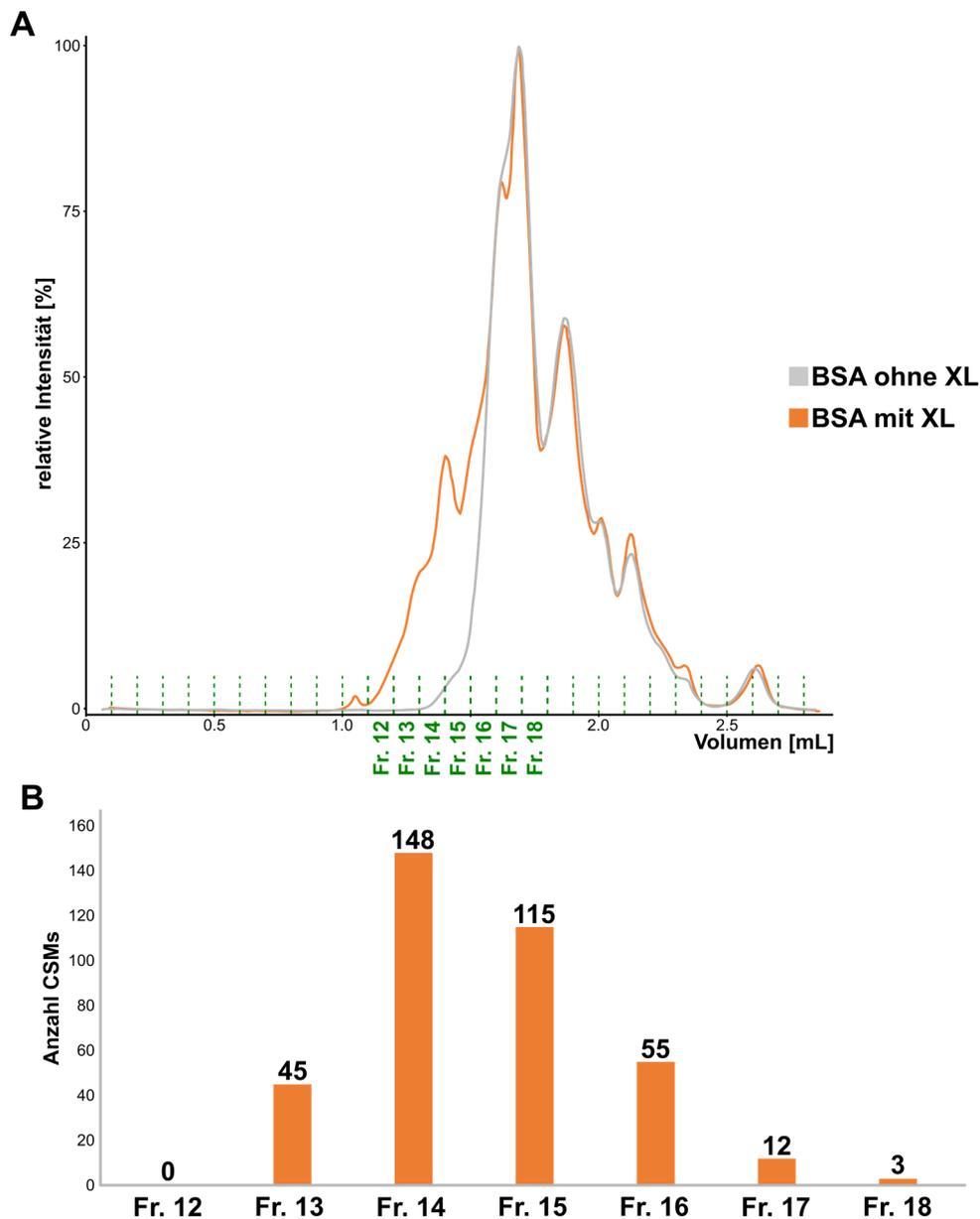


Abbildung 5.6: Analyse der SEC-Fraktionierung von BSA-Proben nach Reaktion mit DSSO (10). A) UV-Spektren der Fraktionierung von je 40 µg DSSO-gecrosslinktem BSA (orange) und einer BSA-Kontrollprobe (grau). Die Detektion der Peptide erfolgte bei einer Wellenlänge von 215 nm. Grüne Linien indizieren die aufgesammelten Fraktionen der gecrosslinkten Probe. Das Auftreten von quervernetzten Peptiden mit höherem Molekulargewicht ist im Bereich zwischen 1.0 – 1.5 mL Elutionsvolumen sichtbar, in welchem in der Kontrolle (grau) weniger Absorption stattfindet. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Spektren manuell überlagert, um Verschiebungen durch Variationen zwischen SEC-Läufen auszugleichen. B) Anzahl an identifizierten CSMs pro SEC-Fraktion. Der Großteil der Crosslinks wird in den Fraktionen 13 – 16 identifiziert, in welchem ein intensives Signal im UV-Spektrum der SEC-Fraktionierung beobachtet werden kann. Spätere Fraktionen beinhalten hingegen größtenteils unmodifizierte Peptide und Monolinks.

Nach der Etablierung der MS²-Methode zur Analyse wenig komplexer Proben sollte auch das tRPA-Testsystem mit dieser MS-Methode analysiert werden. Dazu wurde die Crosslinking-Reaktion mit DSSO (10) und die SEC-Fraktionierung analog zum *pseudo*-MS³-Experiment durchgeführt. Die Ergebnisse der MS²-Analyse sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Ähnlich wie bei der Analyse der BSA-Daten kommt es durch die Verwendung der MS²-Methode zur Detektion von signifikant mehr CSMs. So konnte die

Anzahl an CSMs von 13 für die *pseudo*-MS³-Analyse um das elffache auf 144 gesteigert werden, obwohl die strikere Falscherkennungsrate von 1 % eingehalten wurde.

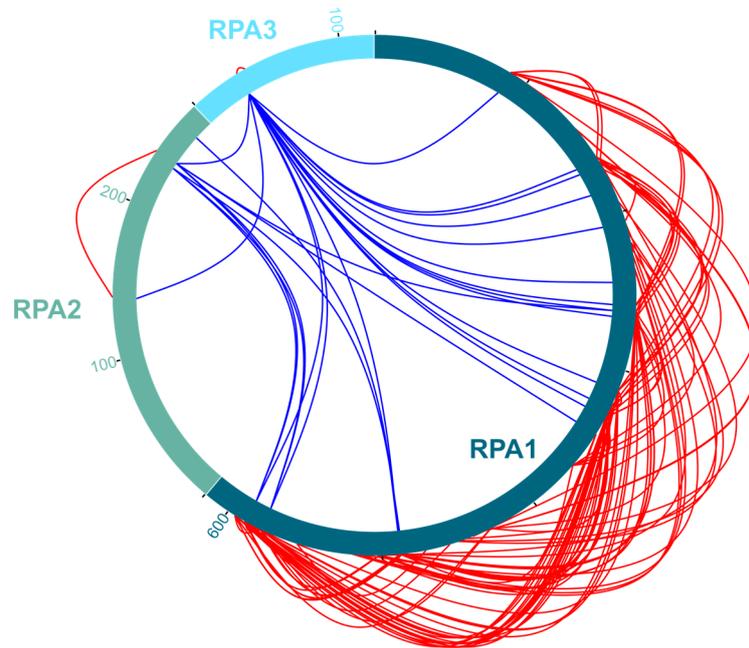


Abbildung 5.7: Analyse des tRPA-Komplexes nach Crosslinking mit DSSO (10) und SEC-Fraktionierung durch eine MS²-Methode. Im Vergleich mit der *pseudo*-MS³-Analyse können hier deutlich mehr CSMs (144) detektiert werden. Dies führt zur Identifikation von 25 Interprotein- und 92 Intraprotein-Crosslinks bei einer Falscherkennungsrate von 1 %.

Dadurch war es möglich, 92 Intraprotein-Crosslinks zu detektieren, welche vor allem an RPA1, dem größten der RPA-Proteine, lokalisiert sind. Zusätzlich konnten 25 Interprotein-Links zwischen den Untereinheiten des Komplexes identifiziert werden. Im Kontrast zum vorherigen Experiment konnte hier die räumliche Nähe aller RPA-Proteine zueinander gezeigt werden, da in diesem Experiment auch Crosslinks zwischen RPA1 und RPA2 gefunden werden konnten. Das vermeintliche Auftreten einer einzigen Interaktionsstelle für RPA3, identifiziert durch die Crosslinks an Lysin33, könnte durch das Verwenden von Trypsin als Verdauenzym erklärt werden. Die Bildung von Crosslinks an anderen Lysinen von RPA3 würde zur Entstehung sehr kurzer oder langer Peptide führen, was die Crosslink-Identifikation verhindert. Zur weiteren Analyse der tRPA-Struktur wäre es deswegen notwendig, andere Proteasen zu verwenden und so komplementäre Crosslinks detektierbar zu machen.

Zwar wurde durch die MS²-Methode der Zugang zur Analyse wenig komplexer Proben einzelner Proteine geschaffen, jedoch können mit dieser Methode komplexere Proben nicht analysiert werden (siehe Kapitel 3.2.1). Um auch Proben mit größeren Proteinen und unbekanntem Interaktionen zugänglich zu machen, wurde des Weiteren die Verwendung einer MS³-Methode zur Crosslink-Identifikation untersucht. Da dies am für die vorherigen Experimente verwendeten *Q Exactive HF*-Massenspektrometer durch das Fehlen einer Ionenfalle nicht möglich ist, wurden dazu Messungen an einem *Orbitrap*

Fusion Lumos-Massenspektrometer durchgeführt. Die Spaltung des Crosslinkers im MS²-Scan wurde dabei bei einer CID-Energie von 25 eV durchgeführt, die anschließend erhaltenen Peptide wurden zur MS³-Analyse bei einer normalisierten HCD-Energie von 25 % fragmentiert. Die Aufnahme der MS³-Spektren wurde nur ausgeführt, wenn im MS²-Scan die charakteristischen Crosslink-Ionenpaare von DSSO mit einem Massenunterschied von je 31.97 Da detektiert wurden (siehe Abbildung 3.14).

Die Ergebnisse der MS³-Analyse von DSSO-quervernetztem BSA sind in Abbildung 5.8A dargestellt.

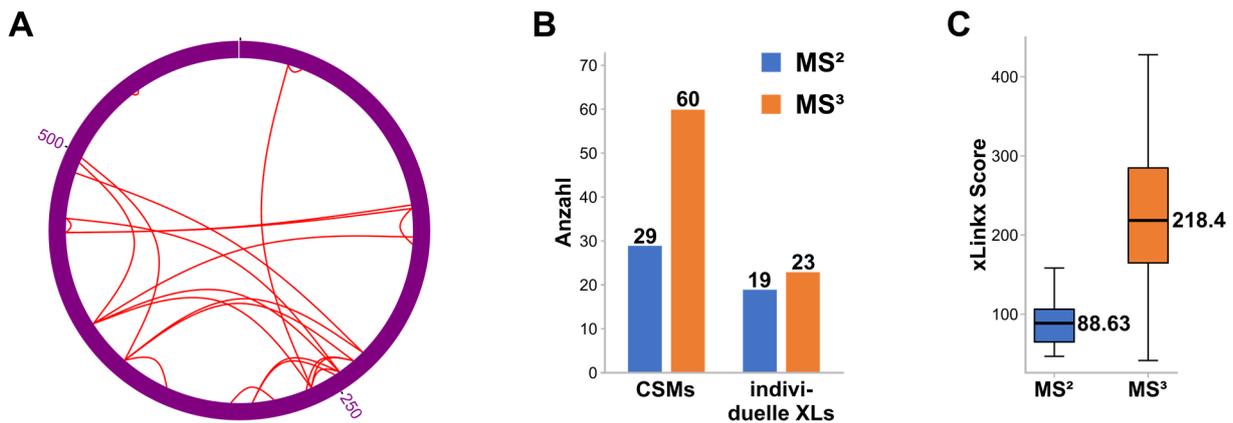


Abbildung 5.8: MS³-Analyse von DSSO-gecrosslinktem BSA. A) *xVis*-Darstellung der Crosslinking-Ergebnisse. Bei einer Falscherkennungsrate von 1 % konnten 23 individuelle XLs identifiziert werden. B) Vergleich zwischen der MS²- und MS³-Methode. Bei Verwendung der gleichen Probe konnten durch die MS³-Methode die doppelte Anzahl an CSMs detektiert werden. Dies resultierte in der Detektion von 4 zusätzlichen individuellen Crosslinks. C) Statistische Auswertung der erhaltenen *xLinkx*-Scores der CSMs bei Verwendung der unterschiedlichen Methoden. Der mittlere Score liegt für die MS³-Methode deutlich höher, was zu einer robusteren XL-Identifikation führt.

Durch die Auswertung mit *xLinkx* war es möglich, 23 individuelle Crosslinks zu detektieren. Dies zeigt, dass die Auswertung komplexer Proben prinzipiell durch die Verwendung von MS³-Methoden möglich ist, da auch mit dieser Methode Crosslinks identifiziert werden konnten. Das Balkendiagramm in Abbildung 5.8B zeigt dabei den Vergleich zur MS²-Methode. Die Anzahl an detektierten CSMs verdoppelte sich auf 60, was in vier zusätzlichen individuellen Crosslinks resultiert. Interessant sind auch die Auswirkungen auf den *xLinkx*-Score, welcher von der Software jeder XL-Identifikation zugeordnet wird. Ein höherer Score führt zu einer höheren Sicherheit der XL-Identifikation, was in einer robusteren Detektion resultiert. Die statistische Auswertung der Scores pro CSM ist in Abbildung 5.8C dargestellt. Der mittlere Score der MS³-Messung ist mit 218.4 beinahe zweieinhalbmal so hoch wie der mittlere Score der MS²-Analyse. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass die XL-Identifikation über die MS³-Methode spezifischer verläuft und weniger falsch-positive Ergebnisse erhalten werden.

In einem weiteren Experiment sollte das Interaktionsnetzwerk der katalytischen Domäne von TET3 durch XL-MS³-Experimente mit DSSO erforscht werden. Bei TET3 handelt es sich um eine Dioxygenase, welche 5-Methylcytosin (mC)-Basen in DNA zu den Basen hmC, fC und caC oxidiert.^[146] Vorherige

Untersuchungen in der Arbeitsgruppe deuteten auf eine Interaktion zwischen TET3 und der Glutamat-Dehydrogenase GLUD1 hin, welche das von TET3 zur Oxidation benötigte Cosubstrat α -Ketoglutarat bereitstellen könnte. Als zusätzlicher Nachweis der Interaktion zwischen TET3 und GLUD1 sollte untersucht werden, ob sich Interprotein-Crosslinks zwischen den Proteinen ausbilden. Dazu wurden die katalytische Domäne von murinem TET3 (TET3cd) und murines GLUD1 separat in HEK-Zellen überexprimiert und anschließend über Affinitätsgruppen angereichert. Nach Kombination wurden die Proteine gemeinsam inkubiert und zuletzt mit DSSO (**10**) umgesetzt. Obwohl die beiden Proteine von Interesse angereichert wurden, konnten über 1300 zusätzliche Proteine (FDR 1 %) in der Probe detektiert werden. Da nur wenig Material nach der Anreicherung der Proteine zur Verfügung stand, wurde auf eine SEC-Fraktionierung der Probe verzichtet. Um die Analyse der komplexen Probe zu ermöglichen, wurde erneut eine MS³-Methode an einem *Orbitrap Fusion Lumos*-Massenspektrometer verwendet.

Dennoch war es in diesem Experiment nicht möglich, Crosslinks zwischen TET3 und GLUD1 nachzuweisen. Dies könnte zum einen in der hohen Komplexität der Probe und zum anderen im unterschiedlichen Anreicherungslevel der beiden Proteine begründet sein. Zusätzlich könnte es sein, dass GLUD1 durch die Überexpression oder Anreicherung nicht wie nativ als Hexamer vorlag und so nicht mit TET3 interagieren konnte. So war es zwar möglich, unmodifizierte Peptide von GLUD1 nachzuweisen, aber keine Intra- oder Interprotein-Crosslinks konnten detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten zehn Interprotein-Crosslinks zwischen TET3cd und anderen Proteinen nachgewiesen werden, unter anderem zu Transkriptionsfaktoren oder der cAMP-abhängigen Proteinkinase PRKACG. Eine Übersicht über die Partner der detektierten Crosslinks ist in Tabelle 5.1 gegeben.

Tabelle 5.1: Übersicht über die über Interprotein-Crosslinks mit TET3cd verknüpften Proteine. Zum Hitzeschock-Protein 70 kDa 1B wurden zwei Crosslinks detektiert.

Uniprot-ID	Proteinname	Funktion
C9JG65_Human	Nicotinamid Phosphoribosyltransferase (Fragment)	NAD-Biosynthese
MINT_Human	Msx2-interagierendes Protein	Regulation der Transkription
SPZ1_Human	Spermatogenes Leucin-Zipper Protein 1	Transkriptionsfaktor
I3LOW4_Human	Diaminacetyltransferase 2	Acetyltransferase
A0A0G2JNU3_Human	Transkriptionsfaktor TFIIIB Komponente B Homolog	Transkriptionsfaktor
KAPCG_Human	cAMP-abhängige Protein Kinase katalytische Untereinheit γ	Proteinkinase
F8W0B9_Human	YY1-verbundener Faktor 2	Transkriptionsfaktor
CO6A6_Human	Collagen Alpha-6 Kette	Matrixprotein
A0A0G2JIW1_Human	Hitzeschock-Protein 70 kDa 1B	Chaperonprotein

Der Nachweis von Interprotein-Crosslinks könnte auf mögliche Interaktionen zwischen den aufgelisteten Proteinen und der katalytischen Domäne von TET3 hindeuten. Einige der hier identifizierten

Proteine sind an Transkriptionsprozessen beteiligt und sind im Zellkern lokalisiert, wo die Interaktion mit TET3 stattfinden könnte.

Zusätzlich zu den Interprotein-XLs konnten auch 37 Intraprotein-XLs (48 CSMs) innerhalb der TET3-Struktur detektiert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.9A dargestellt.

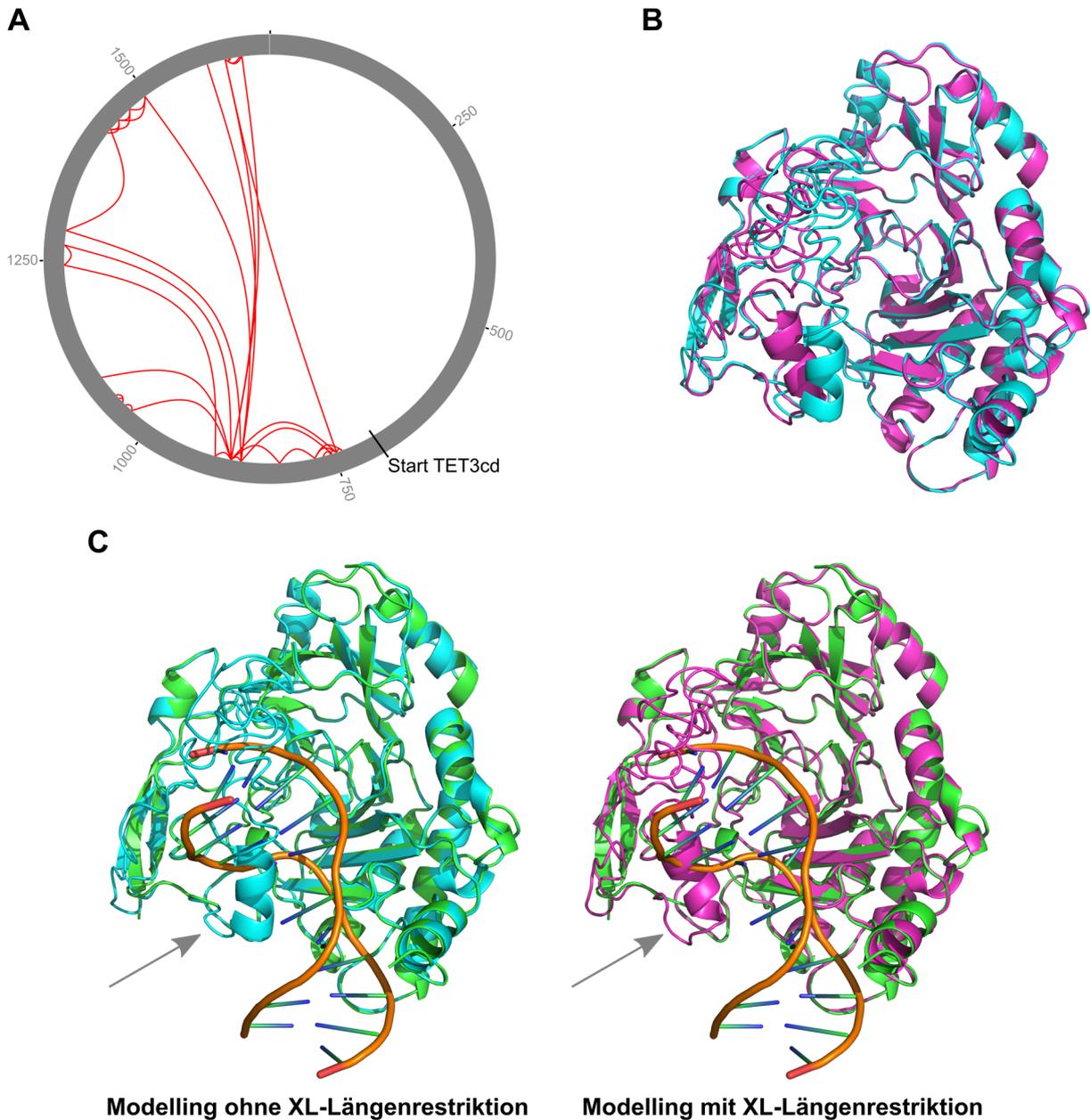


Abbildung 5.9: XL-MS³-Analyse der katalytischen Domäne von TET3. A) xVis-Darstellung der identifizierten DSSO-Crosslinks. Bei einer Falscherkennungsrate von 1 % konnten 48 CSMs und 37 Intraprotein-Crosslinks detektiert werden. Obwohl die gesamte TET3-Sequenz in Betracht gezogen wurde, konnten Crosslinks nur im TET3cd-Konstrukt (Aminosäuren 695 – 1668) identifiziert werden, welches für die Experimente verwendet wurde. B) Überlagerung der Strukturvorhersagen nach Modellierung der modifizierten TET3cd-Sequenz durch *I-TASSER* ohne (cyan) und mit (magenta) Verwendung der detektierten Crosslinker als Längenrestriktion. Obwohl die Modelle eine hohe Ähnlichkeit besitzen, steigt der von *I-TASSER* als Metrik errechnete C-Score von 0.25 durch Verwendung der XL-Informationen auf 0.33 an. C) Vergleich der erhaltenen Strukturmodelle mit der Kristallstruktur eines TET2cd-DNA-Komplexes (PDB: 4nm6, grüne Proteinstruktur). Beide Modelle zeigen eine hohe Übereinstimmung mit der Kristallstruktur von TET2cd. Durch Berücksichtigung der XL-Längenrestriktionen wird hauptsächlich die Position einer α -Helix (graue Pfeile) verändert, wodurch mehr Platz für die Bindung der DNA vorhanden wäre.

Obwohl die gesamte TET3-Sequenz in der Datenbanksuche zur XL-Identifikation verwendet wurde, konnten nur Crosslinks innerhalb der verwendeten TET3cd-Sequenz identifiziert werden. Dies ist ein Indiz für die Validität der Crosslinkdaten.

Durch die Detektion mehrerer Intraprotein-Crosslinks von TET3cd war es möglich, die erhaltenen Crosslinks als Längenrestriktionen zu verwenden und die nicht experimentell bekannte Proteinstruktur zu modellieren. Hierfür wurde der *I-TASSER*-Server von *Y. Zhang* verwendet.^[91, 147-149] *I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement)* verwendet die in der *Protein Data Bank* hinterlegten, experimentell bestimmten 3D-Strukturen, um Faltungstopologien ähnlicher Sequenzabschnitte als Template zu verwenden, aus denen nach Clustering- und Optimierungsschritten gesamte Proteinstrukturmodelle zusammengesetzt werden.

Um einen Vergleich der modellierten Struktur zu einer experimentellen Kristallstruktur zu ermöglichen, wurde eine Sequenzangleichung der TET3cd-Sequenz an die Sequenz eines kristallisierten TET2cd-DNA-Komplexes (PDB: 4nm6)^[150] durch den BLASTP-Algorithmus durchgeführt. Überlappende Sequenzabschnitte wurden kombiniert, um eine reduzierte TET3cd-Sequenz mit 465 Aminosäuren zu erhalten, welche zu 63 % mit der kristallisierten TET2cd-Struktur übereinstimmt. Nach einem Protokoll von *Orbán-Németh et al.* wurde diese Sequenz zunächst ohne Spezifizierung eines Templates zur Generation eines ersten Strukturmodells durch *I-TASSER* verwendet.^[91] Das generierte Modell mit dem höchsten *C-score*, welcher ein Maß für die Qualität der modellierten Strukturen darstellt und von -5 – 2 reichen kann, wurde ausgewählt und anschließend als Templat verwendet. Zusammen mit der Primärsequenz und den detektierten Intraprotein-XLs wurde anschließend erneut die Analyse über den *I-TASSER*-Server durchgeführt, um ein verfeinertes Strukturmodell zu erhalten. Eine Überlagerung der errechneten Strukturen ohne (cyan) und mit (magenta) Verwendung der XL-Längenrestriktionen ist in Abbildung 5.9B dargestellt. Obwohl kein großer Unterschied zwischen den Strukturen besteht, verbessert sich der *C-score* des Strukturmodells von 0.25 auf 0.33, wenn die Crosslinkdaten miteinbezogen werden. Die Verwendung der XL-Informationen verbesserte somit die errechnete Qualität der Strukturvorhersage.

Eine Überlagerung der modellierten Strukturen mit der experimentellen Kristallstruktur des TET2cd-DNA-Komplexes (Proteinstruktur in grün) ist in Abbildung 5.9C gezeigt. In beiden Fällen wurde die TET2cd-Struktur aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit automatisch von *I-TASSER* als Templat gewählt, was die große Ähnlichkeit der Strukturen erklärt. So kann beispielsweise in den modellierten Strukturen das für α -Ketoglutarat-benutzende Enzyme charakteristische DSBH (*double-stranded β -helix*)-Faltungselement, welches aus acht β -Faltblättern besteht, beobachtet werden.^[150] Durch die Miteinbeziehung der Crosslinkdaten wird vor allem die Position einer α -Helix in den modellierten Modellen beeinflusst (graue Pfeile). Während diese im Strukturmodell ohne XL-Längenrestriktion (cyan)

deutlich mit der Position der gebundenen DNA überlappt, steht im Strukturmodell nach Berücksichtigung der XL-Daten (magenta) durch die Verschiebung der Helix mehr Platz zur Bindung der DNA zur Verfügung. Obwohl es ohne weitere Experimente nicht möglich ist, die Richtigkeit der modellierten TET3cd-Struktur zu beurteilen, konnte erstmals ein Strukturmodell für eine reduzierte TET3cd-Sequenz erhalten und gezeigt werden, dass die detektierten Intraprotein-Crosslinks zur Verbesserung von Strukturvorhersagen verwendet werden können.

5.1.3 Entwicklung von anreicherbaren, Sulfoxid-basierten Crosslinkern

Mit dem bekannten, spaltbaren Crosslinker DSSO (**10**) war es möglich, sowohl die Probenvorbereitung als auch die MS-Analyse mit verschiedenen Methoden zu etablieren. Eine große Herausforderung bei der Analyse von Interprotein-XLs stellt jedoch deren geringe Abundanz dar. Für die Analyse von komplexen Proben ist es somit zwingend notwendig, eine Möglichkeit zur Anreicherung der modifizierten Peptide zu besitzen. Dabei sollte jedoch das vorteilhafte, einfache Fragmentierungsverhalten von DSSO (**10**) beibehalten werden, welches sich in bisherigen XL-Experimenten bewährte. Unter Beachtung dieser Voraussetzungen wurden die beiden Crosslinker HSAK (**13**) und HSAKp (**14**) entwickelt, welche in Abbildung 5.10 dargestellt sind.

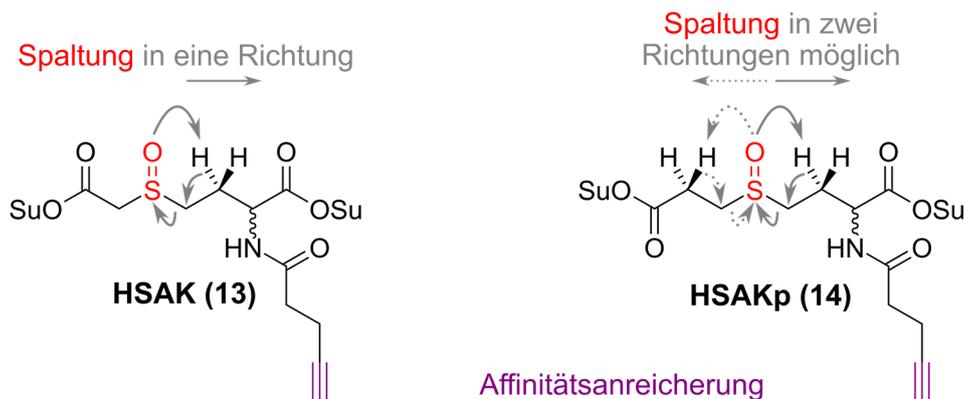
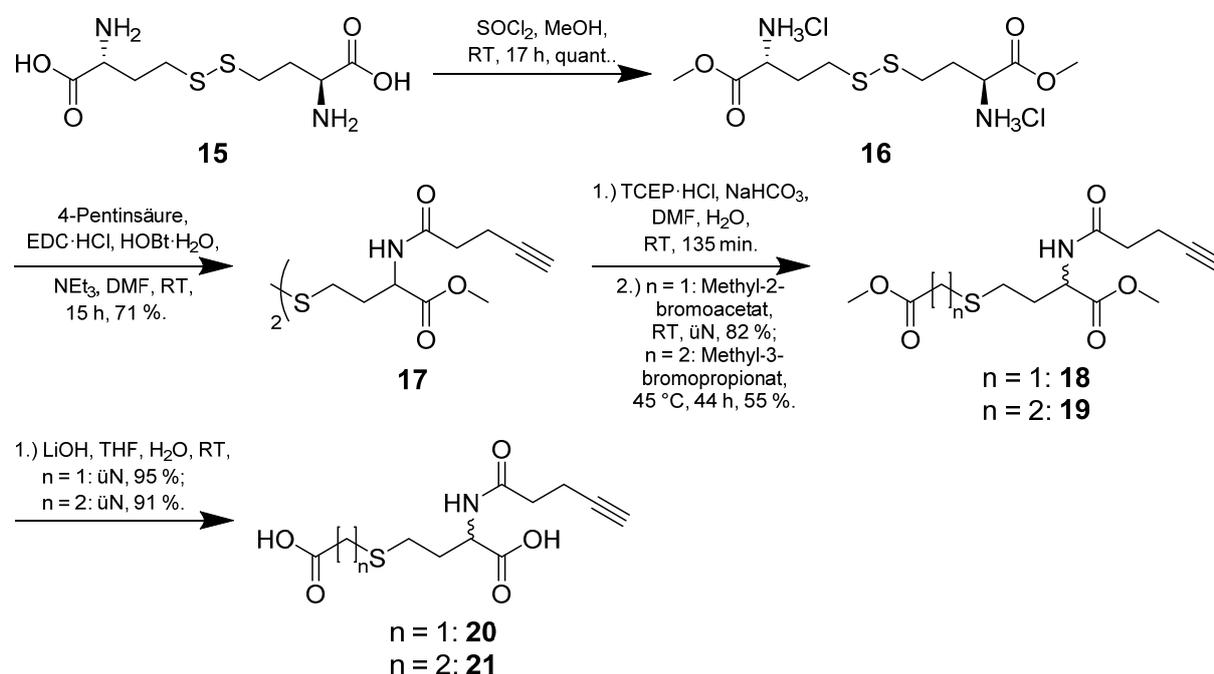


Abbildung 5.10: Strukturen der entwickelten, Sulfoxid-basierten Crosslinker HSAK (13**) und HSAKp (**14**).** In rot dargestellt ist die für die Fragmentierung verantwortliche Sulfoxid-Gruppe. Während HSAK (**13**) nur in eine Richtung spaltbar ist, kann die Fragmentierung bei HSAKp (**14**) in beide Richtungen erfolgen. Beide Crosslinker tragen eine Alkinfunktionalität (violett), über die eine Affinitätsanreicherung nach Modifikation durch CuAAC durchgeführt werden kann.

Beide Crosslinker verwenden Sulfoxid-Gruppen, um die effiziente Massenspaltbarkeit bei geringen Fragmentierungsenergien zu gewährleisten. Während die Spaltung bei HSAK (**13**) jedoch nur in eine Richtung erfolgen kann, befinden sich bei HSAKp (**14**) auf beiden Seiten des Sulfoxids β -Wasserstoffatome, wodurch die Fragmentierung in beide Richtungen möglich ist. Beide Reagenzien tragen zwei NHS-Estergruppen sowie eine Alkinfunktionalität. Diese ermöglicht es, über CuAAC-Reaktionen eine große Vielfalt an Affinitätsgruppen an die Crosslinker zu konjugieren. Anders als bei dem bekannten, ebenfalls anreicherbaren Crosslinker DSBSO (siehe Abbildung 3.13A) enthalten die entwickelten

Reagenzien nur eine Sulfoxid-Gruppe, wodurch sich das Fragmentierungsverhalten möglichst ähnlich zum etablierten Crosslinker DSSO (**10**) verhalten sollte.

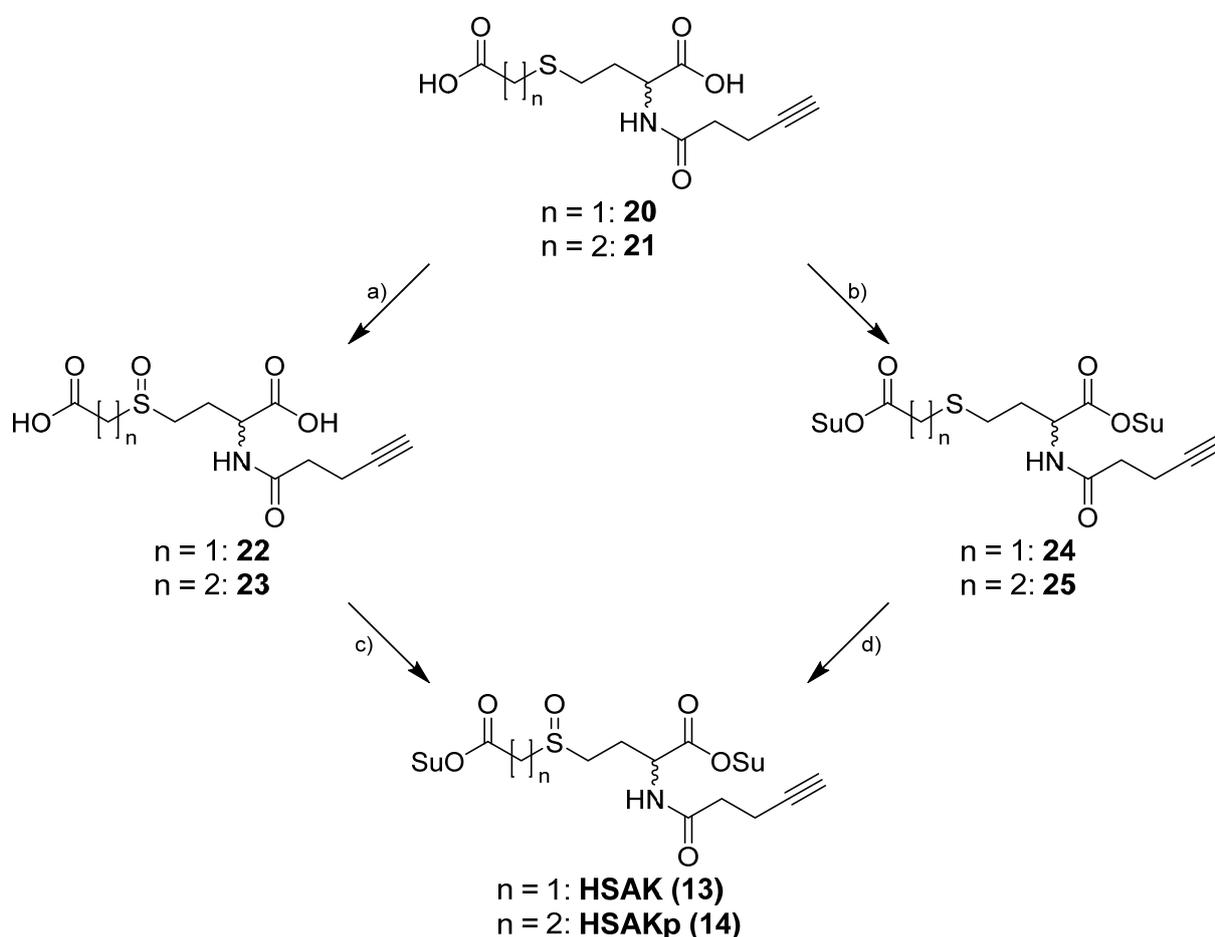
Die ersten Schritte der Synthese der beiden Crosslinker sind in Schema 5.3 dargestellt. DL-Homocystin (**15**) wurde als Startmaterial gewählt, da in diesem Molekül die Sulfide in Form einer Disulfidbrücke geschützt vorliegen und die ersten Schritte der Synthese so nicht stören. Disäure **15** wurde zunächst mit Thionylchlorid in Methanol als Dimethylester geschützt. Durch das bei der Reaktion entstehende HCl-Gas werden die Aminogruppen protoniert und können deswegen nicht mit den *in-situ*-gebildetem Säurechloriden reagieren. Das Dihydrochlorid **16** konnte so ohne weitere Aufreinigung in quantitativer Ausbeute erhalten werden.



Schema 5.3: Synthese der Crosslinker-Vorläufermoleküle 20 für HSAK und 21 für HSAKp.

Anschließend wurden die zur Affinitätsanreicherung benötigten Alkinfunktionalitäten durch Amidierung mit 4-Pentinsäure in das Molekül eingeführt. Dazu wurde eine EDC-vermittelte Kopplungsreaktion verwendet, welche das Produkt **17** nur dann in guten Ausbeuten liefern konnte, wenn eine äquimolare Menge an HOBt als nukleophiles Auxiliar verwendet wurde. Disulfid **17** konnte im nächsten Schritt mit TCEP reaktiv gespalten werden. An diesem Punkt der Synthese waren die beiden verschiedenen Crosslinker HSAK (**13**) und HSAKp (**14**) zugänglich, indem zur Eintopfreaktion entweder Methyl-2-bromoacetat oder Methyl-3-bromopropionat gegeben wurde. Aufgrund der geringeren Elektrophilie von Methyl-3-bromopropionat war es bei der Herstellung des HSAKp-Vorläufers allerdings notwendig, die Reaktion auf 45 °C zu erhitzen und die Reaktionsdauer zu erhöhen. Dimethylester **18** und **19** konnten im nächsten Schritt mit Lithiumhydroxid hydrolysiert werden, um Disäuren **20** und **21** zu erhalten.

Zur Fertigstellung der Crosslinkermoleküle mussten sowohl die NHS-Ester eingefügt werden als auch die Oxidation zum Sulfoxid erfolgen. Um funktionale Reagenzien in sehr hoher Reinheit erhalten zu können, wurden beide möglichen Reaktionsabfolgen untersucht, welche in Schema 5.4 gezeigt sind. Zunächst wurden Disäuren **20** und **21** mit *meta*-Chlorperbenzoesäure zu den entsprechenden Sulfoxiden **22** und **23** oxidiert (Reaktion a)). Die Oxidation verlief in beiden Fällen rasch und in guten Ausbeuten. Da die Löslichkeit der hochpolaren Sulfoxide in Ethylacetat gering war, konnten sie durch Filtration der Reaktionslösung und Waschen mit Ethylacetat in hohen Reinheiten isoliert werden. Allerdings war es nach Umsetzung zu NHS-Estern **13** und **14** (Reaktion c)) schwierig, die polaren Nebenprodukte von den vollständigen Crosslinkreagenzien zu entfernen. Durch intensives Waschen mit verschiedenen Lösungsmitteln konnten HSAK (**13**) und HSAKp (**14**) durch diese Reaktionssequenz in Ausbeuten von 38 % bzw. 45 % erhalten werden, waren aber noch mit Rückständen an NHS verunreinigt.



Schema 5.4: Synthese der Crosslinker HSAK (13) und HSAKp (14). a) $n = 1$: *m*CPBA (77 %), AcOEt, 35 °C → 0 °C, 15 min, 71 %; $n = 2$: RT, 60 min, 82 %. b) $n = 1$: Pyridin, NHS-TFA, DMF, 0 °C → RT, 90 min, 73 %; $n = 2$: 3 h, 83 %. c) $n = 1$: Pyridin, NHS-TFA, DMF, 2.5 h, 38 %; $n = 2$: 95 min, 45 %. d) $n = 1$: *m*CPBA, AcOEt, 0 °C → RT, 15 min, 93 %; $n = 2$: RT, 30 min, 57 %.

In der anderen Reaktionssequenz erfolgte zunächst die Umsetzung zu Di-NHS-Estern **24** und **25** (Reaktion b)). Diese Moleküle waren unpolar genug, um die Reaktionslösung mit DCM zu verdünnen und anschließend mit saurem und basischem Wasser waschen zu können. Durch die Waschstschritte kam es

zwar zur teilweisen Hydrolyse der Aktivester, aber durch die Durchführung der basischen Waschschriffe am Ende der Aufreinigung konnten die Hydrolyseprodukte effizient abgetrennt werden. Zur Vollendung der Crosslinker-Synthesen wurde die Oxidation mit *m*CPBA in diesem Weg am Ende der Synthese durchgeführt (Reaktion d)). Die entstehende *meta*-Chlorbenzoesäure konnte hier gut abgetrennt werden, indem die Crosslinker HSAK (**13**) und HSAKp (**14**) durch Fällungen nach Verdünnen der Reaktionslösung mit DCM und *iso*-Hexan aufgereinigt wurden. So konnten beide Crosslinking-Reagenzien in hoher Reinheit erhalten werden. Die sechsstufigen Synthesen erfolgten dabei mit guten Gesamtausbeuten von 37.5 % für HSAK (**13**) und 16.8 % für HSAKp (**14**).

Nach der erfolgreichen Darstellung von HSAK (**13**) und HSAKp (**14**) sollte das Fragmentierungsverhalten der Crosslinker untersucht werden. Dazu wurde zunächst erneut das Arginin-Testsystem verwendet, um möglichst wenig komplexe MS²-Spektren zu erhalten. Die Analyse der Crosslink-Proben erfolgte dabei an einem *Q Exactive HF*-Massenspektrometer, wodurch *in-source CID* und HCD als Fragmentierungsmethoden zur Verfügung standen.

Das MS²-Spektrum nach Selektion und Fragmentierung des Arginin-HSAK-Arginin²⁺-Ions ist in Abbildung 5.11 gezeigt. Hierbei wurde die Fragmentierung bei einer normalisierten HCD-Energie von 15 % durchgeführt, um die Effizienz der Spaltung bei einer geringen Energie beurteilen zu können. Wie erwartet kommt es in der Gasphase nach Aktivierung zu einer Sulfoxid-Fragmentierung durch Abstraktion eines β -H-Atoms (Abbildung 5.11A, orange). Dabei entstehen sowohl ein Alken- als auch ein Sulfensäurefragment. Letzteres kann unter Wasserabspaltung weiter zu einem Thial zerfallen, was auch bei der analogen Spaltung von DSSO-quervernetzten Peptiden beobachtet wird. Die Wasserabspaltung scheint hier nur zu einem kleinen Anteil abzulaufen, da das Thialfragment in geringer Intensität beobachtet wird. Obwohl die erwarteten Alken- und Sulfensäurefragmente intensiv detektiert werden können, ist bei der verwendeten Energie auch noch das doppelt geladene Vorläuferion in einer relativen Intensität von etwa 40 % sichtbar (Abbildung 5.11B). Für eine vollständige Fragmentierung und die Generierung der Fragmentionen in maximaler Intensität müsste die Fragmentierungsenergie somit noch erhöht werden. Interessanterweise kommt es bereits bei der verwendeten Energie nicht nur zur erwarteten Sulfoxid-Spaltung, sondern auch zur homolytischen Spaltung des Crosslinkers. Bei diesem Fragmentierungsweg (Abbildung 5.11A, türkis) bilden sich zwei stabilisierte Radikale aus, welche ebenfalls im MS²-Spektrum detektiert werden können. Das Sulfoxid-Radikal (Radikal B) besitzt dabei eine höhere Intensität als das Amid-stabilisierte primäre Radikal A, was durch unterschiedliche Stabilitäten auftreten könnte. Durch das Auftreten des zweiten Fragmentierungswegs bilden sich zwei Massenpaare mit 48.97 Da Unterschied aus, welche zur Δm -basierten Identifikation der Crosslinkersignale verwendet werden könnten (siehe Abbildung 3.14).

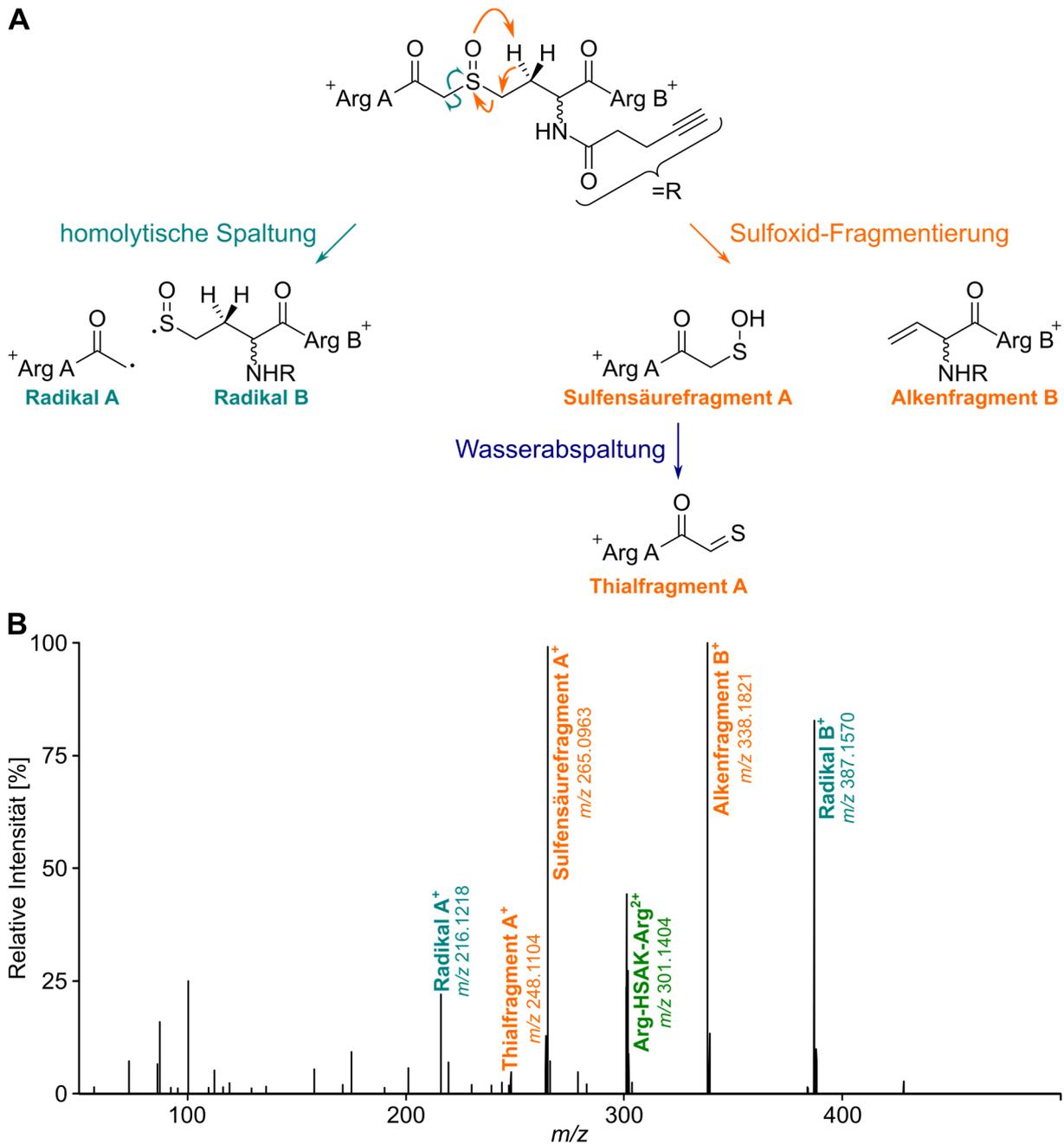
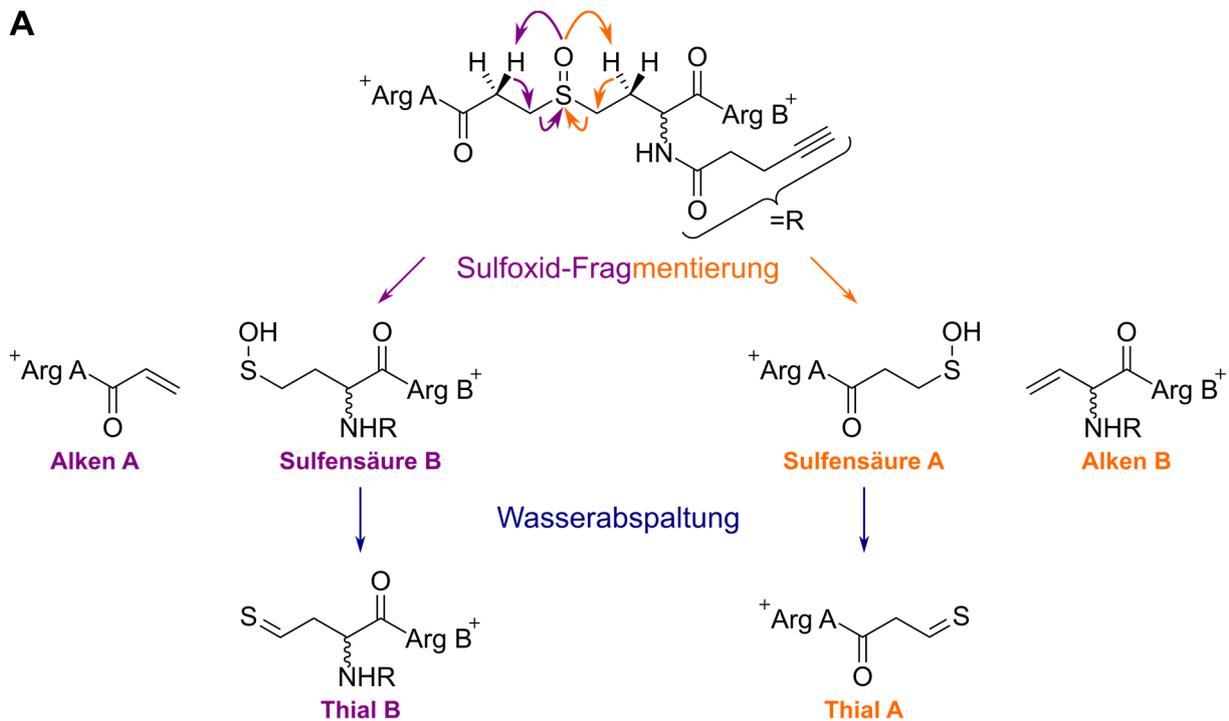


Abbildung 5.11: Fragmentierung eines Arginin-HSAK-Arginin-Crosslinks. A) Mechanismen der beobachteten Fragmentierungen. Die erwartete Sulfoxid-Fragmentierung (orangene Pfeile) führt nach Abstraktion eines β -H-Atoms zur Bildung eines Alken- und eines Sulfensäurefragments. Letzteres zerfällt unter Wasserabspaltung weiter zu einem Thialfragment. Zusätzlich zum erwarteten Fragmentierungsmechanismus kann es auch zur homolytischen Spaltung des Crosslinkers kommen (türkise Pfeile), was zur Bildung zweier Radikale führt. Die Arginine beider Richtung sind durch die Buchstaben A und B unterschieden. B) MS²-Spektrum des Arg-HSAK-Arg²⁺-Ions bei einer normalisierten HCD-Energie von 15 %. Zwar kann bei dieser Energie das Vorläuferion noch mit einer Intensität von etwa 40 % detektiert werden, jedoch dominieren die erwarteten Sulfensäure- und Alkenfragmente das Spektrum.

In einem analogen Experiment wurde die Fragmentierung von Arginin-HSAKp-Arginin-Crosslinks untersucht. Die beobachteten Fragmentierungswege und das resultierende MS²-Spektrum sind in Abbildung 5.12 dargestellt. Prinzipiell ist bei der Verwendung von HSAKp als Crosslinker durch das Vorhandensein von β -H-Atomen beidseitig des Sulfoxids die Fragmentierung in beide Richtungen möglich (Abbildung 5.12A). Bei Betrachtung des MS²-Spektrums, welches erneut bei einer normalisierten HCD-

Energie von 15 % erzeugt wurde, sind deutlich die Signale zu erkennen, welche aus beiden Fragmentierungswegen hervorgehen (Abbildung 5.12B).

A



B

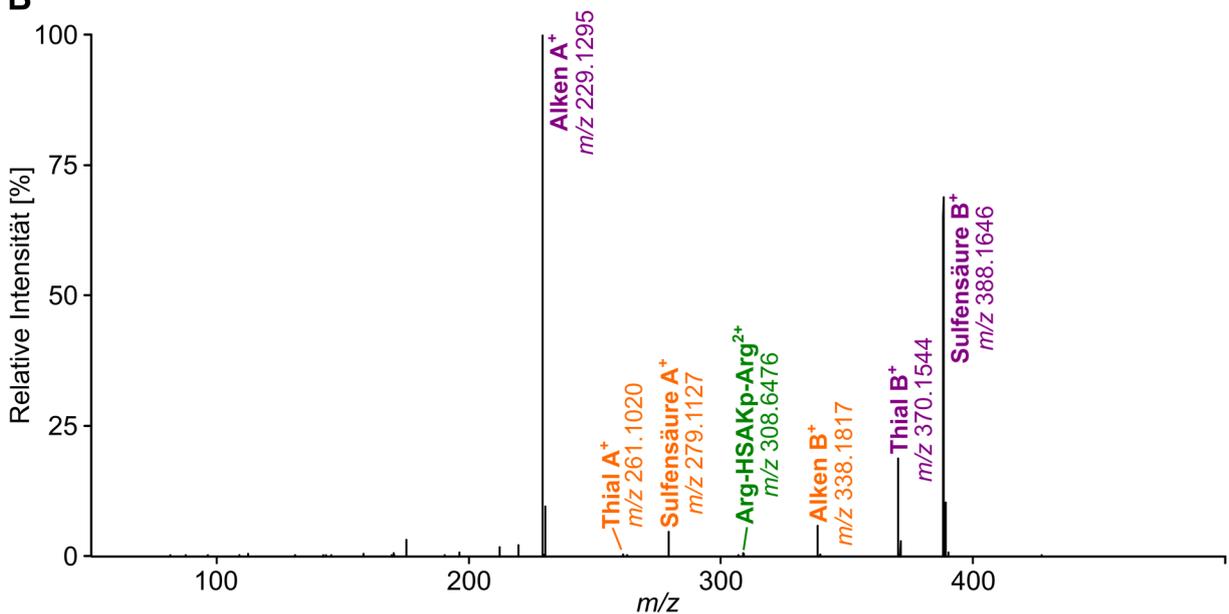


Abbildung 5.12: Fragmentierung eines Arginin-HSAKp-Arginin-Crosslinks. A) Mechanismen der beobachteten Fragmentierungen. Wie durch die Struktur erwartet, kann die Sulfoxid-Fragmentierung in beide Richtungen erfolgen, da auf beiden Seiten des Sulfoxids β -H-Atome zur Abstraktion zu Verfügung stehen. Die Arginine auf beiden Seiten sind mit A und B gekennzeichnet. B) MS²-Spektrum des Arg-HSAKp-Arg²⁺-Ions bei einer normalisierten HCD-Energie von 15 %. In diesem Spektrum wird deutlich, dass die Fragmentierung in Richtung der violetten Pfeile bevorzugt abzulaufen scheint, da so das konjugierte Alken A-Fragment entsteht. Die Produkte des orangenen Fragmentierungsweges sind in geringeren Intensitäten sichtbar. Bei der verwendeten Energie kann das Vorläuferion nur in einer sehr geringen Intensität detektiert werden, was die effiziente Fragmentierung bei geringer Energie zeigt.

Anders als bei der Fragmentierung von HSAK, bei welcher die Produkte der Sulfoxid-Fragmentierung in etwa der gleichen Intensität entstanden, können bei der Fragmentierung von HSAKp Unterschiede

in den resultierenden Fragment-Intensitäten beobachtet werden. Am intensivsten bilden sich das Alken A- und das Sulfensäure B-Fragment (violetter Fragmentierungsweg, Abbildung 5.12A), was durch die bevorzugte Bildung des konjugierten Systems im Alken A-Fragment während des Fragmentierungsprozesses erklärt werden könnte, weswegen die Spaltung bevorzugt in eine Richtung abläuft. Die Intensität des Sulfensäure B-Fragments wird durch die Bildung des Thial B-Fragmentes nach Wasserabspaltung, analog zu den Fragmentierungsprozessen von DSSO und HSAK, reduziert. Verläuft die Spaltung in Richtung der Affinitätsgruppe (oranjer Fragmentierungsweg), so entstehen Alken B, Sulfensäure A und Thial A in deutlich geringeren Intensitäten. Das Auftreten beider Spaltungswege in die unterschiedlichen Richtungen könnte zur Implementierung einer Δm -ausgelösten MS^3 -Methode genutzt werden, bei welcher der Massenunterschied zwischen den Alken- und Sulfensäure-Fragmenten (49.98 Da) zur Identifikation der Crosslinkersignale benutzt werden kann. In bestehenden Methoden zur Analyse von DSSO werden häufig vier Ionen für MS^3 -Scans ausgewählt, um die Produktpaare beider Spaltungsrichtungen zu erfassen. Da im untersuchten Fall die Spaltungseffizienzen jedoch asymmetrisch sind und die Produkte des roten Fragmentierungsweges in Abbildung 5.12A deutlich intensiver gebildet werden, könnte eine Methode implementiert werden, welche lediglich die intensiven Alken A und Sulfensäure B-Ionen isoliert und fragmentiert. Die Produkte des weniger effizienten, orangenen Fragmentierungsweges würden nur als Reportersignale fungieren und müssten nicht zusätzlich fragmentiert werden. So würde es ausreichen, zwei statt vier Ionen einer MS^3 -Analyse zu unterziehen, wodurch sich die Scanzklusdauer verringern würde. Die Effizienz der Crosslinker-Fragmentierung von HSAKp im Ganzen ist höher als bei HSAK, da bei Verwendung der gleichen normalisierten HCD-Energie nur noch ein sehr geringes Signal des Vorläuferions detektierbar ist.

Mit diesen MS^2 -Experimenten konnte gezeigt werden, dass beide synthetisierten Crosslinker bei niedrigen HCD-Energien gespalten werden können und sich die erwarteten Fragmente in hohen relativen Intensitäten bilden. Daraufhin sollte die Effizienz der Crosslinker-Fragmentierung quantifiziert werden, um einen direkten Vergleich zwischen den Crosslinkern DSSO, HSAK und HSAKp zu ermöglichen. Dazu wurden *pseudo-MS²*-Experimente durchgeführt, bei welchen sich Full-Scans mit SID-Scans (*Source Induced Dissociation*) unterschiedlicher Energien abwechselten. Die Intensität von Arginin-XL-Arginin²⁺-Crosslinks nach Spaltung im SID-Scan wurde daraufhin mit dem Mittelwert der XL-Intensitäten im vorherigen und nachfolgenden Full-Scan verglichen. Dadurch stand ein System zur Verfügung, in welchem erstmals die relativen Fragmentierungseffizienzen bei unterschiedlichen *in-source* CID-Energien quantifiziert werden konnten. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Im direkten Vergleich fragmentiert DSSO etwas effizienter bei geringen Energien als HSAK und HSAKp. Dies könnte beispielsweise durch die erhöhte Ladungsdichte erklärt werden, welche durch die kürzere Linkerdistanz zustande kommt. Zusätzlich bilden sich bei der Fragmentierung von DSSO nach der Spaltung in beide Richtungen jeweils konjugierte Alkenfragmente aus, wodurch die Fragmentierung insgesamt

effizienter ablaufen könnte (siehe Abbildung 3.13C). Wie von den MS²-Experimenten erwartet, konnte durch die Quantifizierung der Fragmentierung auch gezeigt werden, dass HSAKp effizienter gespalten wird als HSAK. Oberhalb einer *in-source* CID von etwa 35 eV verschwinden jedoch die Unterschiede zwischen den Spaltungseffizienzen der verschiedenen Crosslinker, da diese dann vollständig gespalten vorliegen. Alle untersuchten Crosslinker spalten somit effizient genug, um in *pseudo*-MS³-Experimenten eingesetzt zu werden, da diese bei einer Energie zwischen 35 eV und 45 eV durchgeführt werden. Durch die beobachtete Fragmentierung der neu entwickelten Crosslinker sowohl bei *in-source* CID als auch bei HCD-Bedingungen und dem Vergleich mit den durchgeführten DSSO-Experimenten ist es sehr wahrscheinlich, dass die Fragmentierung auch bei Ionenfallen-CID-Bedingungen zur Durchführung von MS³-Experimenten effizient ablaufen sollte.

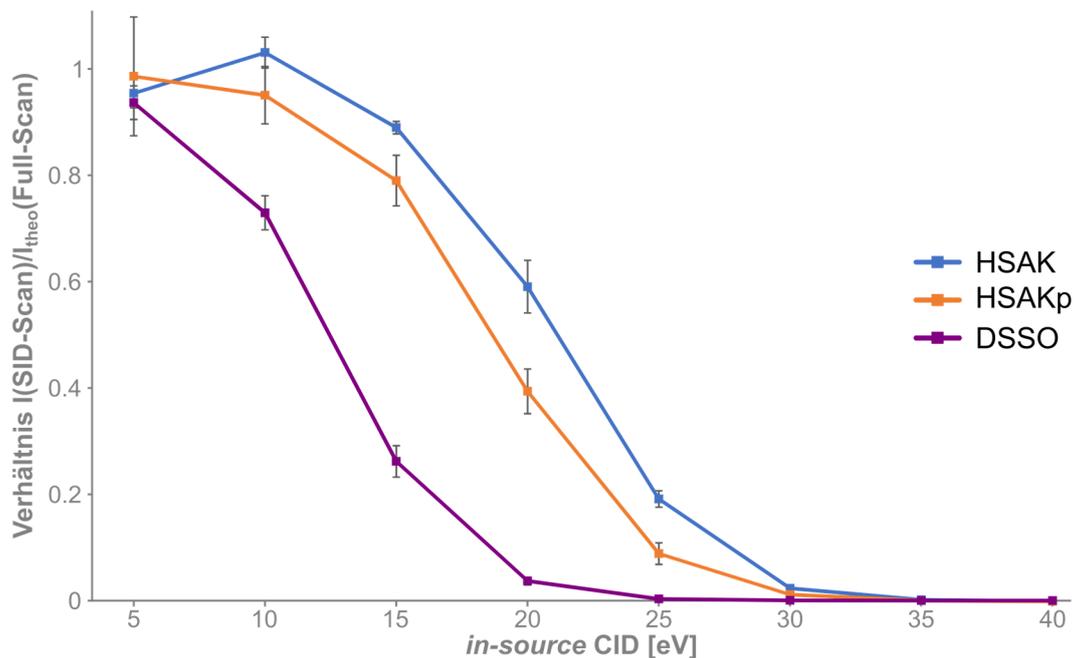


Abbildung 5.13: Vergleich der Fragmentierungseffizienz der Crosslinker HSAK (13), HSAKp (14) und DSSO (10). Verschiedene *in-source* CID-Energien wurden verwendet, um Arg-XL-Arg²⁺-Ionen zu fragmentieren. Das Verhältnis der Ionen-Intensität im Fragmentierungsscan zur extrapolierten Intensität im Full-Scan wurde zur Analyse über der verwendeten *in-source* CID-Energie aufgetragen. Der HSAKp-Crosslinker scheint etwas effizienter zu fragmentieren, als der HSAK-Crosslinker, was durch das Vorhandensein von zusätzlichen β -H-Atomen erklärt werden könnte. DSSO fragmentiert im Vergleich noch effizienter, eventuell bedingt durch die mit der kürzeren Linkerdistanz einhergehende höhere Ladungsdichte. Bei Energien oberhalb von 30 eV, welche üblicherweise für *pseudo*-MS³-Experimente verwendet werden, spalten jedoch alle untersuchten Crosslinker vollständig. Für alle Messpunkte wurden mindestens sechs Messwerte verwendet.

Zur weiteren Untersuchung der neu entwickelten Crosslinker wurde BSA als Modellprotein gewählt, um die Vergleichbarkeit mit den vorherigen DSSO-Daten zu gewährleisten. Zunächst wurde zur Etablierung der Crosslinker-Methoden vor allem der HSAKp-Crosslinker verwendet, da die Sulfoxid-Spaltung in diesem Crosslinker effizienter verläuft als bei HSAK. Dies ist vor allem bei der Durchführung von MS²-Experimenten wichtig, in welchem der Crosslinker und die verbundenen Peptide gemeinsam fragmentiert werden. Die Messungen wurden auf einem *Q Exactive HF*-Massenspektrometer durchgeführt. Zur Analyse der Daten kam für diese Experimente *MeroX* zum Einsatz, da die asymmetrischen

Spaltung von HSAKp nicht von *xLinkx* unterstützt wurde.^[101] Des Weiteren wurden zusätzlich zu Lysin-Lysin-Crosslinks auch Crosslinks zwischen Lysin und Serin, Threonin und Tyrosin zugelassen, da vorherige Experimente gezeigt haben, dass diese Crosslinks auch zu etwa 40 % in den untersuchten Proben vorkommen und diese Reaktionsprodukte von NHS-Ester-Crosslinkern literaturbekannt sind.^[108] Die Ergebnisse der MS-Analysen von BSA sind in Abbildung 5.14 dargestellt.

Die Fortschritte der Optimierung des Crosslinking-Experiments sind in Abbildung 5.14A gezeigt. Wurden die Experimente nach dem ursprünglichen XL-Protokoll durchgeführt, welches auch zur Erzeugung der DSSO-BSA-Proben verwendet wurde, konnten mit HSAKp 17 CSMs detektiert werden. Dies waren weniger Crosslinks, als beim vergleichbaren DSSO-Experiment, in welchem 29 CSMs identifiziert werden konnten.

Um die Diskrepanz zwischen den Crosslinkern zu verringern, wurde das Crosslinking-Protokoll optimiert. Die Konzentration des Crosslinkers wurde von 5 mM auf 1 mM reduziert, um die Bildung von Monolinks zu verringern. Gleichzeitig wurde das Verdauprotokoll des gecrosslinkten BSA überarbeitet. Da durch die Quervernetzung der Aminosäuren der enzymatische Verdau erschwert wird, wurde vor allem ein effizienterer Verdau der Proteinprobe angestrebt. Um dies zu erreichen, wurde die Proteinprobe nach Crosslinking, Reduktion und Alkylierung der Cystein-Seitenketten durch IAA einer Acetonfällung unterzogen, um störende kleine Moleküle zu entfernen. Die Resuspension der erhaltenen Proteinpräzipitate erfolgte bei 37 °C mit 6 M Guanidiniumchlorid, um eine möglichst gute Löslichkeit der Proteine im Verdauopuffer zu gewährleisten. Für den proteolytischen Verdau der Proteine wurde zusätzlich zum üblicherweise verwendeten Trypsin auch Lys-C verwendet, welches C-terminal von Lysin schneidet und die allgemeine Verdaueffizienz deutlich erhöht. Um die erhaltenen Peptide aufzuräumen und zu entsalzen, wurde ein C₁₈- anstelle eines kombinierten Kationentauscher-Umkehrphasenmaterials verwendet. Diese Modifikationen des Protokolls führten zu einer deutlichen Erhöhung der detektierten CSMs und der damit verbundenen Anzahl der individuellen XL-Stellen auf 73 bzw. 38 bei einer Falscherkennungsrate von 1 %.

Wurde das Experiment nach dem gleichen Protokoll mit DSSO wiederholt, konnten 65 CSMs und 45 individuelle XL-Stellen detektiert werden. Dies zeigt, dass trotz der komplexeren Struktur von HSAKp vergleichbare Ergebnisse zum etablierten DSSO-Crosslinker erhalten werden können, gleichzeitig aber die Möglichkeit zur Anreicherung durch die zusätzliche Alkin-Funktionalität gegeben ist. Bei der Verwendung von HSAK konnten jedoch lediglich 15 CSMs detektiert werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass dieser Crosslinker besser für MS³-Messungen geeignet ist, bei welchen die Sulfoxid- und Peptidfragmentierung nacheinander ablaufen.

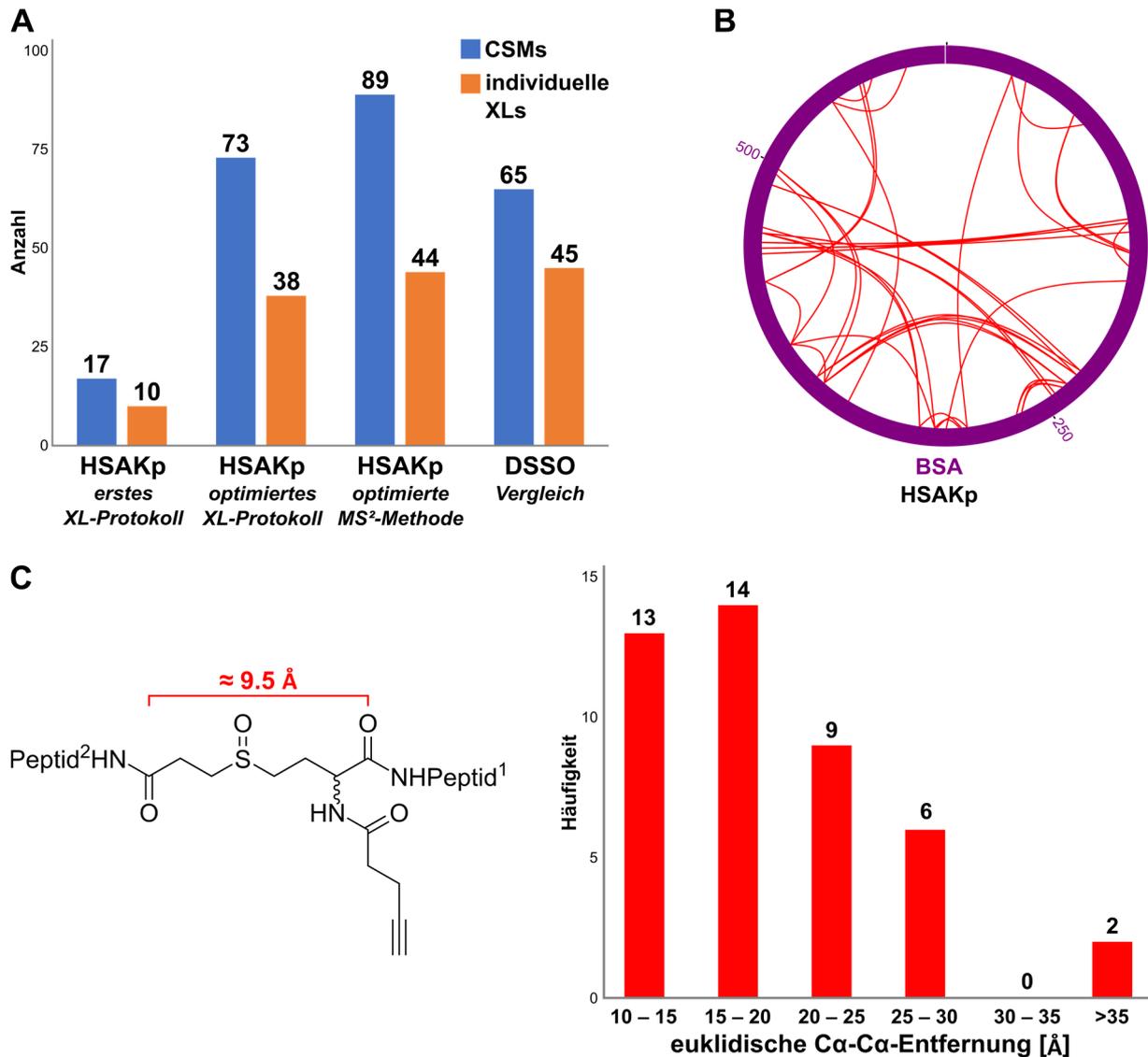


Abbildung 5.14: Resultate von MS²-Experimenten an BSA-HSAKp-Proben. Alle dargestellten Crosslinks wurden bei einer Falscherkennungsrate von 1 % identifiziert. A) Anzahl der erhaltenen CSMs (blau) und der individuellen XL-Stellen (orange) bei der Analyse gecrosslinkter BSA-Proben. Durch die Optimierung des XL-Protokolls und einer Verbesserung der MS²-Methode konnten eine höhere Anzahl HSAKp-Crosslinks identifiziert werden. Der Vergleich mit DSSO (optimiertes XL-Protokoll) zeigt, dass trotz der komplexeren Struktur von HSAKp ähnliche Ergebnisse erhalten werden. B) xVis-Darstellung der detektierten Crosslinks in der BSA-Probe nach Optimierung der MS²-Methode. C) Struktur des HSAKp-Crosslinkers nach Reaktion und Histogramm der gemessenen Ca-Ca-Entfernungen der quervernetzten Aminosäuren in der BSA-Kristallstruktur (PDB: 4f5s). Unter Berücksichtigung der XL-Länge, der Seitenketten-Länge und der konformellen Flexibilität der Aminosäuren wird eine maximal mögliche Ca-Ca-Entfernung von etwa 30 Å angenommen. Die Mehrheit der detektierten Crosslinks (>95 %) sind somit in Einklang mit der BSA-Kristallstruktur.

Bei der Analyse der erhaltenen MS²-Spektren zur Identifikation der quervernetzten Peptide fiel jedoch auf, dass diese häufig von geringer Qualität waren. Dies kommt dadurch zustande, dass sich die Anzahl der gebildeten Fragmentionen nicht nur auf ein Peptid beschränkt, sondern zwei Peptide umfasst und von der Crosslinker-Fragmentierung abhängig ist. Dadurch wird die Signalintensität des Vorläuferions auf viele Fragmente aufgeteilt, was zu verringerten Intensitäten der Fragmentionen führt. Durch eine Modifikation der MS²-Methode sollte die Qualität der MS²-Spektren verbessert werden. Zunächst wurde die maximal erlaubte Injektionszeit zum Erreichen einer höheren Ionenzahl von 100 ms auf

125 ms erhöht. Gleichzeitig wurde die angestrebte Anzahl an Ladungen, welche zur Fragmentierung gesammelt werden sollen, von 1E5 auf 2E5 verdoppelt und die minimale Intensität zur Auslösung eines MS²-Scans auf 8E5 erhöht. Mit Hilfe dieser Methoden-Variation war es möglich, die Anzahl der bei einer Falscherkennungsrate von 1 % identifizierten CSMs aus derselben Probe von 73 auf 89 zu erhöhen, was einer Steigerung von 22 % entspricht. Auch die Nummer an individuell detektierten Crosslink-Stellen stieg durch Messung mit der optimierten Methode an.

Somit war es möglich, in einer einzigen Messung ohne vorherige SEC-Fraktionierung der Probe eine hohe Anzahl an Crosslinks mit BSA zu erhalten. Die *xVis*-Darstellung der identifizierten Crosslinks ist in Abbildung 5.14B abgebildet. Im Vergleich mit den vorherigen DSSO-Messungen kann ein fast vollständiger Überlapp zwischen den erhaltenen individuellen Crosslink-Stellen beobachtet werden. Um die Validität der identifizierten Crosslinks weiter zu überprüfen, wurden die entsprechenden euklidischen α - α -Abstände in einer BSA-Kristallstruktur (PDB: 4f5s) vermessen. Die Häufigkeiten der auftretenden gemessenen Distanzen sind in Abbildung 5.14 dargestellt. Für den Vergleich zwischen den gemessenen und durch die Crosslinkerlänge möglichen Distanzen musste zunächst die Länge des Crosslinkers abgeschätzt werden. Eine Analyse der maximal ausgedehnten Struktur in der *Chem3D*-Software ergab eine Distanz zwischen den beiden Amidengruppen des Crosslinkers von etwa 9.5 Å für HSAKp und 7.7 Å für DSSO. In Publikationen wird jedoch häufig eine maximale *Spacer*länge von 11.4 Å für DSSO genannt, was bedeutet, dass die Länge des HSAKp-*Spacers* vermutlich unterschätzt wird.^[91] Zusammen mit den Flexibilität der Aminosäure-Seitenketten und unter Berücksichtigung von konformationellen Dynamiken kann eine maximal durch HSAKp verbundene α - α -Distanz von 30 – 35 Å angenommen werden. Somit befindet sich die große Mehrheit der gemessenen Distanzen in der BSA-Kristallstruktur im Einklang mit der HSAKp-Struktur. Dies zeigt deutlich, dass HSAKp selbst ohne Anreicherung dazu verwendet werden kann, detaillierte strukturelle Informationen über Proteine zu gewinnen.

Die universelle Anwendbarkeit von HSAKp sollte durch das Crosslinking weiterer aufgereinigter Proteine gezeigt werden. Dazu wurden fünf Proteine, welche aufgereinigt zur Verfügung standen, ausgewählt, alle nach demselben Protokoll gecrosslinkt und anschließend durch die optimierte MS²-Methode analysiert. Die Resultate der Experimente sind durch *xVis*-Darstellungen in Abbildung 5.15 dargestellt.

Für alle untersuchten Proteine war es möglich, ohne weitere Anreicherung eine Vielzahl an CSMs und individuellen Crosslinkstellen bei einer Falscherkennungsrate von 1 % zu detektieren. Lediglich im Falle von eGFP (grün) konnten vergleichsweise wenige Crosslinks identifiziert werden, was durch dessen sehr stabile β -Fasstruktur erklärt werden könnte, welche den proteolytischen Verdau deutlich erschwert. In den restlichen Proben schien es keinen Unterschied zu machen, ob kleinere Proteine wie beispielsweise die humane Carboanhydrase 2 (hCA2, 260AA, pink) und das DNA-Reparaturenzym XPA

(273AA, gelb) oder Proteine mittlerer Größe wie eine Mutante der DNA-Polymerase 1 (Bst Pol1, 579 AA, blau) analysiert wurden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das optimierte XL-Protokoll und die entwickelte MS²-Methode robust genug sind, um MS²-XL-Experimente ohne Anreicherung an verschiedenen Proteinproben durchzuführen, wodurch die routinemäßige Strukturanalyse reiner Proteinproben ermöglicht wird.

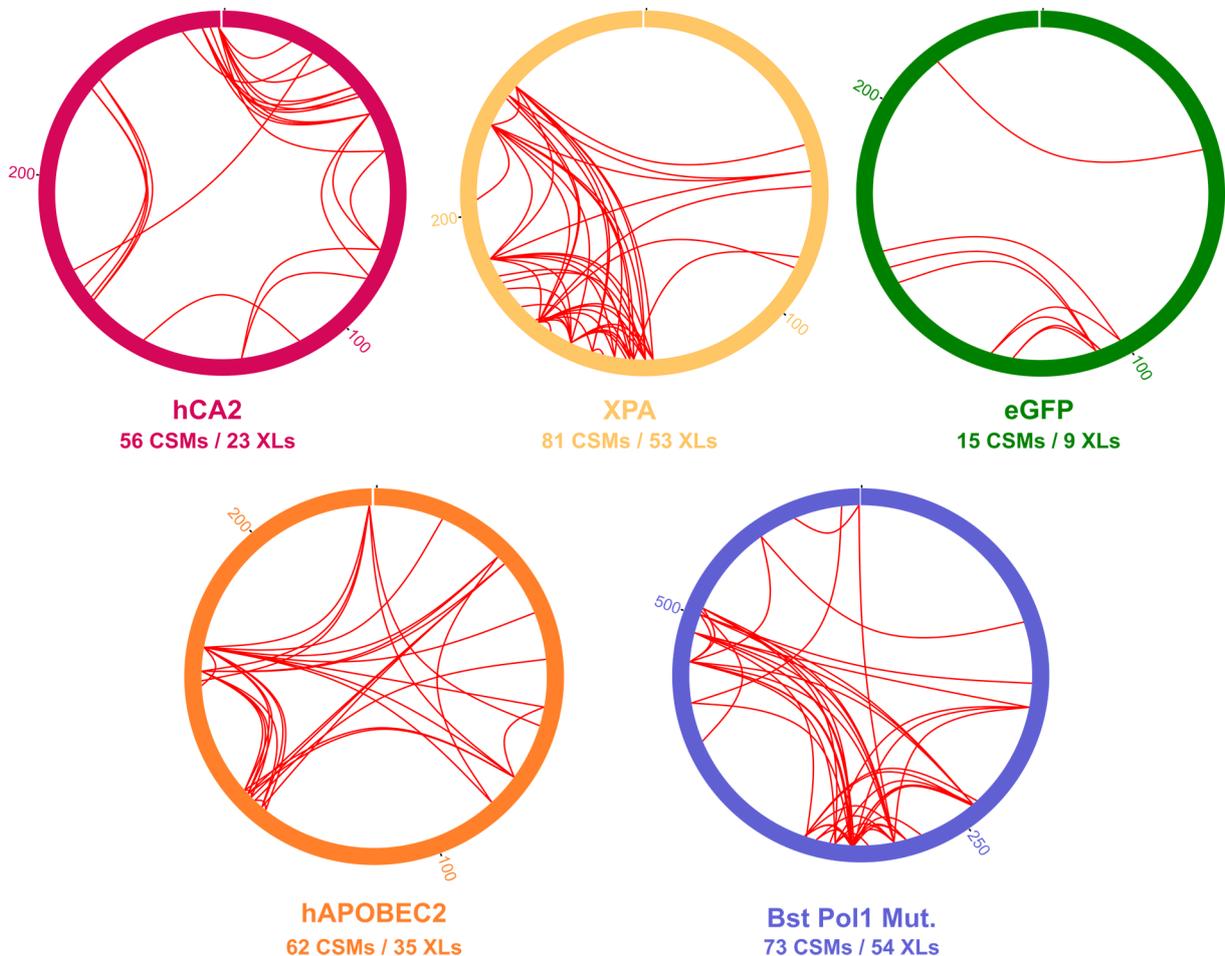


Abbildung 5.15: xVis-Darstellungen von HSAKp-MS²-Experimenten diverser Proteine. Alle Crosslinks wurden bei einer Falscherkennungsrate von 1 % identifiziert.

Um eine komplexere Probe zu untersuchen und den Effekt einer SEC-Fraktionierung auf mit HSAKp-quervernetzte Peptide zu evaluieren, wurde erneut das tRPA-Testsystem nach dem optimierten XL-protokoll behandelt und anschließend vor und nach Fraktionierung durch SEC analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 5.16 dargestellt.

Bereits bei Analyse der Probe ohne vorherige Fraktionierung (Abbildung 5.16A) kann durch die beschriebenen Verbesserungen eine vergleichbare Anzahl an Crosslinks erhalten werden, wie bei vorherigen DSSO-Experimenten nach der SEC-Fraktionierung (siehe Abbildung 5.7). Die identifizierten Crosslinks in beiden Experimenten stimmen größtenteils überein, was für die Validität der erhaltenen

Längenrestriktionen spricht. Geringe Unterschiede könnten durch die unterschiedlichen Linkerlängen von DSSO und HSAKp erklärt werden.

Nach Anreicherung der Crosslinks über die SEC-Fraktionierung der Probe konnten wie in vorherigen Experimenten deutlich mehr CSMs und individuelle Crosslink-Stellen identifiziert werden, als ohne Fraktionierung (Abbildung 5.16B). Durch die Analyse von vier SEC-Fractionen konnte etwa die vierfache Anzahl an CSMs verglichen mit der Analyse vor der Fraktionierung identifiziert werden (Abbildung 5.16C). Interessanterweise war schon die Messung von lediglich zwei SEC-Fractionen ausreichend, um 519 der 559 insgesamt detektierten CSMs (93 %) nachzuweisen.

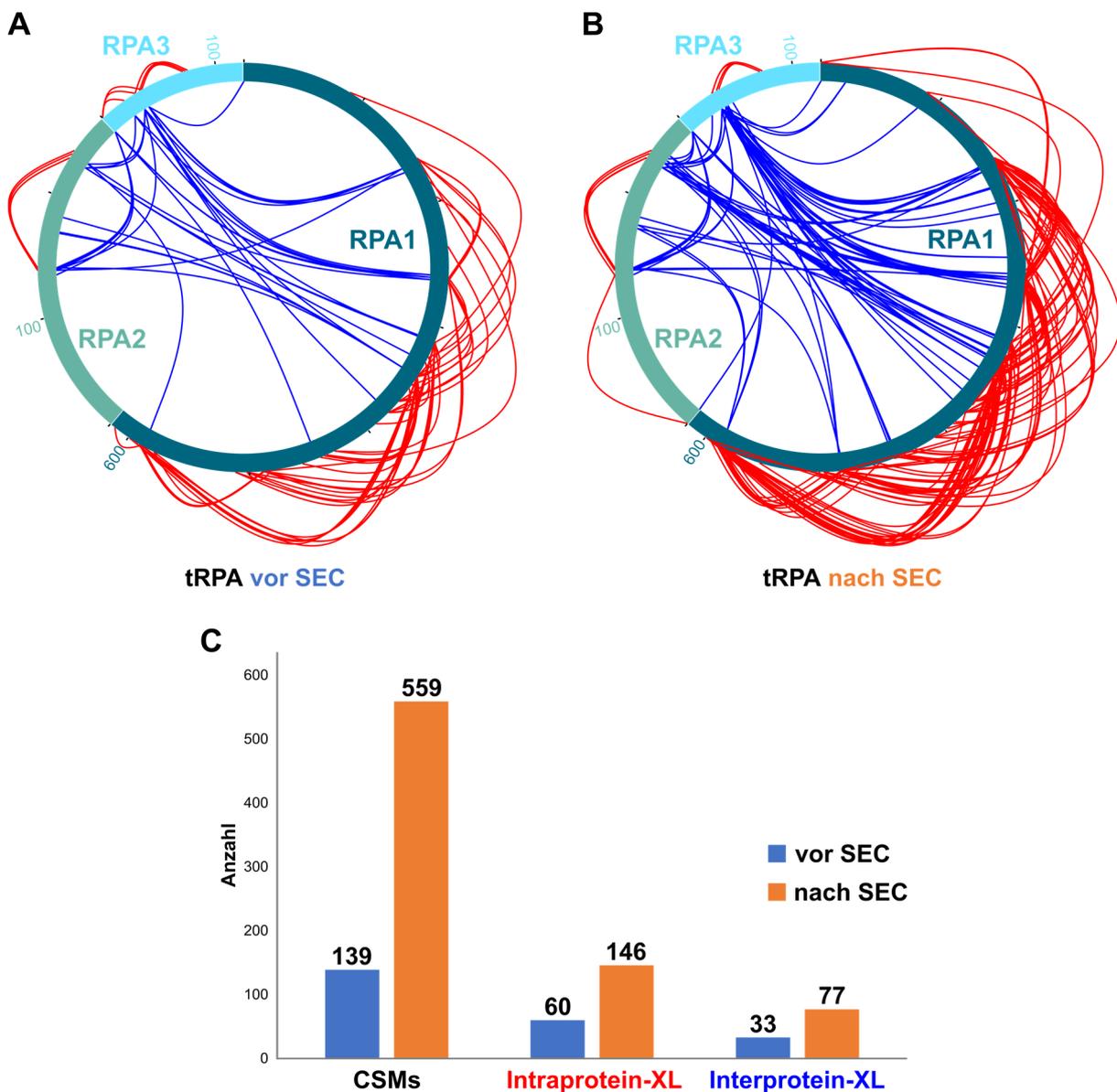


Abbildung 5.16: MS²-Analyse von trimerem RPA nach Crosslinking mit HSAKp. Alle Crosslinks wurden bei einer Falscherkennungsrate von 1 % identifiziert. A) xVis-Darstellung einer direkten MS²-Analyse. B) xVis-Darstellung der identifizierten Crosslinks nach Anreicherung durch SEC. C) Vergleich der Anzahl an CSMs, der Intraprotein- und Interprotein-XLs vor und nach Durchführung der SEC. Durch Verwendung der optimierten XL-Protokolle und MS²-Messmethode konnten deutlich mehr Crosslinks identifiziert werden, als in vorherigen Experimenten.

Auch die Anzahl an individuellen Crosslinks innerhalb und zwischen den individuellen tRPA-Untereinheiten konnte durch die SEC-Fraktionierung stark erhöht werden. In diesen Experimenten konnte im Vergleich mit den DSSO-Versuchen die dreifache Anzahl an Interprotein-Crosslinks zwischen den verschiedenen RPA-Proteinen detektiert werden. Damit stehen zahlreiche gemessene Längenrestriktionen zur Verfügung, welche zur Strukturmodellierung und genaueren Aufklärung der tRPA-Struktur verwendet werden können.

Die durchgeführten Experimente konnten deutlich zeigen, dass sich HSAKp ideal zur Verwendung als massespaltbarer Crosslinker eignet. Trotz der komplexeren Struktur im Vergleich zu DSSO ist die Anzahl an detektierten Crosslinks in MS²-Experimenten diverser Proteine vor und nach Anreicherung vergleichbar mit der Verwendung des etablierten Crosslinkers. Die Fragmentierung bei geringen Energien und die Bildung spezifischer Signal-Massenpaare ermöglicht dabei auch die Anwendung in MS³-Messungen zur Detektion von Crosslinks in komplexen Proben. Anders als DSSO kann HSAKp jedoch durch die zusätzliche Alkin-Funktionalität mit Affinitätsgruppen modifiziert werden.

5.1.4 Untersuchung zur Crosslink-Anreicherung durch CuAAC-Modifizierung

Da die massenspektrometrische Analyse des HSAKp-Crosslinkers bei Proben geringer Komplexität erfolgreich verlief, sollte als Nächstes die Modifizierbarkeit des Crosslinkers durch CuAAC untersucht werden, um die Anreicherung der Crosslinks aus komplexen Proben zu ermöglichen. Dazu sollte das während der Masterarbeit entwickelte Biotin-Azid **26** verwendet werden, welches eine Disulfidbrücke zwischen Biotin und Azid besitzt und somit unter milden reduktiven Bedingungen spaltbar ist (Abbildung 5.17A).^[107]

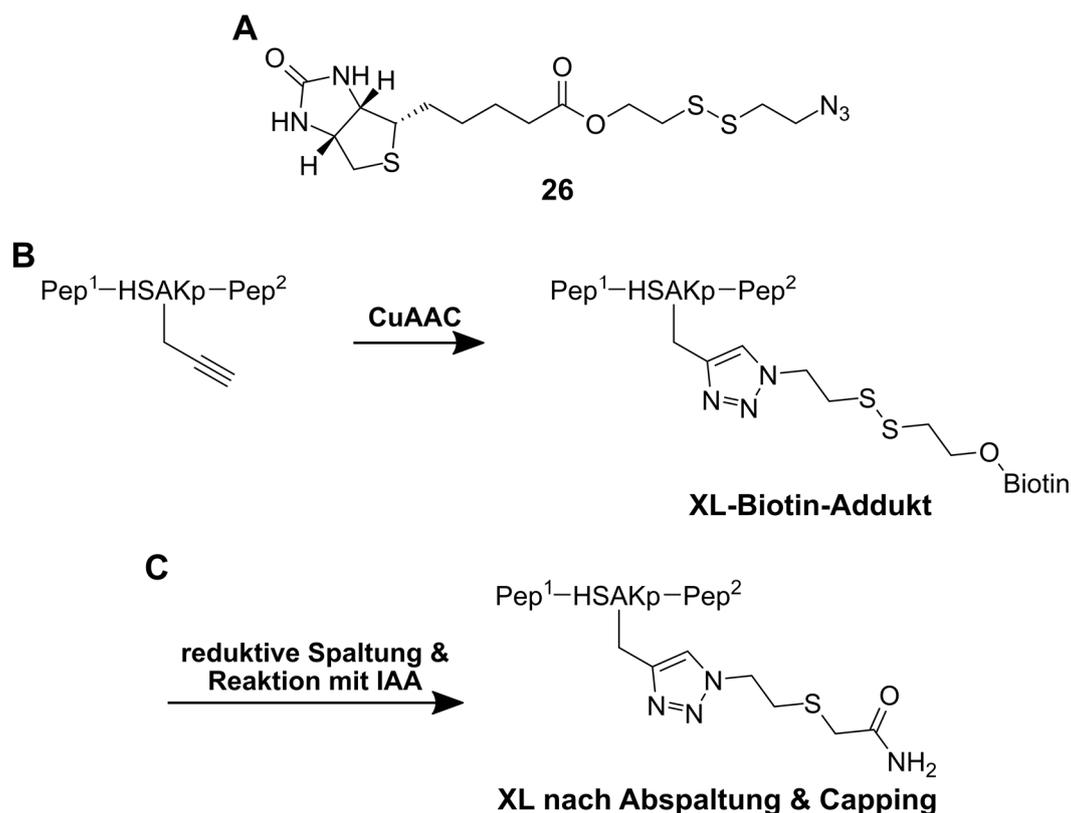


Abbildung 5.17: Modifizierung HSAKp-quervernetzter Peptide durch das spaltbare Biotin-Azid 26. A) Struktur des reduktiv spaltbaren Biotinderivats **26**. B) Zur Anreicherung der Crosslinks wird das Biotin-Azid **26** durch eine CuAAC-Reaktion an das Alkin des verwendeten HSAKp-Crosslinkers angebracht. Die starke Interaktion zwischen Biotin und auf magnetischen Beads immobilisiertem Streptavidin kann daraufhin zur Anreicherung der modifizierten Crosslinks verwendet werden. C) Um die starke Interaktion zwischen den modifizierten Crosslinkern und den Streptavidin-Beads unter milden Bedingungen zu lösen, wird die Disulfidbrücke reduktiv gespalten, beispielsweise durch TCEP. Dadurch werden die quervernetzten Peptide zur Detektion abgespalten. Um eine Reoxidation des resultierenden Sulfids zu vermeiden, wird eine Alkylierung mit IAA durchgeführt.

Das Prinzip der Anreicherung ist in Abbildung 5.17B dargestellt. Nach Durchführung des Crosslinkings und des enzymatischen Verdau sollte die aufgereinigte, komplexe Peptidmischung in Gegenwart einer Cu^I-Spezies mit Azid **26** inkubiert werden, um die CuAAC-Reaktion mit den HSAKp-modifizierten Peptiden zu ermöglichen. Die Einführung der Biotin-Funktionalität zu diesem Zeitpunkt sollte eine eventuelle sterische Einschränkung der Crosslink-Reaktion durch Vorhandensein der Biotin-

Funktionalisierung umgehen und gleichzeitig die Möglichkeit zur Verwendung anderer Affinitätsgruppen ermöglichen.

Durch Konjugation der Biotinfunktionalität an die HSAKp-modifizierte Peptide, bei welchen es sich sowohl um Crosslinks als auch um Monolinks handeln kann, ist es möglich, das bewährte Biotin-Streptavidin-System zur Anreicherung zu verwenden.^[151] Problematisch bei der Benutzung dieses Systems zur Anreicherung ist häufig die äußerst stabile Bindung des Biotins an Streptavidin, wegen welcher sehr harsche Bedingungen zur Abspaltung notwendig sind. Durch die Verwendung des spaltbaren Biotinderivats **26** kann diese Problematik jedoch umgangen werden, da die Biotin-Streptavidin-Interaktion bei diesem Molekül zur Abtrennung der Crosslinks nicht gelöst werden muss. Nach der Entfernung der unmodifizierten Peptide durch Waschschriffe erfolgt die Freisetzung der Crosslinks hier durch die milde, reduktive Spaltung der Disulfidbrücke, beispielsweise mit DTT (Dithiothreitol) oder TCEP. Damit das resultierende Sulfid nicht durch Oxidation mit anderen Sulfiden reagieren kann, wird anschließend eine Alkylierung mit IAA durchgeführt. So können die angereicherten, stabil modifizierten Crosslinks erhalten und anschließend analysiert werden, wie in Abbildung 5.17C dargestellt.

Um die Anreicherung durch Verwendung des Biotin-Azids **26** zu testen, wurde BSA mit HSAKp nach dem optimierten XL-Protokoll umgesetzt und die erhaltenen Peptide entsalzt. Zur Durchführung der CuAAC-Reaktion wurden verschiedene Cu^I-Systeme getestet: CuBr in Gegenwart des Liganden THPTA (Tris((1-hydroxy-propyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amine), gereinigter Kupferdraht mit THPTA sowie CuSO₄ mit THPTA und Natriumascorbat als Reduktionsmittel. Die Reaktionen wurden in wässrigen Puffersystem aus HEPES oder PBS bei einem neutralen pH-Wert durchgeführt. Für die Anreicherung der Proben wurden magnetische Streptavidin-Beads verwendet und TCEP wurde eingesetzt, um das Disulfid zu spalten. Die Alkylierung des entstehenden Sulfids erfolgte mit IAA.

Leider war es nach der Anreicherung nicht möglich, BSA-HSAKp-Crosslinks zu detektieren. Dafür könnten verschiedene Gründe verantwortlich sein: die Cycloaddition mit Biotin-Azid **26** verlief nicht erfolgreich, die Anreicherung wurde durch überschüssiges Biotin verhindert oder die Abspaltung der Crosslinker nach Anreicherung durch TCEP funktionierte nicht. Letzterer Punkt konnte ausgeschlossen werden, indem Biotin-Azid **26** alleine unter den gleichen Bedingungen mit TCEP inkubiert wurde. LC-MS-Analysen konnten hier deutlich die erwartete, effiziente Spaltung der Disulfidbrücke nachweisen. Das Ablaufen der Click-Reaktion sollte als nächstes untersucht werden. Proben vor der Anreicherung konnten für keine der getesteten Bedingungen die Entstehung der modifizierten Crosslinks nachweisen. Auch der Versuch, andere Azide wie 2-Azidoethanol (**27**) oder 2-Azodiessigsäure (**28**) zu koppeln, schlug fehl. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Peptide das benötigte Cu^I komplexieren und es somit nicht zum Ablauf der CuAAC bereitsteht.

In vielen Fällen war es nach Durchführung der Click-Reaktion aber auch nicht mehr möglich, unmodifizierte Crosslinks nachzuweisen oder deren detektierte Anzahl war stark reduziert. XL-Proben, welche mit 3-Azido-7-hydroxycoumarin (**29**) unter den Click-Bedingungen umgesetzt wurden, zeigten jedoch einen deutlichen Anstieg der detektierten Fluoreszenz, was bei der Verwendung dieses Azids für eine ablaufende Cycloaddition typisch ist. Deswegen wurde angenommen, dass es durch die Click-Bedingungen und die dabei gebildeten Cu^I-Spezies eventuell zu einer ungewollten Modifizierung der Peptide kommen kann. Um dies zu untersuchen, wurde ein HEK-Lysat proteolytisch verdaut und ein Teil der Probe wurde den gleichen Click-Bedingungen ausgesetzt wie die Crosslink-Proben, jedoch ohne dass Alkine oder Azide in der Probe enthalten waren. Die MS-Analyse zeigte hier eine deutliche Abnahme der Anzahl identifizierter Peptide von 13213 auf 8334, was einer Reduktion der Peptid-Identifikationen von 37 % entspricht. Allerdings konnte keine spezifische Modifikation der Peptide festgestellt werden, was darauf hindeuten könnte, dass die Spaltung in nicht-tryptische Peptide stattfindet. Zusätzlich zu Herausforderungen mit der Click-Reaktion ist auch die Abtrennung von überschüssigem Biotin-Azid **26** nach der CuAAC der XL-Proben schwierig. Dies führt zur Sättigung der Streptavidin-Bindungsstellen, wodurch die Anreicherung der Crosslinks reduziert oder sogar verhindert werden könnte.

Aus diesen Gründen wurde ein weiteres Click-Protokoll entwickelt, in welchem die Click-Reaktion auf der Proteinebene stattfinden sollte. Dadurch ist es durch Proteinfällungen (mit Aceton) oder den Einsatz von Massensaltern (engl. *molecular weight cut-off filters*, MWCOs) und Ultrafiltration möglich, kleine Moleküle effizient abzutrennen. Zusätzlich könnten Cu^I-Spezies besser verfügbar sein, da eine Komplexierung durch die Peptid-N-Termini, welche erst nach dem Verdau vorhanden sind, nicht im gleichen Ausmaß stattfinden kann. In Abbildung 5.18 ist das Prinzip der Anreicherung durch Click auf der Proteinebene dargestellt.

Diese Art der Anreicherung wurde wieder mit BSA getestet. Nach der Crosslinking-Reaktion wurde entweder eine Acetonfällung durchgeführt oder ein 10 kDa MWCO-Filter verwendet, um überschüssiges HSAKp abzutrennen. Die CuAAC-Reaktion wurde daraufhin mit CuSO₄, THPTA, Natriumascorbat sowie Azid **26** durchgeführt und kleine Moleküle wurden in einem zweiten Aufreinigungsschritt entfernt. Entsprechend dem Schema in Abbildung 5.18 wurden die erhaltenen Proben anschließend verdaut und der Anreicherung durch Streptavidin-Beads unterzogen.

In jedem Experiment wurden dabei Teile der Probe nach der XL-Reaktion mit HSAKp und nach der Click-Reaktion nach den jeweiligen Aufreinigungsschritten entnommen, um Einwirkungen des Protokolls auf die Anzahl der Crosslink- und Monolink-Identifikationen beobachten zu können. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 5.19 gezeigt.

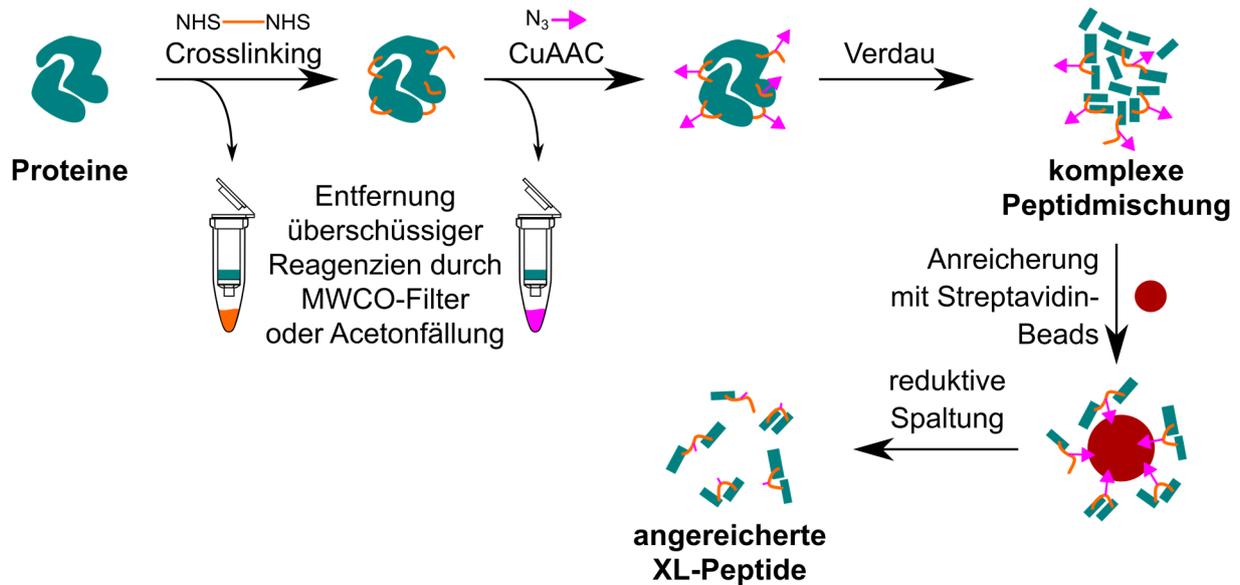


Abbildung 5.18: Prinzip der XL-Anreicherung bei Durchführung der CuAAC-Reaktion auf der Proteinebene. Im ersten Schritt werden die Proteine wie üblich im nativen Zustand mit dem XL-Reagenz (orange) quervernetzt. Anschließend findet die CuAAC-Reaktion mit einem Biotin-Azid (violett) ebenfalls auf der Proteinebene statt. Durch den Einsatz von *molecular weight cut-off*-Filtern oder Acetonfällungen können kleine Moleküle wie überschüssiger Crosslinker und überschüssiges Azid effizient von den großen Proteinen abgetrennt werden. Nach Verdauung und Anreicherung über Streptavidin-Beads kann die Abspaltung der XLs über Reduktion erfolgen.

Im ersten Experiment wurde sowohl nach der Crosslinking- als auch nach der Click-Reaktion die Abtrennung der Reagenzien durch die Verwendung von 10 kDa MWCO-Filtern durchgeführt. Die Click-Reaktion erfolgte zunächst in dem auch beim Peptidclick verwendeten HEPES-Puffer. Zwar konnten nach der Crosslinking-Reaktion nur eine geringe Anzahl an CSMs (10) und Monolinks (38) detektiert werden, jedoch steigerte sich diese Zahl nach der Anreicherung deutlich um das 5.1- bzw. 4.7-fache. Sowohl die Click-Reaktion, die Anreicherung durch die Streptavidin-Beads als auch die Abspaltung und Alkylierung der modifizierten Peptide musste also zumindest teilweise erfolgreich verlaufen sein. Wie in vorherigen Proben führte die Durchführung der Click-Reaktion zunächst jedoch zu einer Reduktion der detektierten XL-Spezies.

Um zu untersuchen, ob die Effektivität der Click-Reaktion durch Denaturierung und bessere Zugänglichkeit zu den HSAKp-modifizierten Peptiden erhöht werden könnte, wurde im nächsten Experiment Guanidiniumchlorid zum Puffer der Click-Reaktion zugesetzt. Tatsächlich konnte so die Anzahl der detektierten CSMs und Monolinks nach der Anreicherung gesteigert werden. Da jedoch auch in diesem Experiment der schädliche Effekt der MWCO-Aufreinigung auf die Anzahl der detektierten CSMs beobachtet werden konnte, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob die Aufreinigung der Proteinprobe auch durch Acetonfällungen erreicht werden kann.

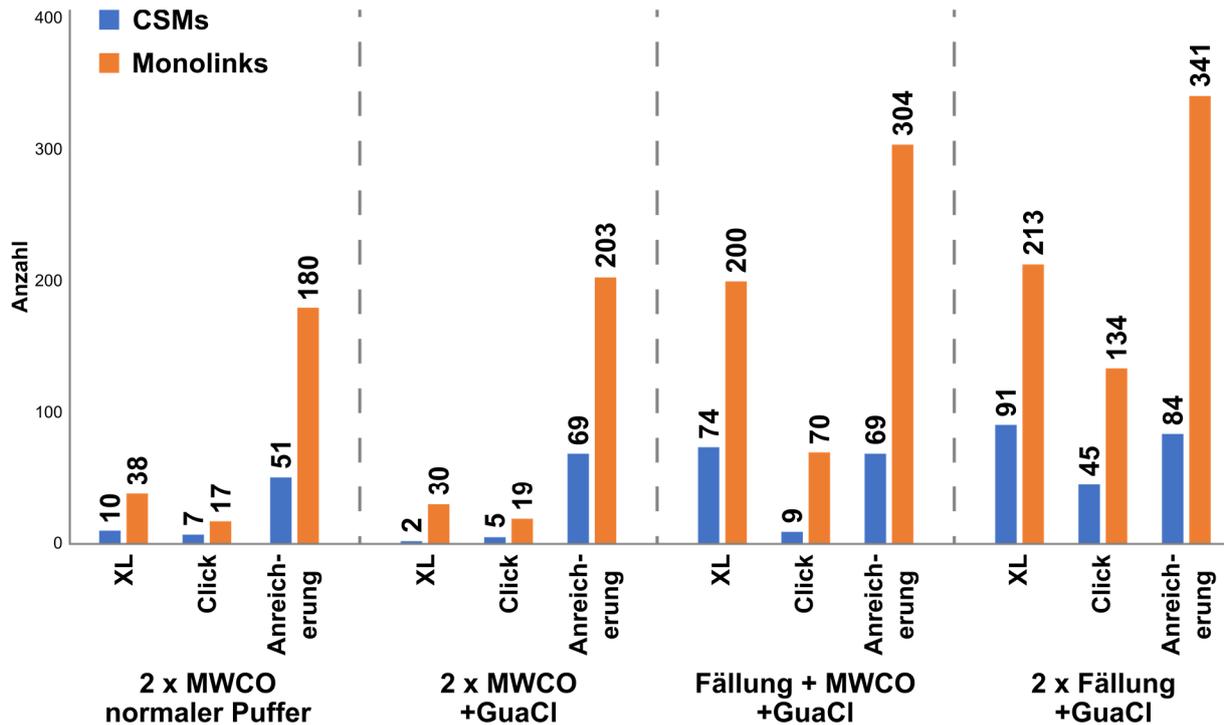


Abbildung 5.19: Ergebnisse der Anreicherung von HSAKp-BSA-Crosslinks und -Monolinks nach Clickreaktion auf der Proteinebene. Alle CSMs und Monolinks wurden bei einer Falscherkennungsrate von 1 % identifiziert. In den vier verschiedenen Versuchsabläufen wurden jeweils Proben nach der XL-, der Click-Reaktion und der Anreicherung analysiert (jeweils nach Aufreinigungsschritten). Die Anzahl der identifizierten Crosslinks scheint durch die Durchführung einer MWCO-Filtration nach der XL-Reaktion abzunehmen, erreicht bei Verwendung von Acetonfällungen zur Aufreinigung jedoch wieder vergleichbare Level wie in vorherigen Experimenten. Die Click-Reaktion kann durch die Denaturierung der Proteine mit der Zugabe von Guanidiniumchlorid verbessert werden, da so nach Anreicherung mehr modifizierte Spezies identifiziert werden. In allen Experimenten führt die Click-Reaktion vor der Anreicherung jedoch zu einer Verminderung der detektierten XL-Spezies. Zwar liegt die Zahl der CSMs nur in zwei Experimenten nach der Anreicherung über der Zahl der CSMs vor der Click-Reaktion, allerdings kommt es zu einem massiven Anstieg der identifizierten Monolinks. Während zur Analyse nach XL- und Click-Reaktion je etwa 2 µg BSA verwendet wurden, mussten zur Anreicherung 45 µg eingesetzt werden.

Tatsächlich konnte die Anzahl an detektierten CSMs und Monolinks gesteigert werden, wenn Acetonfällungen statt MWCO-Filtrationen durchgeführt wurden. Da so bis zur Durchführung der Click-Reaktion dasselbe Protokoll wie zur Optimierung der HSAKp-Proben verwendet wurde, stieg die Anzahl detektierter CSMs wieder auf vergleichbare Werte an. Zwar konnten in diesen beiden Experimenten nach der Anreicherung nicht mehr CSMs identifiziert werden, als vor Durchführung der Click-Reaktion, jedoch kann dennoch darauf geschlossen werden, dass Anreicherung und Abspaltung erfolgreich verliefen. Zum einen steigerte sich die Anzahl der detektierten, Biotin-modifizierten Spezies nach der Click-Reaktion vor Durchführung der Anreicherung. Zum anderen konnten in allen analysierten Proben deutlich mehr Monolinks identifiziert werden, wenn die Proben angereichert wurden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Click-Reaktion bei Monolinks effizienter abläuft und diese somit stärker angereichert werden.

Um auch ohne SEC-Fraktionierung einen signifikanten Zugewinn an CSMs in einer einzelnen Messung zu erhalten, ist es notwendig, das Click- und Anreicherungsprotokoll weiter zu verbessern. Für die in Abbildung 5.19 durchgeführten Experimente war es notwendig, 45 µg an quervernetztem BSA zu

verwenden. Dies ist deutlich mehr, als die 2 µg Proteinmenge, welche für andere XL-Experimente benötigt wurden.

Eine nicht quantitativ ablaufende Click-Reaktion könnte eine mögliche Ursache für die beobachteten Ergebnisse der Anreicherungsexperimente sein. Gleichzeitig mit dem negativen Einfluss der Click-Reaktion auf die Peptid- und XL-Identifikation scheint es notwendig zu sein, effizientere, dabei aber mildere Bedingungen für die CuAAC-Reaktion zu finden. Hier könnten andere Cu^I-Systeme oder modifizierte Azide, wie beispielsweise Picolylazide, Abhilfe schaffen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, schon gekoppelte HSAKp-Biotin-Konjugate zur XL-Reaktion zu verwenden und die benötigten Moleküle entweder präparativ oder *in situ* unmittelbar vor der Benutzung herzustellen.

Dennoch konnte durch die durchgeführten Experimente gezeigt werden, dass sowohl die Cu^I-vermittelte Modifizierung der XL-gekoppelten Peptide an einer Proteinprobe als auch die Anreicherung durch Streptavidin-Beads prinzipiell funktioniert. Deswegen sollte es möglich sein, das kombinierte XL- und Click-Protokoll nach Optimierung zur detaillierten XL-Analyse komplexer Proben zu verwenden.

Der synthetisierte und analysierte HSAKp-Crosslinker zeigt trotz einer komplexeren Struktur exzellente MS-Eigenschaften und ermöglichte bereits die Analyse wenig komplexer Proben. Zusammen mit der CuAAC-vermittelten Flexibilität und der Möglichkeit der Implementierung von MS³-Messmethoden zur Analyse komplexer Proben wurde so ein neues Crosslinking-Reagenz entwickelt, welches zur Strukturklärung und zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen verwendet werden kann.

5.1.5 Autorenbeiträge

Aufgereinigte Komplexe von tRPA oder XPA und tRPA, sowie aufgereinigtes XPA wurden von Dr. *Nina Simon, Johanna Bretzler, M. Sc.*, und *Timm Emsfelder, M.Sc.*, zur Verfügung gestellt. hAPOBEC2 wurde von *Franziska Traube, M. Sc.*, und die Mutante von Bst Pol1 von *Sebastian Thallmair, M. Sc.*, bereitgestellt. Die Experimente zur Identifikation der TET3cd-Interaktionspartner und zur Modifizierung des HSAKp-Crosslinkers durch CuAAC wurden gemeinsam mit *Leander Runtsch, M. Sc.*, durchgeführt. Pyrrolcrosslinker **9**, HSAK (**13**) und HSAKp (**14**) wurden von mir entwickelt sowie synthetisiert und massenspektrometrische Analysen sowie die Auswertung der erhaltenen Daten wurden selbstständig durchgeführt.

5.2 Synthese und Evaluation neuartiger isobarer Quantifizierungsreagenzien

5.2.1 Entwicklung einer neuen Reporterstruktur für hohe *Multiplexing*-Kapazitäten

Bei der Durchführung von Quantifizierungsexperimenten in der Proteomik ist es sehr vorteilhaft, wenn viele Proben gleichzeitig in einer Messung miteinander verglichen werden können. Dies spart zum einen Messzeit, zum anderen wird dadurch das Problem von fehlenden Quantifizierungswerten (*missing values*) umgangen. Da MS¹-basierte Methoden durch die mit jeder Probe zunehmende Komplexität des Spektrums in ihren *Multiplexing*-Kapazitäten stark beschränkt sind, bedient man sich hierzu der Isobarenmarkierung, mit welcher man inzwischen bis zu elf Proben miteinander vergleichen kann (siehe Kapitel 3.3).

Möchte acht oder mehr Proben gleichzeitig quantifizieren, so muss auf die TMT 10-Plex (oder 11-Plex) Reagenzien zurückgegriffen werden. Bei diesem Reagenzienset unterscheiden sich jedoch viele Reporterionen nur durch einen sehr geringen Massenunterschied von 6.32 mDa, wodurch eine hohe Auflösung im MS²- oder MS³-Scan notwendig ist, um die Reportersignale voneinander unterscheiden zu können (siehe Abbildung 5.20A). Je höher die Auflösung, desto länger sind die benötigten Messzeiten bei der Verwendung von weit verbreiteten Orbitrap-Massenanalytoren. Dementsprechend steigt die Zeit für einen kompletten Messzyklus mit erhöhter Auflösung an, was in weniger aufgenommen Spektren und damit weniger identifizierten Peptiden resultiert. So muss laut Herstellerangaben eine Auflösung von mindestens 30000 bei m/z 200 gewählt werden, wenn das TMT 10-Plex-Reagenz analysiert werden soll. Im Gegensatz dazu wird für die Peptididentifikation üblicherweise eine Auflösung von 15000 oder niedriger gewählt, um möglichst hohe MSⁿ-Scanraten zu erzielen. Gleichzeitig sind die gebildeten komplementären Ionen mit diesem geringen Massenunterschied nicht unterscheidbar, da die Auflösung mit steigendem m/z -Verhältnis abnimmt.

Aus diesem Grund sollte eine neue Reportergruppenstruktur entwickelt werden, in welcher sich die Isotopologe um etwa 1 Da unterscheiden. Dies ermöglicht zum einen die schnelle MSⁿ-Aufnahme bei geringen Auflösungen und zum anderen auch die Unterscheidung von entstehenden komplementären Ionen. Gleichzeitig sollte mindestens ein tertiäres Amin in die Reportergruppe integriert werden, um gute Eigenschaften während der Peptidionisation zu gewährleisten. Da während der Konjugation der isobaren Reagenzien die primären Amine von Lysin-Seitenketten und des *N*-Terminus durch Aktivester in Amide umgewandelt werden, sorgt das tertiäre Amin in der Reportergruppe auch dafür, dass neue basische Stellen zur Protonierung in das Peptid eingeführt werden und der Ladungszustand erhalten

bleibt. Zusätzlich sollte die Struktur so gewählt werden, dass die benötigten Isotopenmarkierungen durch möglichst günstige Edukte in das Reagenz eingeführt werden können.

Aufgrund dieser Anforderungen wurde ein Pyrrolidin-Derivat als Grundstruktur gewählt, welches sieben Kohlenstoff- und zwei Stickstoffatome enthält und vollständig isotopenmarkiert werden kann (Abbildung 5.20B).

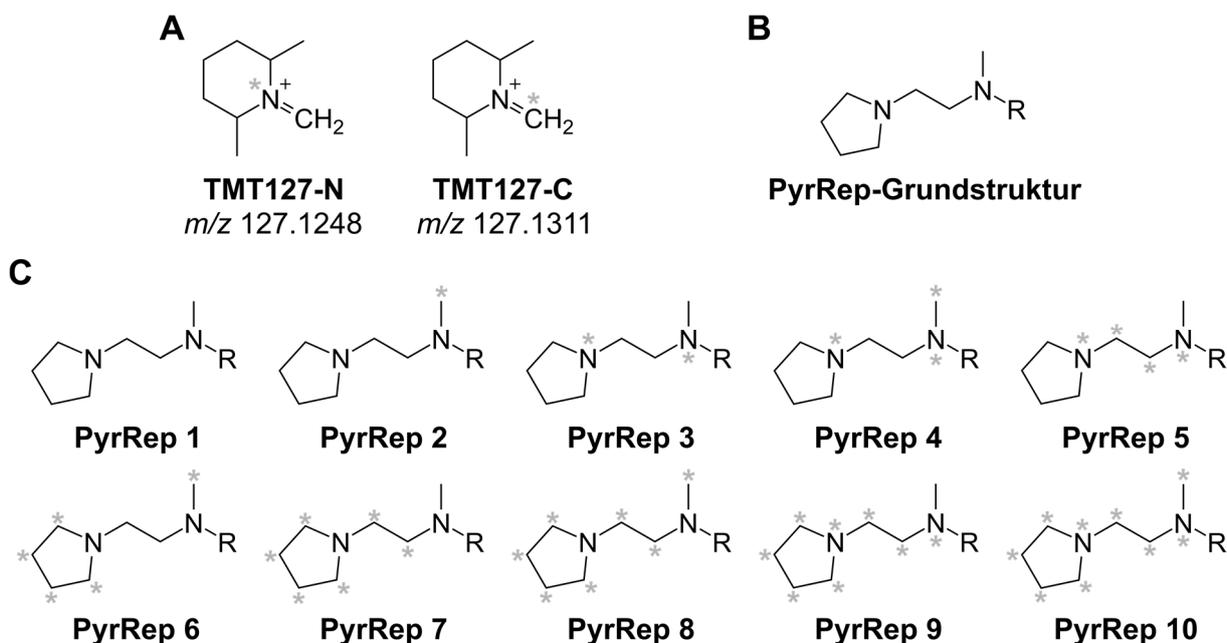
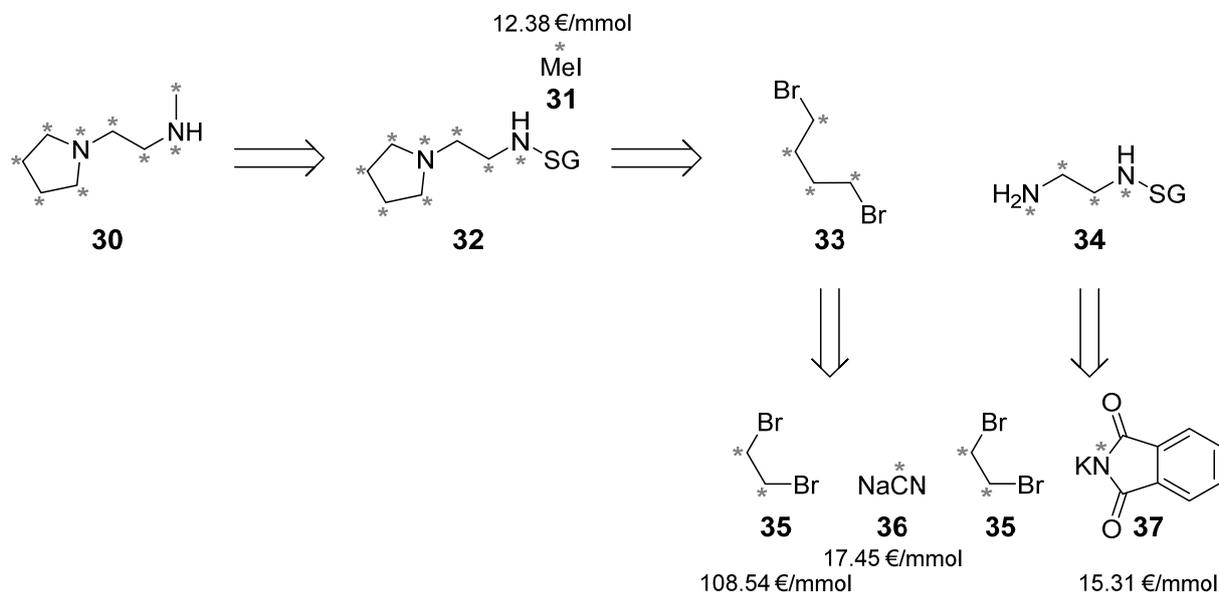


Abbildung 5.20: Entwicklung einer neuen Reporterstruktur für isobare Markierungsreagenzien. ^{13}C - und ^{15}N -Isotope sind durch graue Sterne gekennzeichnet. A) Struktur zweier TMT 10-Plex Reporterionen und deren m/z -Verhältnisse. Zur Unterscheidung der geringen Massendifferenz ist eine hohe Messauflösung erforderlich. B) Grundstruktur der Reportergruppe, welche als PyrRep bezeichnet wird. Sie besteht aus sieben Kohlenstoff- und zwei Stickstoffatomen, welche mit ^{13}C - oder ^{15}N -Isotopen markiert werden können. Innerhalb des Pyrrolidin-Ringes befindet sich ein tertiäres Amin, welches für den Ladungserhalt an den Peptiden nach der Markierungsreaktion sorgt. R steht für eine beliebige, massenspaltbare Gruppe nach der Fragmentierung. C) Übersicht über die verschiedenen isotopologen Strukturen der Reportergruppe. Durch den Einbau von einer bis zu neun Isotopenmarkierungen lassen sich zusammen mit der unmarkierten Struktur zehn verschiedene Isotopologe mit Massenunterschieden von je etwa 1 Da herstellen.

Zusätzlich zum tertiären Amin des Pyrrolidinringes befindet sich ein weiteres Stickstoffatom in dieser Gruppe, welches zur Konjugation mit dem Rest des isobaren Markierungsreagenz verwendet wird und methyliert vorliegt. Durch die Möglichkeit, neun Isotopenmarkierungen in die Struktur einzubauen, ergeben sich zehn verschiedene Isotopologe zur Herstellung eines 10-Plex Reagenziensets, welches den gewünschten Massenunterschied von etwa 1 Da aufweist (Abbildung 5.20C). Dabei wurden die Positionen der Isotopenmarkierungen so gewählt, dass die resultierenden Reportergruppen gleichzeitig auch als Massenbalancer verwendet werden können. Soll die Struktur von **PyrRep 1** als Reportergruppe verwendet werden, so muss **PyrRep 10** als Masseausgleichsgruppe gewählt werden, um die gleiche Anzahl an markierten Atomen im gesamten Markierungsreagenz zu gewährleisten. Dies lässt sich für alle zehn Isotopologe fortführen. Durch diese Verwendung der Struktur als Reporter- und Masseausgleichsgruppe sollte die Synthese des gesamten Reagenziensets vereinfacht werden, da alle

Isotopenmarkierungen in der Grundstruktur enthalten sind und das komplette Reagenz nach einem Baukastenprinzip zusammengesetzt werden kann.

In Schema 5.5 ist die Retrosynthese des Pyrrolidinderivats **30** gezeigt, welches als Vorläufer für die PyrRep 10-Reportergruppe dient und auch als Massenausgleicher eingesetzt werden kann.

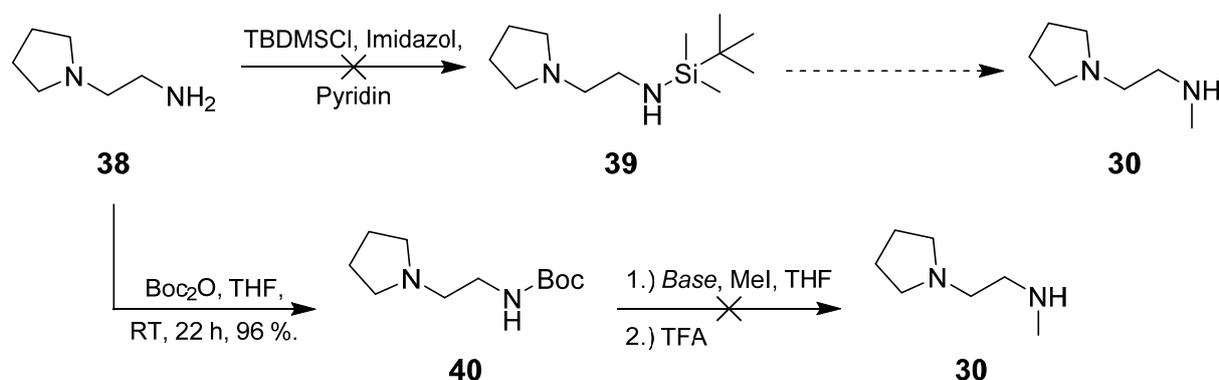


Schema 5.5: Retrosynthese des vollständig isotopenmarkierten Vorläufers **30 der PyrRep 10-Struktur.** Die Isotopenmarkierungen stammen aus möglichst billigen Quellen. Graue Sterne kennzeichnen ^{13}C - und ^{15}N -Markierungen. Gängige Preise in Euro pro Millimol der markierten Edukte sind angegeben. SG = Schutzgruppe.

Die ^{13}C -markierte Methylgruppe sollte über Methyljodid (**31**) eingefügt werden, bei welchem es sich um eine sehr günstige Quelle für ^{13}C handelt. Dabei ist die Möglichkeit zur Einführung einer einzelnen Isotopenmarkierung sehr wichtig, um sowohl eine gerade als auch eine ungerade Anzahl an Isotopenmarkierungen in der PyrRep-Struktur zugänglich zu machen. Durch Verwendung einer Schutzgruppe und der Deprotonierung des sekundären Amins von Diamin **32** sollte versucht werden, die Reaktion am Pyrrolidin-Stickstoffatom und Mehrfachmethylierungen zu vermeiden. Das geschützte Diamin **32** geht dabei aus 1,4-Dibrombutan (**33**) und einem geschützten Ethylendiamin **34** in einer Pyrrolidin-Synthese hervor. Diese beiden Bausteine können jeweils aus 1,2-Dibromethan (**35**) hergestellt werden. So berichteten *Hara et al.* von einer Syntheseroute, welche das günstige ^{13}C -markierte Natriumcyanid (**36**) verwendet, um nach Hydrolyse, Reduktion und Bromierung zu dem gewünschten, markierten 1,4-Dibrombutan (**33**) zu gelangen.^[152] Diamin **34** ist ebenfalls ausgehend von 1,2-Dibromethan (**35**) durch eine Gabrielsynthese mit ^{15}N -Kaliumphthalimid (**37**) zugänglich.

Um die Synthese zu testen, wurde zunächst nur mit unmarkierten Edukten gearbeitet. Zu Beginn sollte die Verwendung von Methyljodid (**31**) als Methylierungsreagenz evaluiert werden. Die Durchführung der Monomethylierung wird durch die höhere Nucleophilie des tertiären Pyrrolidin-Amins und mögliche Mehrfachmethylierungen erschwert. Untersuchungen von *M. J. Calverley* legten nahe, dass durch

die Schützung des primären Amins von **38** mit einer *tert*-Butyldimethylsilyl(TBDMS)-Gruppe dessen Reaktivität in Bezug auf Mehrfachmethylierungen durch sterische Effekte unterdrückt wird.^[153] Gleichzeitig wurde vermutet, dass durch Deprotonierung des geschützten, sekundären Amins **39** dessen Nucleophilie im Vergleich zum tertiären Amin des Pyrrolidinringes erhöht wird, so dass die Methylierung bevorzugt an dieser Stelle auftritt. Schema 5.6 zeigt die durchgeführte Synthese.



Schema 5.6: Versuch der Monomethylierung von Diamin **38** mit Methyljodid (**31**).

Die Schützung von Diamin **38** mit TBDMS-Cl unter Zuhilfenahme von Imidazol als nukleophiler Katalysator in Pyridin führte nicht zur Entstehung des gewünschten Produktes. Auch durch Verwendung anderer Lösungsmittel wie Acetonitril und Toluol oder anderer Basen wie DBU und Triethylamin konnte das geschützte Diamin **39** nicht erhalten werden. Aus diesem Grund wurde stattdessen eine Boc-Schützung des Bausteins durchgeführt, um Amid **40** zu erhalten. Um zu überprüfen, ob ausgehend von dieser Verbindung die Einführung der Methylgruppe durch Methyljodid (**31**) möglich ist, wurden Natriumhydrid und *n*-Butyllithium als Basen zur Deprotonierung des Amids getestet. Allerdings wurden nach Umsetzung mit sub-stöchiometrischen Mengen MeI (**31**) nur geringe Spuren der gewünschten monomethylierten Spezies erhalten, bei den Hauptprodukten handelte es sich stets um quaternärer Ammoniumsalze, welche sich durch Methylierung am Pyrrolidin-Stickstoffatom bildeten. Auch Experimente von *Dr. Milan Dejmek*, welcher die synthetische Zugänglichkeit der PyrRep-Struktur ebenfalls untersuchte, scheiterten bei der Verwendung von Methyljodid (**31**) als Methylquelle. Daraufhin wurde beschlossen, dass andere Edukte und Reaktionen zur Herstellung des PyrRep-Vorläufers **30** verwendet werden müssen.

Als Alternativen untersuchte *Dr. Milan Dejmek* neben verschiedenen anderen Reaktionswegen auch die reduktive Methylierung des Amins **38** mit Hilfe von Ameisensäureethylester und Lithiumdiisopropylamid, durch welche das monomethylierte Produkt **30** in sehr guten Ausbeuten hergestellt werden kann. Zudem konnte von *Dr. Dejmek* mit unmarkierten Ausgangsmaterialien gezeigt werden, dass die in Schema 5.5 dargestellte Syntheseroute zu Diamin **30** mit 1,2-Dibromethan (**35**), Natriumcyanid (**36**) und Kaliumphthalimid (**37**) in moderaten Ausbeuten möglich ist.

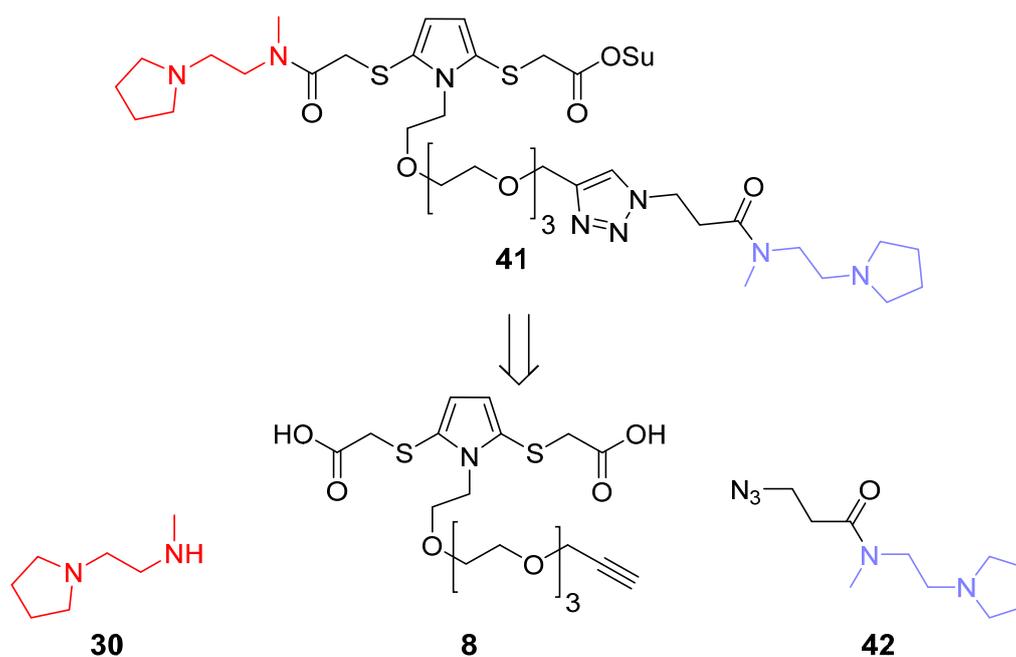
So konnte die unmarkierte Grundstruktur von PyrTag, einer Reportergruppe mit 10-Plex-Potential und großen Massenunterschieden von etwa 1 Da zwischen den Isotopologen, zugänglich gemacht werden. Die Synthese kann konvergent gestaltet werden und ermöglicht die gleichzeitige Synthese von Reporter- und Massenausgleichsgruppen aus möglichst günstigen isotopenmarkierten Edukten.

Als Nächstes sollte die Inkorporation in ein Quantifizierungsreagenz erfolgen, um die massenspektrometrischen Eigenschaften des so neu entwickelten Reagenzes zu erforschen.

5.2.2 Inkorporation der PyrRep-Struktur in ein Pyrrol-basiertes Reagenz

Nachdem sichergestellt war, dass die entwickelte PyrRep-Grundstruktur synthetisch auch vollständig isotopenmarkiert zugänglich sein sollte und die unmarkierte Struktur erfolgreich von *Dr. Dejmek* synthetisiert wurde, sollte als nächster Schritt der Einbau in ein Reagenz erfolgen, welches zur Isobarenmarkierung verwendet werden kann. Zusätzlich zu einem hohen *Multiplexing*-Potential des neuen Reagenzes sollte auch sichergestellt werden, dass die Fragmentierung in der Gasphase möglichst effizient stattfindet, damit sich komplementäre Ionen besser bilden können, als dies bei den kommerziell verfügbaren TMT-Reagenzien der Fall ist. Dies ist von großer Bedeutung, da durch Verwendung der TMT^c bzw. TMTc⁺-Methoden eine verzerrungsfreie Quantifizierung auf dem MS²-Level möglich ist, wenn ausreichend komplementäre Ionen gebildet werden.

Als Kern des ersten Testmoleküls wurde eine Vorstufe des Pyrrol-Crosslinkers **9**, Disäure **8**, gewählt. Das vollständige Reagenz **41** und die benötigten Edukte sind in der Retrosynthese in Schema 5.7 dargestellt.



Schema 5.7: Retrosynthese des Pyrrol-basierten Quantifizierungsreagenzes 41. PyrRep **30** und Azid **42** wurden von *Dr. Milan Dejmek* synthetisiert. Die Reporterstruktur ist in rot, der Massenausgleichs-Bereich in violett dargestellt.

Intensität. Wie bereits bei der Untersuchung der Pyrrol-Grundstruktur für den Einsatz als Crosslinker-Reagenz angedeutet, scheint die Massenspaltbarkeit der Dithiopyrrol-Struktur nicht ausgeprägt genug zu sein, um eine quantitative Spaltung der gewünschten Bindungen bei niedriger Energie bewerkstelligen zu können. Auch andere Gründe sprechen gegen eine weitere Verwendung des Dithiopyrrol-Kernes: das mit der Struktur einhergehende hohe Molekulargewicht könnte die Ionisationseffizienz der Peptide negativ beeinflussen und durch die PEG-Funktionalität stehen viele potentielle Fragmentierungsstellen zur Verfügung, welche das MS²-Spektrum komplexer gestalten und die Peptididentifikation erschweren könnten.

5.2.3 Zugang zu Sulfoxid-basierenden Teststrukturen

Aus diesen Gründen wurde beschlossen, den Kern des Testreagenz zu verändern und eine andere massenspaltbare Gruppe einzusetzen. Schon seit der Untersuchung der Spaltbarkeit von oxidierten Methionin-Seitenketten ist bekannt, dass Sulfoxide schon bei geringen Energien effizient in der Gasphase fragmentiert werden können.^[154] Diese massenspaltbare Gruppe wird bereits in Crosslinking-Reagenzien wie DSSO und den selbst entwickelten Reagenzien HSAK (**13**) und HSAKp (**14**) eingesetzt, in welchen die Spaltung unterhalb der Peptidfragmentierungsenergie effizient ablaufen muss (siehe Kapitel 3.2.2). Dies legt den Schluss nahe, dass Sulfoxide für den Einsatz in Quantifizierungsreagenzien bestens geeignet sind, da Reporter- und komplementäre Ionen bei hohen Fragmentierungsenergien effizient gebildet werden können.

Mit diesen Überlegungen wurde das Sulfoxid-basierte Testreagenz **44** entwickelt, in welcher die Reportergruppe und die Massenausgleicherguppe durch ein Sulfoxid getrennt vorliegen (Abbildung 5.22A). Der Massenbalancer-Teil kann auch in dieser Struktur wieder durch eine kupferkatalysierte Cycloaddition an das Molekül angebracht werden und für die Amin-Reaktivität sorgt erneut ein NHS-Ester. Damit während der Fragmentierung effizient Reporter- und komplementäre Ionen generiert werden können, wurde das Molekül so entwickelt, dass die Spaltung nur in eine Richtung erfolgen kann, analog zum Crosslinker HSAK (**13**). Um dies zu erreichen, befinden sich auf der Seite des Massenbalancer-Bereichs β -ständig zum Sulfoxid keine Wasserstoffatome, sondern eine Keto-Gruppe. Dadurch kann das Sulfoxid lediglich asymmetrisch zur Seite der Reportergruppe fragmentiert werden, wodurch ein Alken als Reportergruppe und eine Sulfensäure als komplementäres Ion erzeugt wird. Diese asymmetrische Fragmentierung ist in Abbildung 5.22B dargestellt. Da die abgespaltene Reportergruppe größer ist als die reine PyrRep-Struktur und das Azid **42** zusätzlich modifiziert werden kann, wäre es mit dieser Struktur sogar möglich, drei weitere Isotopenmarkierungen einzuführen und damit ein 13-Plex Reagenz zu realisieren.

Die Synthese zu Testsubstanz **44** wurde von *Dr. Milan Dejmek* und *Oleg Grossmann, M. Sc.*, durchgeführt.

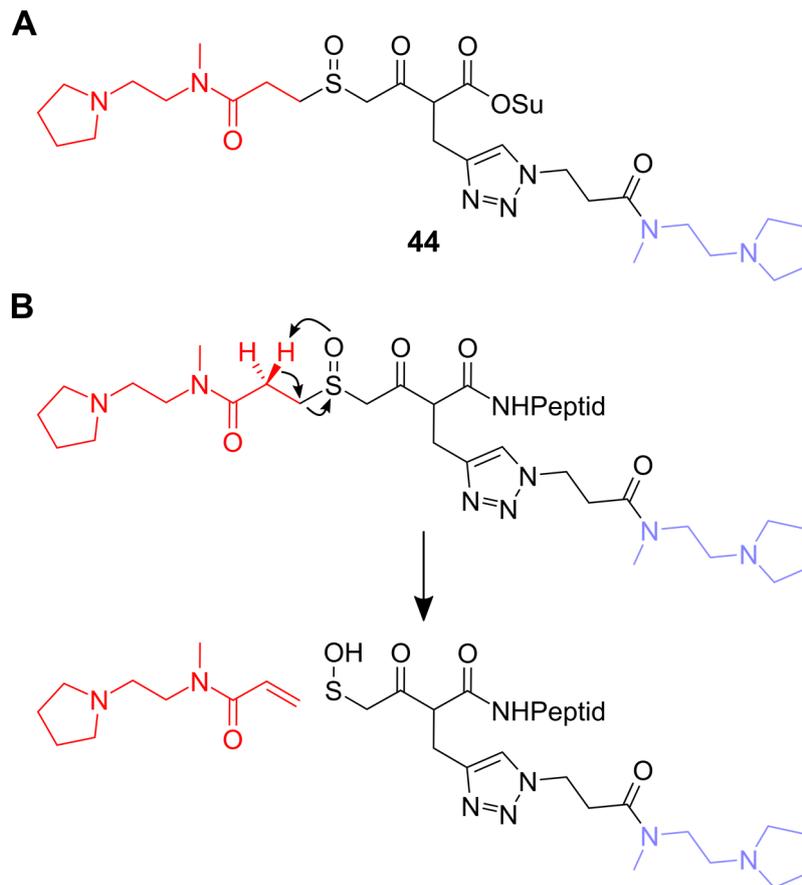
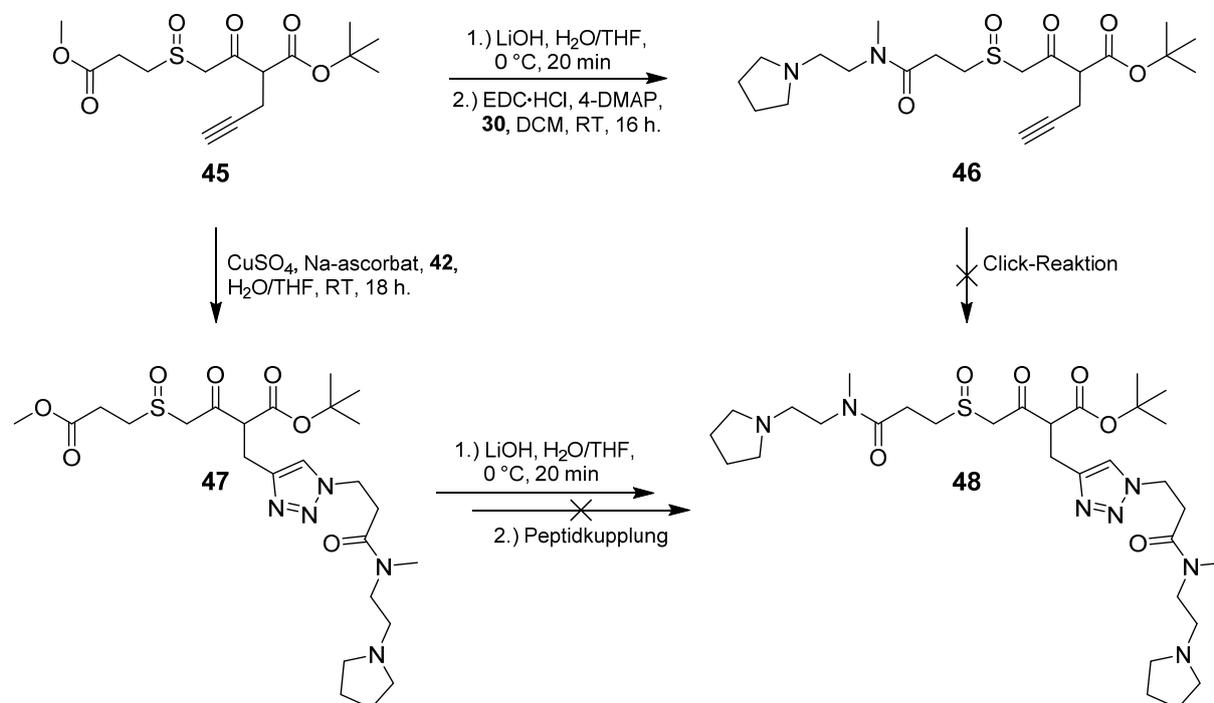


Abbildung 5.22: Struktur und Fragmentierung des Sulfoxid-basierten Testreagenzes **44.** Die Reportergruppe ist rot, die Massenausgleichs-Gruppe violett markiert. A) Unmarkierte Struktur des Testreagenzes **44**. Der Bereich, welcher während der Fragmentierung abgespalten wird, ist größer als die reine PyrRep-Struktur, weswegen auch der Einbau weiterer stabiler Isotope und eine Erhöhung der Multiplex-Kapazität möglich ist. B) Fragmentierung des Sulfoxids in der Gasphase. Da nur in Richtung der Reportergruppe β -H-Atome abstrahiert werden können, erfolgt die Spaltung asymmetrisch in die einzig mögliche Richtung.

Ausgehend von Meldrumsäure ist die Kernstruktur des Reagenz **44** in 5 Stufen zugänglich. Die enthaltene β -Ketoester-Struktur sorgt dafür, dass der benötigte Alkinrest über Propargylbromid in das Molekül eingeführt werden kann und stellt sicher, dass die Sulfoxid-Fragmentierung nur in eine Richtung ablaufen kann. Während der Synthese kam es jedoch zu Problemen, wenn Reporter- und Massenausgleichsgruppe zusammen in das Molekül eingebaut werden sollten. Die getesteten Synthesewege sind in Schema 5.8 dargestellt. Zwar war es ausgehend von der geschützten Reagenz-Vorstufe **45** möglich, sowohl den Reporterbereich durch basische Esterhydrolyse des Methylesters und anschließende Peptidkupplung mit Amin **30**, als auch die Balancergruppe mit Azid **42** in einer kupferkatalysierten Alkin-Azid Cycloaddition an das Molekül anzubringen, um die Zwischenstufen **46** und **47** zu erhalten. Jedoch konnte es in beiden Syntheserouten nicht erreicht werden, die jeweils andere Gruppe in das Molekül einzuführen. Obwohl verschiedene Reaktionsbedingungen getestet wurden, konnte in

keinem der Wege ein Umsatz zum Produkt **48** festgestellt werden, stattdessen kam es nur zur Reisolation der Edukte.



Schema 5.8: Syntheseveruche der SO-Reagenz Vorstufe 48. Ausgehend vom geschützten Sulfoxid **45** wurden zwei Syntheserouten getestet. Der Einbau der Reportergruppe war durch basische Hydrolyse von **45** und anschließende EDC-vermittelte Peptidkupplung mit Amin **30** möglich. Auch das direkte Anbringen der Balancergruppe an das Alkin **45** über kupferkatalysierte Cycloaddition mit dem Azid **42** verlief erfolgreich. Allerdings war es auf beiden Synthesewegen nicht möglich, Sulfoxid **48** mit Reporter- und Massenausgleichgruppe zu erhalten. Die Synthesen wurden von *Dr. Milan Dejmeck* und *Oleg Grossmann, M. Sc.*, durchgeführt.

Deswegen wurde beschlossen, die Struktur des Testmoleküls zu ändern und auf die Alkin-Funktionalität zu verzichten. Stattdessen sollten sowohl die Reporter- als auch die Massenausgleichgruppe über Amidierungen in das System eingebracht werden. Die so entwickelte Struktur **49** ist in Abbildung 5.23A dargestellt.

Als Kern dieser Testsubstanz wurde ein Boc- und Methylester-geschütztes Cystein-Derivat gewählt, welches kommerziell erworben werden kann. Nach Umsetzung mit Iodessigsäure kann die Reportergruppe wie im vorherigen Testmolekül über eine Amidierung eingeführt werden. Die Balancergruppe kann in diesem Molekül ebenfalls durch eine Amidierung eingebaut werden, indem Butandisäure als Adaptermolekül zwischen dem sekundären Amin der Balancerstruktur und dem primären Amin des Cystein-Kerns dient. Zur Konjugation des Testreagenzes an Peptide kommt erneut ein NHS-Ester zum Einsatz. Im Vergleich mit Testreagenz **44** wurde durch diese Strukturänderungen eine CuAAC-Reaktion umgangen. Gleichzeitig hat sich die Richtung, in welche die Gasphasenfragmentierung stattfinden kann, geändert (siehe Abbildung 5.23B): das einzig vorhandene β -H-Atom befindet sich hier auf Seite

des Massenausgleicher-Parts, weswegen die Spaltung nur in diese Richtung ablaufen kann. Resultat ist das Zurückbleiben einer Sulfensäuregruppe an der Reportergruppe und eines Alkens am komplementären Ion. Dadurch wird die Weiterreaktion der Sulfensäurespezies zur Thialspezies, welche bei den Crosslinker-Reagenzien beobachtet wird (siehe Kapitel 5.1.3), verhindert und die komplementären Ionen liegen in einer einheitlichen Struktur vor.

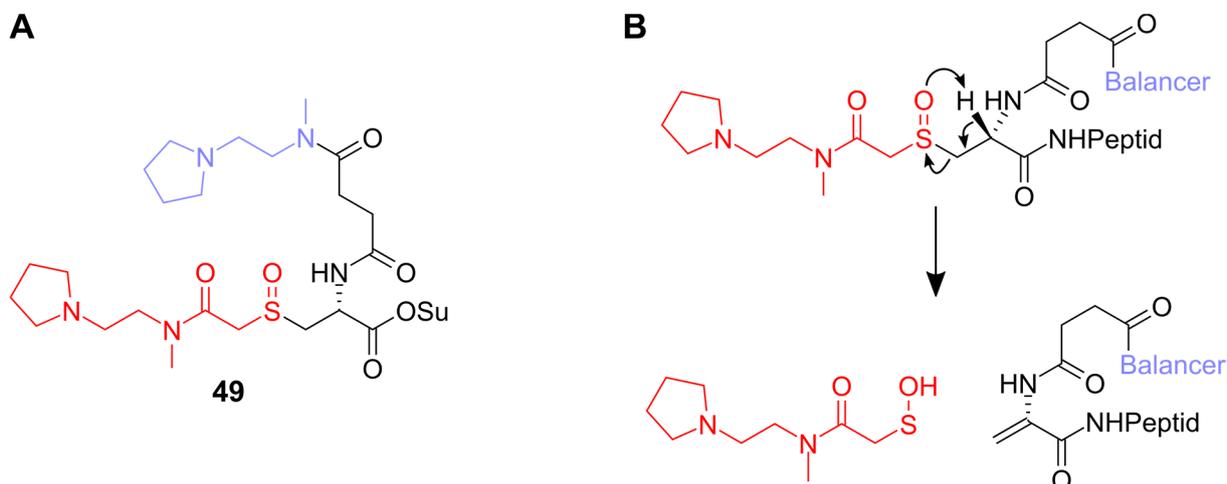


Abbildung 5.23: Struktur und Fragmentierung der modifizierten Sulfoxid-Teststruktur der zweiten Generation 49. A) Angestrebte Struktur des Sulfoxid-basierten Quantifizierungsreagenzes. Die Massenausgleichergruppe ist hier über einen Disäure-Adapter durch ein Amid mit dem Molekül verknüpft. Erneut ist eine asymmetrische Fragmentierungsstelle enthalten, welche jedoch in die andere Richtung zum Peptid hin spaltbar ist. B) Erwartete Fragmentierung des Reagenzes nach Reaktion mit einem Peptid. In der hier vorgestellten Struktur ist lediglich ein β -H-Atom zur Fragmentierung verfügbar, wodurch nach der Spaltung das komplementäre Ion die Alkenfunktionalität trägt und eine Sulfensäuregruppe an der Reportergruppe zurückbleibt.

Die Synthese des Testmoleküls wurde von *Oleg Grossmann, M. Sc.*, durchgeführt. Während es in diesem Molekül möglich war, sowohl die Reporter- als auch die Massenausgleichergruppe einzubauen, war die Aufreinigung der NHS-Ester-Vorstufe **50** (siehe Abbildung 5.24A) sehr problematisch, weswegen der NHS-Ester nicht erfolgreich hergestellt werden konnte. Bei der Verbindung **50** handelt es sich um ein hochpolares, stark mit Heteroatomen modifiziertes Molekül, was die Aufreinigung über Normalphasen-Chromatographie verhindert. Selbst die Verwendung von Umkehrphasen-HPLC ist schwierig, da das Molekül nahezu keine Absorption im *UV/Vis*-Bereich zeigt. Bei Versuchen der HPLC-Aufreinigung von Säure **50** konnte so stattdessen stets nur das bei der Peptidkupplung eingesetzte HOBt isoliert werden.

Um dennoch die Fragmentierung des Sulfoxid-Kerns in der Gasphase untersuchen zu können, wurde eine Fraktion der HPLC-Separation, welche den Vorläufer **50** und HOBt enthielt, einem MS^2 -Experiment unterzogen. Da das H-Addukt von **50** deutlich sichtbar war (m/z 516.2854, Abweichung zum theoretisch berechneten Wert: 0.77 ppm), konnte es in der linearen Ionenfalle eines LTQ-FT-ICR-Massenspektrometers isoliert werden. Die Fragmentierung des einfach positiv geladenen Vorläuferions erfolgte bei 35 eV Energie mittels CID. In Abbildung 5.24B ist das resultierende, niederaufgelöste

Massenspektrum dargestellt. Das Spektrum wird von einem Signal mit m/z 298.2 dominiert, welches dem Alken-haltigem Fragment inklusive des Massenbalancer-Bereichs entspricht. Wie vermutet verbesserte ein Wechsel der massenspaltbaren Gruppe von der Dithiopyrrol-Struktur zu einem Sulfoxid die Fragmentierungseigenschaften enorm: Trotz des geringen Ladungszustands von +1 ist das Vorläuferion ($50 + H^+$) vollkommen fragmentiert. Des Weiteren konnte der Neutralverlust des Pyrrolidin-Rings als ungewollt ablaufende Fragmentierung durch das leichter zu spaltende Sulfoxid weitestgehend unterdrückt werden. Die Intensität des Signals dieser Fragmentierung mit m/z 227.2 beträgt lediglich etwa 8 % des Alken-Fragments. Durch ein MS^3 -Experiment konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das Signal mit m/z 227.2 aus dem Alkenfragment mit m/z 298.2 hervorgeht. Da im Spektrum lediglich ein sehr schwaches Signal für die Reportergruppe (Abbildung 5.24A, rot) beobachtet werden kann, scheint die Ladung beim einfach positiv geladenen Molekül hauptsächlich am Massenausgleicher-Teil lokalisiert zu sein. Im Falle einer Konjugation mit Peptiden sollte der Ladungszustand deutlich erhöht sein, weswegen es zu einer vermehrten Lokalisierung an der Reportergruppe und einer damit verbundenen besseren Sichtbarkeit des Reporterions kommen sollte.

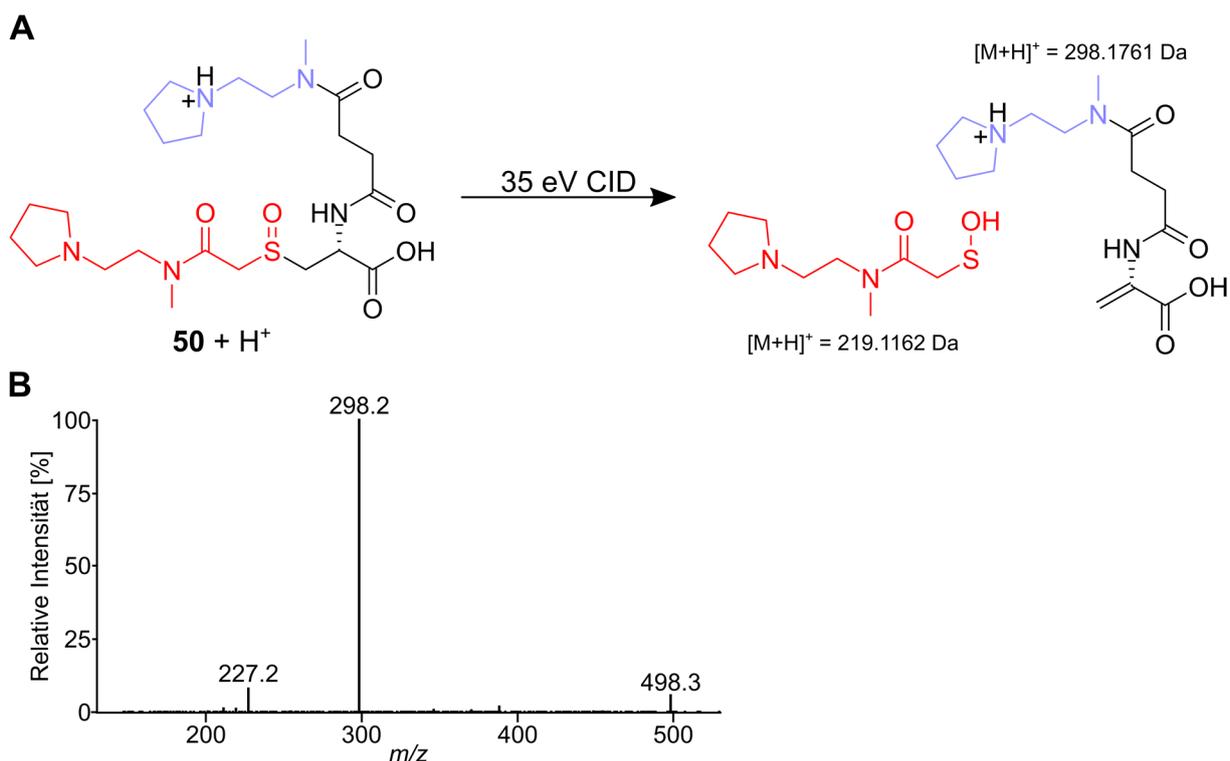


Abbildung 5.24: Struktur und Fragmentierung von Sulfoxid 50. A) Struktur des Vorläufermoleküls **50**. Die Fragmentierung des einfach positiv geladenen Sulfoxids liefert das Reporterfragment als Sulfensäure (rot) und das verbleibende Molekül in-klusive Säurefunktion und Balancergruppe (violett) als Alken. Für die entstehenden Spezies sind die exakten Massen der protonierten Spezies angegeben. B) Niederaufgelöstes MS^2 -Spektrum des Vorläufermoleküls ($50+H$) $^+$. Das isolierte Vorläuferion (m/z 516.28) ist bei der Energie von 35 eV in der CID-Fragmentierung vollständig zerfallen und das entstehende Alkenfragment dominiert das Spektrum. Dahingegen ist das Reporterfragment nicht zu sehen, was durch eine Lokalisierung der Ladung am Massenbalancer-Part erklärt werden kann.

Aufgrund der effizienten Fragmentierung der einfach geladenen Säure **50** wurde beim Design eines weiteren Testmoleküls **51** an einer Sulfoxid-Struktur festgehalten.

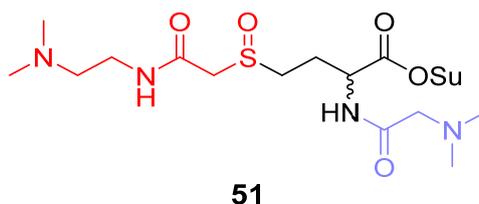
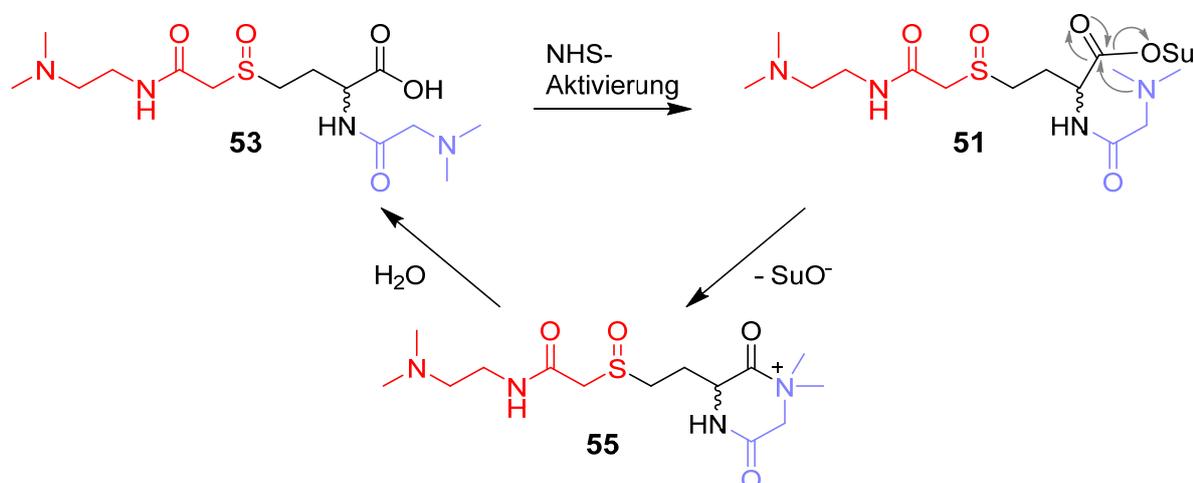


Abbildung 5.25: Struktur des vorgeschlagenen Sulfoxid-basierenden Quantifizierungsreagenz der dritten Generation 51. In dieser Struktur wurden die Reporter- und Massenausgleichsgruppe im Vergleich zu den bisherigen Testreagenzien geändert. Die Reportergruppe ist in rot, die Massenausgleichsgruppe in violett dargestellt.

Abbildung 5.25 zeigt die Struktur des Sulfoxid-Testreagenzes der dritten Generation **51**. Im Vergleich zur Vorläuferstruktur wurden einige Änderungen vorgenommen, um die Synthese zu vereinfachen und die Fragmentierungseigenschaften des Reagenzes dabei noch weiter zu verbessern. So wurde beschlossen, die Reporter- und Massenausgleichsgruppe zunächst zur Entwicklung eines Testmoleküls auszutauschen und kommerziell erhältliche Ausgangsstoffe zu wählen. Als Massenausgleichsgruppe wurde deswegen *N,N*-Dimethylglycin (**52**) eingesetzt und eine vereinfachte Reportergruppe verwendet. Dies führt zu einer Verkleinerung des Moleküls, was die Ionisierungseigenschaften der markierten Peptide verbessert, zum anderen kann so der Massenbalancer-Teil direkt in einer Amidierung an das primäre Amin der Grundstruktur gekoppelt werden, ohne dass ein Adaptermolekül wie in der vorherigen Iteration des Reagenzes notwendig ist. Es sei erwähnt, dass trotz der reduzierten Reporter- und Balancerstruktur im Vergleich zu der PyrRep-Struktur dennoch die Möglichkeit zur Herstellung eines 9-Plex-Reagenz besteht, wenn zusätzlich auch Isotopenmarkierungen in den Kern des Moleküls eingebaut werden. Auch bei der Grundstruktur wurde eine Änderung vorgenommen: Anstatt des Cystein-Kerns wurde eine Homocystein-Grundstruktur gewählt, um ein zusätzliches β -H-Atom in das Molekül einzuführen, welches die Sulfoxid-Fragmentierung nochmals erleichtern sollte.

Die Synthese von Testsubstanz **51** wurde von *Sarah Breuer, M. Sc.*, durchgeführt. Obwohl die Synthese trotz des Einsatzes kommerzieller Edukte aufgrund der sehr hohen Polarität und Heteroatom-Dichte der Verbindung anspruchsvoll war, konnte Säure **53** in hoher Reinheit erhalten werden. Allerdings verlief die Umsetzung zum NHS-Ester **51** nicht erfolgreich, obwohl zusätzlich zur Verwendung von NHS-TFA (**54**) verschiedene Methoden zur Herstellung getestet wurden. Möglicherweise kommt es nach Bildung des NHS-Esters zu einer intramolekularen Reaktion mit der Dimethylamino-Gruppe des Massenbalancers, wodurch sich ein Ammonium-Ion in einer Sechsring-Struktur ausbildet, welches unter wässrigen Bedingungen schnell wieder zu Säure **53** zerfällt (siehe Schema 5.9). Versuche, eine Reaktionsmischung von Säure **53** und NHS-TFA-Salz zur *in-situ* Generation des NHS-Esters mit Arginin oder tryptischen BSA-Peptiden umzusetzen, führten nicht zur Detektion markierter Spezies. Dies lässt den Schluss zu, dass sich der NHS-Ester **51** entweder nicht in genügendem Ausmaß gebildet hat oder die potenziell gebildete, aktive Zwischenstufe **55** (Schema 5.9) sehr kurzlebig ist und eventuell aus sterischen Gründen nicht von Peptid-N-Termini oder Lysinen angegriffen werden kann. Ein MS²-Experiment

der Säure **53** konnte jedoch erneut bestätigen, dass die Spaltung des Sulfoxids in der Gasphase effizient abläuft und es konnten sowohl die Signale der Reportergruppe als Sulfensäure-, als auch des komplementären Ions als Alken nachgewiesen werden.



Schema 5.9: Potenzielle Inaktivierung von NHS-Ester **51 durch einen intramolekularen Angriff der Massenausgleichsgruppe.** Das intermediär gebildete Ammoniumion **55** hydrolysiert rasch wieder zur Säure **53**.

5.2.4 Synthese des SulfOxid-Tags

Ermotigt von der weit fortgeschrittenen Synthese der Säure **53** und der Detektion der erwarteten Sulfoxid-Fragmente in der Gasphase wurde das Molekül **51** angepasst, um die potenzielle Inaktivierung des NHS-Esters zu umgehen. Dazu wurde die Massenausgleichsgruppe um eine CH₂-Gruppe erweitert, damit die Bildung eines intramolekularen Sechsrings verhindert wird. So konnte ebenfalls kommerziell erhältliches *N,N*-Dimethyl-β-alanin (**56**) für die Synthese eingesetzt werden. Die unmarkierte Struktur des SulfOxid-Tag (SOT) genannten Moleküls **57** ist in Abbildung 5.26 dargestellt.

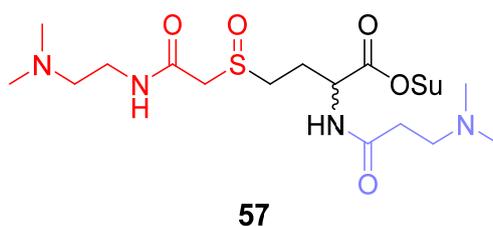
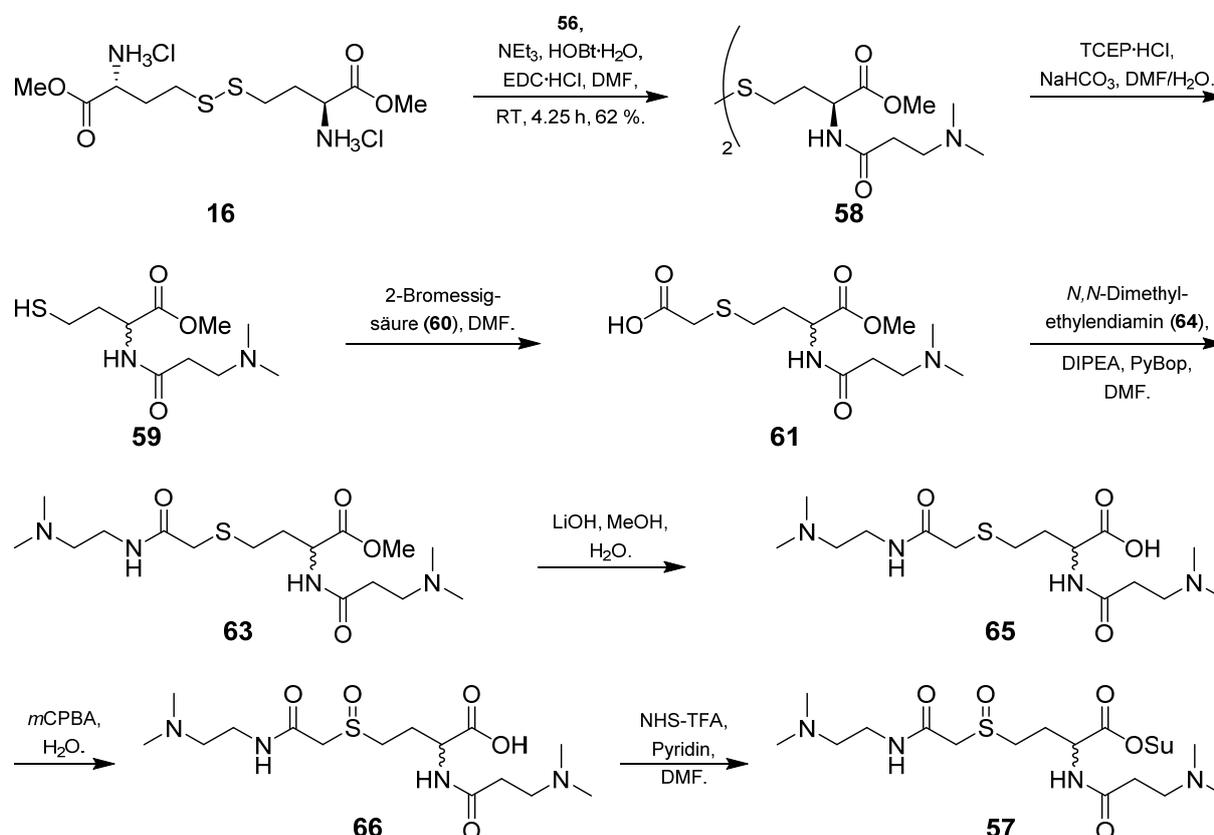


Abbildung 5.26: Unmarkierte Grundstruktur des SulfOxid-Tags **57.**

Die erste Syntheseroute der unmarkierten Verbindung **57** ist in Schema 5.10 dargestellt. Als Edukt diente hier wie bei der Synthese der Sulfoxid-Crosslinker HSAK (**13**) und HSAKp (**14**) der Homocystin-Dimethylester **16**, in welchem das Homocystein-Gerüst geschützt vorliegt. Zur Einführung der Massenausgleichsgruppe erfolgte die EDC-vermittelte Amidierung mit *N,N*-Dimethyl-β-alanin (**56**). Der Erfolg der Reaktion war entscheidend davon abhängig, dass eine äquimolare Menge an HOBt-Monohydrat als nukleophiles Auxiliar zur Reaktion gegeben wurde. Während die Reaktion zunächst bei

Raumtemperatur durchgeführt wurde, führte eine Erhöhung der Reaktionstemperatur in weiteren Experimenten zu einer verbesserten Ausbeute des Disulfids **58** von bis zu 85 %. Die weitere Synthese wurde von *Jana Bogena, M. Sc.*, durchgeführt. Zur reduktiven Spaltung des Disulfids kam TCEP-Hydrochlorid zum Einsatz, um zwei Äquivalente des modifizierten Thiols **59** zu erhalten.

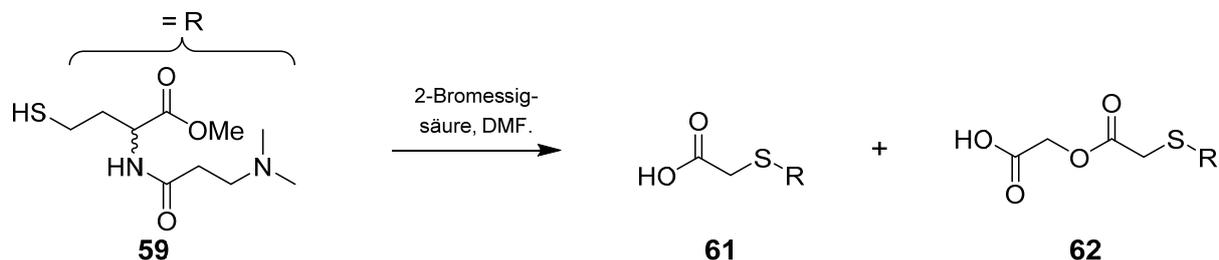


Schema 5.10: Erste Syntheseroute zum unmarkierten SOT-Reagenz **57.** Nach Amidierung mit *N,N*-Dimethyl-β-alanin (**56**) zur Einführung der Reportergruppe wurde das Disulfid **58** reduktiv gespalten, um Thiol **59** zu erhalten. Es folgte eine nukleophile Substitutionsreaktion mit 2-Bromessigsäure (**60**), um das Grundgerüst des SOT-Reagenzes **61** herzustellen. Die Reportergruppe wurde über eine Amidierung eingefügt und anschließend folgten die basische Esterhydrolyse, Oxidation zum Sulfoxid und NHS-Ester-Aktivierung, um zum unmarkierten SOT-Reagenz **57** zu gelangen. Die Synthese wurde nach der Amidierung von *Jana Bogena, M. Sc.*, durchgeführt.

Die zum Sulfoxid β-ständige Säurefunktion wurde in einer nukleophilen Substitution mit 2-Bromessigsäure (**60**) in das Molekül eingeführt. Auf die Verwendung eines geschützten 2-Bromessigsäurederivates wurde zunächst verzichtet, um in der geplanten Synthese des markierten Moleküls die Schützung der ¹³C-haltigen 2-Bromessigsäure zu umgehen. Allerdings kam es zusätzlich zur Bildung des gewünschten Produkts **61** unter den getesteten Reaktionsbedingungen ebenfalls zu weiteren, ungewollten Alkylierungen, wie in Schema 5.11 dargestellt.

Die chromatographische Trennung der Säuren **61** und **62** konnte nicht vollständig erreicht werden. Aufgrund des ebenfalls im Molekül enthaltenden Methylesters war es außerdem nicht möglich, das Mehrfachalkylierungsprodukt **62** einer Esterhydrolyse zu unterziehen. Wurde auf eine Aufreinigung nach Umsetzung zu der verunreinigten Säure **61** verzichtet und erst nach Amidierung zu **63**

säulenchromatographisch aufgereinigt, so wurde Grundstruktur **63** über zwei Stufen in einer Ausbeute von unter 30 % erhalten.

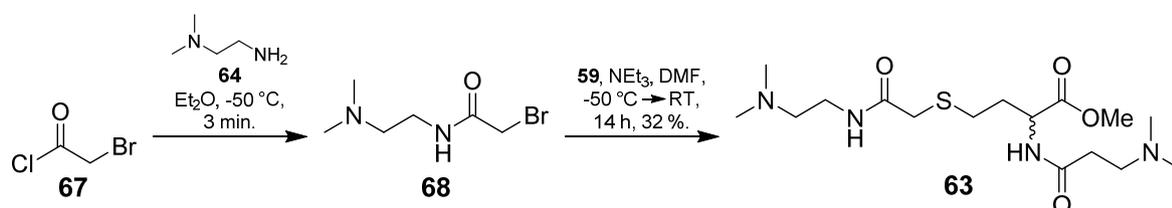


Schema 5.11: Ungewollte Nebenreaktion beim Aufbau der SOT-Grundstruktur. Zusätzlich zum gewünschten Produkt **61** kommt es zu einer Weiterreaktion der Säuregruppe mit 2-Bromessigsäure (**60**), was zu einer schwer trennbaren Produktmischung einfach- und mehrfachalkylierter Produkte führt.

Dennoch wurde die Synthese zunächst trotz der geringen Ausbeute und der Verunreinigung durch **61** weiterverfolgt, um Testsubstanz **57** zur massenspektrometrischen Analyse zu erzeugen. Die Reportergruppe **64** wurde durch eine Amidierung mit PyBop an das Molekül angebracht, um die Grundstruktur des SOT-Reagenzes **63** zu bilden, in welcher Reporter- und Massenausgleichsgruppe verbunden sind. Bereits nach der basischen Esterhydrolyse zu Säure **65** war eine chromatographische Aufreinigung des Moleküls aufgrund der hohen Polarität und fehlender UV-Absorption nicht möglich. Zur Aufreinigung wurde deswegen lediglich eine Entsalzung mit Hilfe von C_{18} -Material durchgeführt. Die Oxidation zum Sulfoxid **66** erfolgte mit äquimolaren Mengen an *m*CPBA. Um einen quantitativen Umsatz zu erzielen, musste die Reaktionslösung mit $HCl_{(aq)}$ auf einen pH-Wert von etwa 2 angesäuert werden. Eine alternative Oxidation mit Wasserstoffperoxid oder *tert*-Butylperoxid hingegen verlief nur sehr langsam und es konnte kein vollständiger Umsatz erreicht werden. Das entstehende Nebenprodukt *m*-Chlorbenzoesäure konnte jedoch mit Dichlormethan aus der wässrigen Reaktionsmischung extrahiert und das Produkt dadurch aufgereinigt werden. Zur Fertigstellung der Synthese wurde Sulfoxid **66** mit NHS-TFA-Salz in Gegenwart von Pyridin zum Aktivester **57** umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* erfolgte die Aufreinigung durch Aufnahme des Rückstands in Acetonitril und Fällung des Produktes mit Aceton.

So war es möglich, geringe Mengen des unmarkierten SulfOxid-Tags **57** zu erhalten, welche für erste massenspektrometrische Messungen verwendet werden konnten. Jedoch war es gerade in Hinblick auf die Synthese der isotopenmarkierten Verbindungen für Quantifizierungsexperimente notwendig, die Syntheseroute zu optimieren. Da sich die Ausbeute vor allem bei der Darstellung von Säure **61** durch die auftretende Mehrfachalkylierung verringerte und in diesem Schritt schwer abtrennbare Verunreinigungen entstanden, wurde beschlossen, alternative Synthesewege zur Bildung des Grundgerüsts **63** zu erforschen.

Zunächst wurde untersucht, ob durch die Verwendung eines bereits mit der Reportergruppe konjugierten Alkylierungsreagenzes Sulfid **63** effizienter hergestellt werden kann, wie in Schema 5.12 dargestellt. In dieser Reaktionssequenz sollte die Amidierung mit der Reportergruppe im ersten Schritt erfolgen. Als Edukt kam hier 2-Bromacetylchlorid (**67**) zum Einsatz, zu welchem bei niedriger Temperatur von $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ der Reporterbaustein **64** gegeben wurde. Niederaufgelöste Massenspektrometrie konnte nach kurzer Zeit die Bildung des Bromids **68** zeigen. Allerdings war es nicht möglich, dieses Produkt zu isolieren, da es bereits nach kurzer Zeit während der Erwärmung auf Raumtemperatur zur Zersetzung kam. Deswegen wurde stattdessen auf eine Isolation verzichtet und direkt Thiol **59** zur Reaktionsmischung gegeben. Zwar war es so möglich, Grundgerüst **63** in höherer Reinheit zu generieren, allerdings konnte das Produkt nach säulenchromatographischer Aufreinigung lediglich in einer Ausbeute von 32 % isoliert werden. Dazu war es bereits notwendig, zwei Äquivalente an **67** in Bezug auf Thiol **59** einzusetzen.

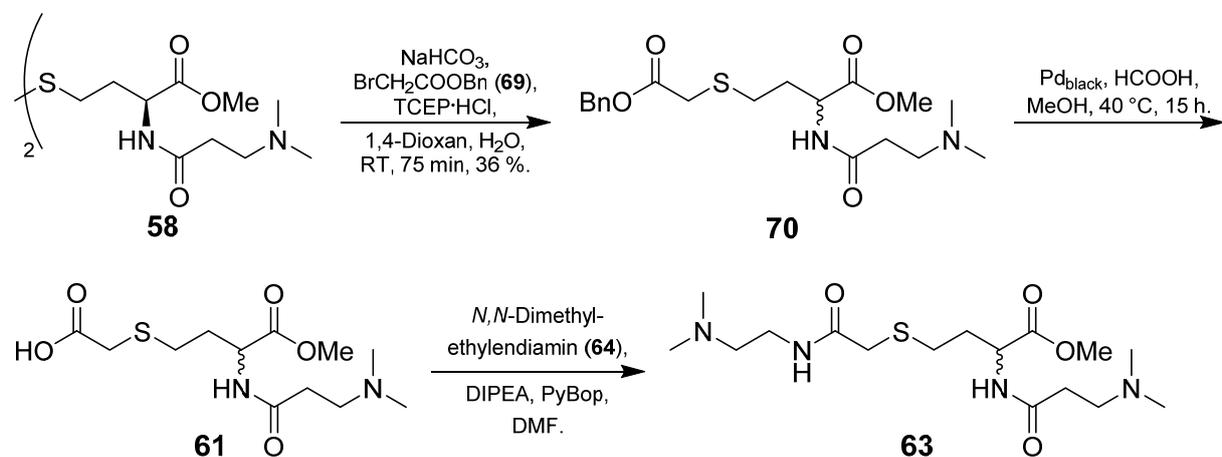


Schema 5.12: Darstellung eines Alkylierungsreagenzes zur effizienteren Darstellung von Kernmolekül **63.** Das Alkylierungsreagenz wurde aus der kommerziell erhältlichen Reportergruppe **64** und 2-Bromessigsäurechlorid (**67**) bei niedriger Temperatur dargestellt. Ohne vorherige Aufarbeitung wurde Thiol **59** zugegeben, um das Grundgerüst **63** des SOT-Reagenzes in moderaten Ausbeuten zu erhalten.

Auf der Suche nach einem effizienteren Syntheseweg, welcher möglichst wenig von dem in weiteren Synthesen isopenmarkierten Säurebaustein einsetzt, wurde als Nächstes die Verwendung der benzylgeschützten Bromessigsäure **69** untersucht. Die durchgeführte Synthese ist in Schema 5.13 gezeigt. Zunächst erfolgte die reduktive Spaltung von Disulfid **58** mit TCEP-Hydrochlorid in Gegenwart von Benzyl 2-Bromacetat (**69**). Eine Mehrfachalkylierung war hier durch die Benzylschutzgruppe nicht möglich. Im ersten Versuch konnte das erwartete Sulfid **70** in einer Ausbeute von 36 % in hoher Reinheit erhalten werden. Allerdings war es in weiteren Experimenten möglich, die Ausbeute deutlich auf bis zu 95 % zu erhöhen, wenn die Zugabe des 2-Bromacetates **69** erst nach der vollständigen Reduktion erfolgte und die säulenchromatographische Aufreinigung optimiert wurde.

Anschließend sollte die Schutzgruppe wieder entfernt werden, um die Amidierung mit der Reportergruppe zu ermöglichen. Zur Entschützung wurde in einem ersten Versuch Sulfid **70** mit Palladium auf Kohle (10 wt-%) in einer Wasserstoffatmosphäre (1 bar) umgesetzt. Allerdings konnte so kein Umsatz zur Säure **61** festgestellt werden. Auch der Einsatz von Triethylsilan als Wasserstoffdonor zeigte keinen Erfolg. Erst durch die Verwendung einer großen Menge an Palladium *black* (100 wt-%) und Ameisensäure als Wasserstoffdonor konnte die Benzylgruppe entfernt werden.^[155] Die Reaktion wurde in einer

Mischung von 10 % Ameisensäure in Methanol mit einer leicht erhöhten Reaktionstemperatur von 40 °C durchgeführt, um die freie Säure **61** in guten Ausbeuten und hoher Reinheit zu erhalten. Zur Einführung der Reportergruppe und der restlichen Modifikation der Grundstruktur (wie in Schema 5.10 gezeigt) konnte anschließend auf die etablierte Synthese zurückgegriffen werden.



Schema 5.13: Alternative Syntheseroute der SOT-Grundstruktur 63. Im ersten Schritt erfolgt die reduktive Spaltung des Disulfids **58** mit anschließender Alkylierung durch Benzyl-geschützte 2-Bromessigsäure (**69**), wodurch eine Mehrfachalkylierung unterbunden wird. Die anschließende Benzylentschützung erfordert den Einsatz von 100 wt-% Pd_{black} und verwendet Ameisensäure als Lösungsmittel und Wasserstoffquelle. Säure **61** konnte anschließend wie in der bisherigen Synthese mit *N,N*-Dimethylethylenediamin (**64**) amidiert werden, um die Grundstruktur **63** in besseren Ausbeuten und höherer Reinheit zu erhalten.

Durch die Wahl der Benzylschutzgruppe konnte somit die störende Mehrfachalkylierung vermieden und die Ausbeute an **63** über drei Stufen, inklusive Entschützung, auf etwa 56 % erhöht werden, was einer durchschnittlichen Ausbeute von 82 % pro Stufe entspricht. Zusätzlich konnte Thioether **63** durch diesen Weg in höherer Reinheit erhalten werden.

Mit dieser überarbeiteten Syntheseroute war es möglich, die unmarkierte Variante des SOT-Reagenzes darzustellen. Trotz der sehr hohen Dichte an Heteroatomen und der hohen Polarität konnte Substanz **57** in ausreichender Reinheit erhalten werden, wodurch erste massenspektrometrische Untersuchungen stattfinden konnten.

5.2.5 Erste massenspektrometrische Untersuchungen des SOT-Reagenzes

Die massenspektrometrischen Untersuchungen des SOT-Reagenz sollten im direkten Vergleich mit TMT erfolgen. Ein erheblicher Unterschied zwischen den TMT- und SOT-Reagenzien wird deutlich, wenn der Mechanismus der Fragmentierung betrachtet wird (siehe Abbildung 5.27). Bei der Spaltung TMT-markierter Peptide wird als Reporterion ein positiv geladenes Immoniumion gebildet, wodurch eine negative Ladung am Massenausgleicher zurückbleibt (Abbildung 5.27A). Dieses Ion ist allerdings nicht stabil und es kommt zu einem Neutralverlust von CO. Das resultierende komplementäre Ion besitzt einen um eins verringerten Ladungszustand im Positivmodus und ist dadurch nur im MS-Spektrum sichtbar, wenn das restliche Peptid einen Ladungszustand von mindestens +2 aufwies. Zwar ist dies bei

kompletten Peptiden während der MS-Analyse immer der Fall, jedoch können so nur äußerst selten komplementäre Ionen von Peptidfragmenten beobachtet werden, welche meistens einfach positiv geladen sind und somit nach der Spaltung von TMT als Neutralteilchen verloren gehen. Auch der Verlust der CO-Gruppe bei der Fragmentierung ist bei der Verwendung der komplementären Ionen zur Quantifizierung hinderlich, da sowohl im TMT-Duplex als auch im TMT-Sixplex Isotopenmarkierungen in dieser Gruppe enthalten sind, welche bei der Spaltung verloren gehen und somit nicht Teil der komplementären Ionen sind. Mit dem TMT-Duplex ist so eine quantitative Analyse der komplementären Ionen nicht möglich, da diese ununterscheidbar sind. Im Falle der TMT-Sixplex-Reagenzien können durch den Neutralverlust nur fünf Konditionen über TMT^c miteinander verglichen werden, da die komplementären Ionen von TMT-129 und -130 identisch sind.

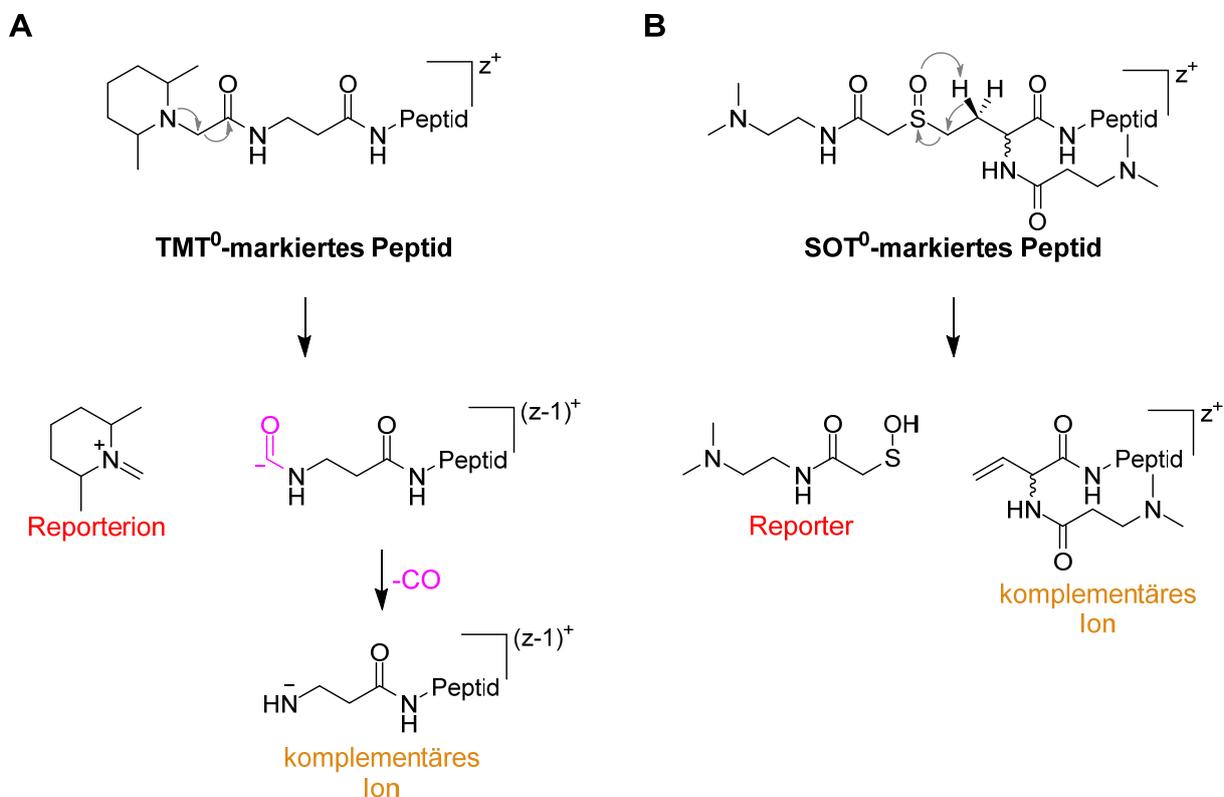


Abbildung 5.27: Mechanismus der Fragmentierung markierter Peptide. A) Fragmentierung TMT⁰-markierter Peptide. Die z⁺-geladenen Ionen spalten sich zu einem Reporterion mit einfach positiver Ladung und einem instabilen Ion, welches neutrales CO (violett) verliert und so das komplementäre Ion mit dem Ladungszustand (z-1)⁺ generiert. Der Ladungszustand hat sich in Bezug auf das markierte Peptid um eins verringert. B) Fragmentierung SOT⁰ (57)-markierter Peptide. Hier findet eine ladungsneutrale Fragmentierung statt, bei welcher sich ein Sulfensäurefragment als Reporter und das komplementäre Ion bildet. Der Ladungszustand bei der Fragmentierung verringert sich nicht. Der Reporter ist im Massenspektrum nur dann sichtbar, wenn eine Ladung vor der Spaltung in diesem Bereich des Moleküls lokalisiert war.

Bei der Fragmentierung von SOT-markierten Peptiden hingegen kommt es aufgrund des pericyclischen Mechanismus der Sulfoxid-Spaltung weder zu einem Neutralverlust isotopenmarkierter Bereiche, noch zu einer Verringerung des Ladungszustands der komplementären Ionen (siehe Abbildung 5.27B). Dies sollte dazu führen, dass nicht nur die komplementären Ionen der intakten Peptide sichtbar sind,

welche bis jetzt zur Quantifizierung mit TMT^c (oder TMT^{c+}) verwendet werden, sondern auch die komplementären Ionen der entstehenden Peptidfragmente. Dadurch wäre es möglich, nicht nur ein Ionenpaar zur verzerrungsfreien Quantifizierung heranzuziehen, sondern alle entstehenden komplementären Ionenpaare der Peptidfragmente, was zu einer akkurateren Quantifizierung führen könnte. Dieses Konzept der Quantifizierung über mehrere komplementäre Fragmentationen wurde bis jetzt in der Literatur nicht untersucht. In Kombination mit der Reporter- bzw. Massenausgleicherguppe, welche hohe *Multiplexing*-Kapazitäten bei Massenunterschieden von etwa 1 Da ermöglicht, könnte das SOT-Reagenz somit vor allem exzellent dafür geeignet sein, die verzerrungsfreie Quantifizierung auf dem MS²-Level durchzuführen.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die aus dem Fragmentierungsmechanismus postulierten Unterschiede der Reagenzien auch in MS-Messungen sichtbar sind. Um die Fragmentierungseigenschaften des unmarkierten SOT-Reagenzes **57** mit denen des kommerziell erhältlichen, unmarkierten TMT⁰-Reagenzes vergleichen zu können, wurden beide Aktivester separat mit einem synthetisch hergestellten Peptid umgesetzt. Es wurde die Peptidsequenz Ac-IEAKGER gewählt, bei welcher der *N*-Terminus acetyliert vorliegt und somit nicht zur Reaktion bereitsteht. Dadurch bleibt als Reaktionszentrum einzig das primäre Amin der Lysin-Seitenkette übrig, weswegen nur ein Reagenz pro Peptid reagieren kann. C-Terminal endet das Peptid auf Arginin, wodurch der Ladungszustand eines tryptisch verdauten Peptids simuliert wird. Die Strukturen der Reagenz-Peptidkonjugate sind in Abbildung 5.28 (A und B) gezeigt.

Nach Umsetzung der Reagenzien mit den jeweiligen Aktivestern wurden die markierten Peptide aufgereinigt und über LC-MS²-Experimente analysiert. In beiden Fällen konnte im MS¹-Spektrum eine erfolgreiche Amidierung der Lysin-Seitenkette festgestellt werden, allerdings zeigten sich hier schon erste Unterschiede zwischen den verwendeten Reagenzien: während das TMT⁰-Peptidkonjugat einen bevorzugten Ladungszustand von +2 aufwies, zeigte das neu entwickelte SOT⁰-Peptidkonjugat bevorzugt einen höheren Ladungszustand von +3. Dieses Ionisationsverhalten kann anhand der unterschiedlichen Anzahl an tertiären Aminen in den Label-Strukturen erklärt werden. Im Gegensatz zu TMT⁰, welches ein tertiäres Amin beinhaltet, liegen beim SOT-Reagenz gleich zwei tertiäre Amine vor, welche zusätzlich zur Arginin-Seitenkette protoniert vorliegen können. Durch die resultierende, höhere Ladungsdichte wurde auch die folgende Fragmentierung der Vorläuferionen beeinflusst, welche bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 25 % mit HCD durchgeführt wurde. Bei den doppelt positiv geladenen Ionen resultierte dies in einer HCD-Energie von 24.1 eV, während die dreifach positiv geladenen Ionen mit einer niedrigeren absoluten Energie von 17.1 eV fragmentiert wurden.

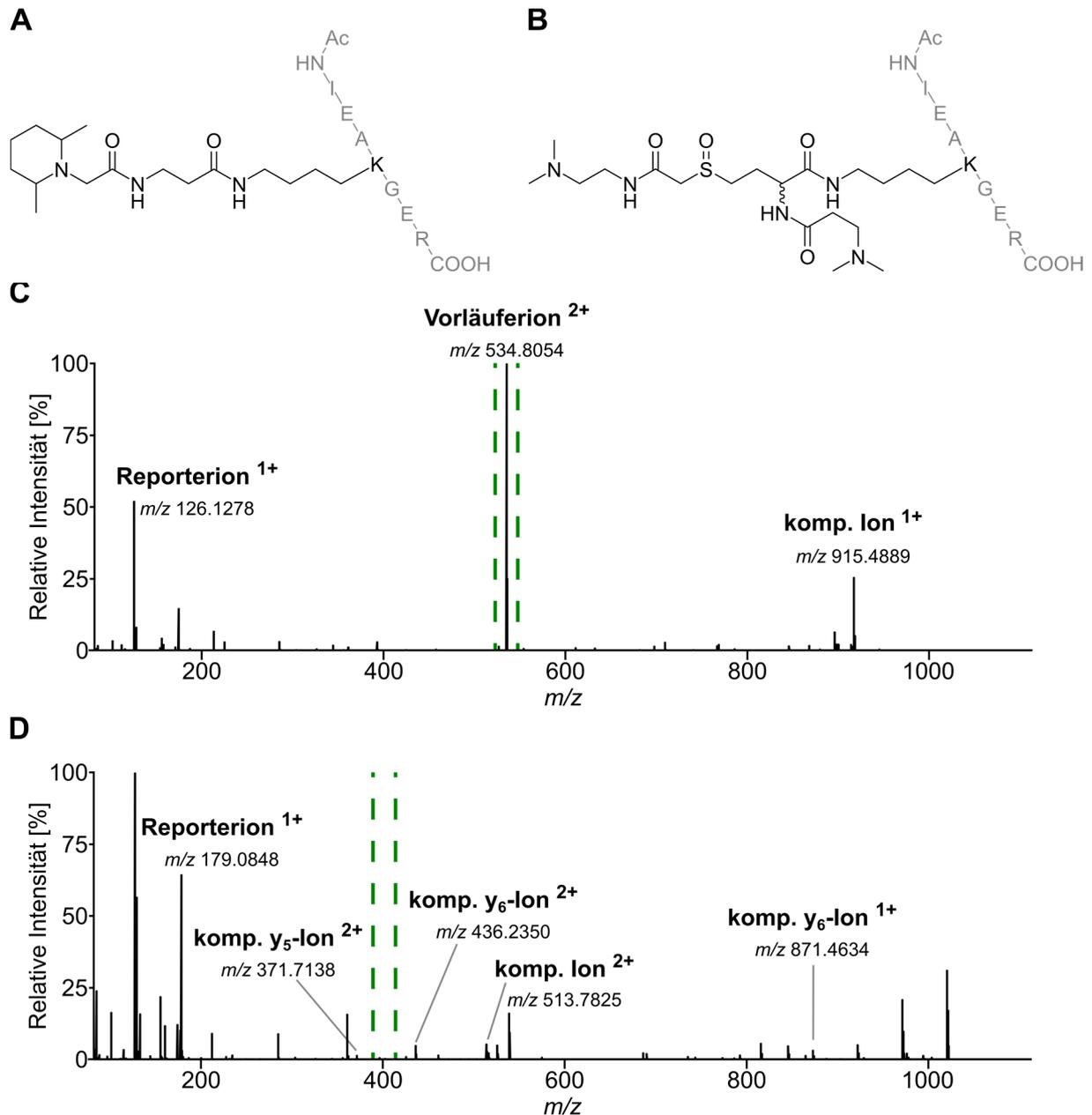


Abbildung 5.28: MS²-Experiment TMT⁰- und SOT⁰- (57) markierter Peptide. A) Struktur des TMT⁰-Peptidkonjugats. In der Gasphase liegt bevorzugt das zweifach positiv geladene Ion vor. B) Struktur des SOT⁰-markierten Peptids. Durch das zusätzliche tertiäre Amin im Vergleich zur TMT-Struktur liegt dieses Ion in der Gasphase bevorzugt dreifach positiv geladen vor. C) MS²-Spektrum des zweifach positiv geladenen, TMT-markierten Peptids bei einer normalisierten Energie von 25 % HCD (24.1 eV). Das isolierte, jedoch nicht vollständig fragmentierte Vorläuferion dominiert das Spektrum. Es ist ausschließlich das komplementäre Ion des intakten Peptides zu sehen. C) MS²-Spektrum des dreifach positiv geladenen SOT-Peptidkonjugats, ebenfalls bei einer normalisierten HCD-Energie von 25 % (17.1 eV absolute Energie). Das Vorläuferion wurde fast vollständig fragmentiert und die gebildeten Fragmentationen sind mit mittleren bis hohen Intensitäten zu erkennen. Das Reporterion ist mit einer relativen Intensität von 65 % sehr gut sichtbar. Einige der gebildeten, komplementären Ionen des Peptids und der Peptidfragmente sind markiert. Die grünen Markierungen innerhalb der Spektren von C) und D) markieren den jeweiligen Massenbereich des isolierten Vorläuferions.

In den entstehenden MS²-Spektren des TMT-Peptidkonjugats lag der Großteil des Vorläuferions unfragmentiert vor, da die verwendete Fragmentierungsenergie nicht zur Spaltung des Peptid-Rückgrats ausreichte (Abbildung 5.28C). Relativ dazu konnte das Reporterion mit etwa 45 % Signalintensität und andere Peptidfragmente mit sehr geringen Intensitäten detektiert werden. Dies entsprach den

Erwartungen, da TMT-markierte Peptide üblicherweise bei höheren Energien (ca. 35 % normalisierte HCD-Energie) fragmentiert werden, um die Reporterionen effizient abzuspalten und gleichzeitig viele Peptidfragmente zur Identifikation zu generieren.

Das einfach geladene komplementäre Ion des gesamten Peptids mit m/z 915.4893 ist im Spektrum ebenfalls mit einer relativen Intensität von etwa 25 % sichtbar, was typisch für die Fragmentierung TMT-markierter Peptide bei niedrigen Energien ist, bei denen sich kaum Fragmentionen bilden. Komplementäre Ionen der Peptidfragmente können jedoch wie erwartet nicht beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu zeigten die MS²-Spektren des SOT⁰-markierten Peptids bei Verwendung der gleichen normalisierten Kollisionsenergie von 25 % eine deutlich andere Verteilung der gemessenen Ionen (Abbildung 5.28D). Das Vorläuferion mit einer Ladung von +3 war hier nahezu vollkommen fragmentiert und konnte nur noch mit sehr geringer Intensität detektiert werden. Allerdings konnte das während der Sulfoxid-Fragmentierung gebildete Reporterion mit m/z 179.0848 und einer relativen Intensität von etwa 65 % beobachtet werden. Zusätzlich entstanden viele Peptidfragmente mit höheren relativen Intensitäten als bei dem TMT-markierten Peptid. Interessanterweise handelte es sich beim am intensivsten auftretenden Ion um das a_1 -Fragmention des acetylierten *N*-Terminus, welches sich einige Peptidbindungen von der modifizierten Lysin-Aminosäure entfernt befindet. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch Einbau der leicht spaltbaren Sulfoxid-Gruppe auch die Fragmentierung des restlichen Peptids beeinflusst wird. Ebenfalls sichtbar sind einige der komplementären Ionen, welche durch die Spaltung der Sulfoxid-Gruppe erzeugt werden und für spätere Quantifizierungsexperimente interessant sind. Wie angenommen, werden bei der Verwendung des SOT-Reagenzes auch komplementäre Ionen der Peptidfragmente gebildet.

Der Vergleich zwischen den Fragmentierungen des TMT- und SOT-markierten Peptids zeigt somit gerade in Bezug auf die Effizienz der Bildung von Peptidfragmenten und der Reportergruppe sowie der Anzahl an komplementären Ionen sehr deutliche Unterschiede. Aus diesem Grund wurde ein SOT-Duplex-Reagenzenset von *Jana Bogena, M. Sc.*, und *Dr. Miriam Wallner* synthetisiert, mit welchem Quantifizierungsexperimente durchgeführt werden konnten. Die Strukturen des Duplex-Sets sind in Abbildung 5.29 gezeigt. Die Einführung der Isotopenmarkierung erfolgte für SOT¹⁷⁹ (**71**) durch ¹³C-Formaldehyd in den Massenausgleicher-Part und für SOT¹⁸⁰ (**72**) mit Hilfe von ¹³C-markierter Bromessigsäure in den Reporterbereich. Dadurch sind die beiden Reagenzien isobar zueinander, unterscheiden sich aber wie für Quantifizierungsreagenzien üblich nach der Fragmentierung in der Masse ihrer Reporter- und damit auch ihrer komplementären Ionen.

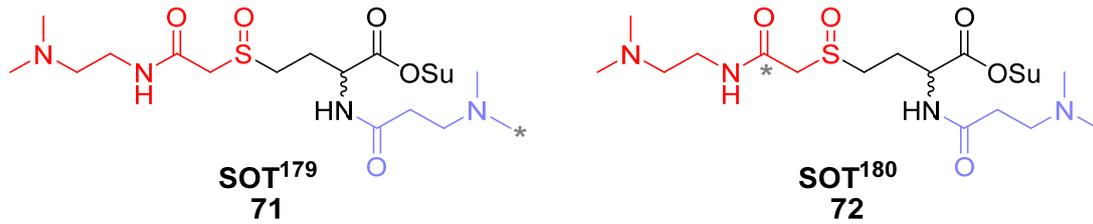


Abbildung 5.29: Strukturen der synthetisierten SOT-Duplex-Isotopomere. ¹³C-Isotopenmarkierungen sind durch graue Sterne dargestellt. Die Benennung der Strukturen ergibt sich aus den Massen der gebildeten Reporterionen: 179.08487 Da für SOT¹⁷⁹ (71) und 180.08823 Da für SOT¹⁸⁰ (72). Die Synthesen der Reagenzien wurden von *Jana Bogena, M. Sc.*, und *Dr. Miriam Wallner* durchgeführt.

Mit diesen Duplex-Reagenzien wurde zur weiteren Untersuchung der SOT-Struktur zunächst je ein tryptischer BSA-Verdau markiert und anschließend im Verhältnis 1:1 gemischt, um gemeinsam im LC-MS²-Experiment analysiert werden zu können. Nach Definition der Modifikationsmasse (361.18648 Da) und der entstehenden Reporterionen-Massen in der *Proteome Discoverer 1.4*-Software, in welcher der *Sequest*-Algorithmus zur Peptididentifikation verwendet wurde, konnten die so erhaltenen Daten ausgewertet werden. Dadurch war die automatische Identifikation markierter BSA-Peptide und auch die Quantifizierung mittels der Reporterionen möglich. Allerdings konnten mit verfügbaren Softwarepaketen keine genaueren Aussagen über die Bildung der komplementären Ionen getroffen werden. Da in einem normalen Proteomik-Experiment pro Stunde etwa 10000 MS²-Spektren generiert werden, war auch eine manuelle Auswertung eines Datensatzes aufgrund der enormen Spektrenanzahl nicht realistisch durchführbar. Zum Überwinden dieser Herausforderung war es deswegen notwendig, eine eigene Softwarelösung zur Auswertung der SOT-Daten zu entwickeln.

5.2.6 Entwicklung eines Computerprogramms zur Spektrenanalyse

In den geläufigen Algorithmen zur Peptididentifikation werden die gemessenen MS²-Spektren mit den Massen der Fragmentionen verglichen, welche aus der *in silico*-Fragmentierung der Peptidkandidaten hervorgehen (siehe Kapitel 3.1.3). Somit können die Programme nicht ohne weiteres damit umgehen, wenn es zusätzlich zur Fragmentierung des Peptidrückgrats auch zur Spaltung angebrachter Modifikationen kommt, da so die Massen der berechneten Fragmentionen (mit der gespaltenen Modifikation) nicht zur Masse des intakten Peptids (mit der intakten Modifikation) passen. Zwar gibt es in einigen Suchalgorithmen, beispielsweise des in *MaxQuant* implementierten *Andromeda*-Algorithmus, die Möglichkeit zur Definition von Neutralverlusten, welche die an die Peptidfragmente zu addierenden Massen verändern können. Jedoch liegt hier keine Möglichkeit vor, eine Vielzahl an Informationen wie die Sequenz des entstehenden Fragmentions oder dessen Intensität auszulesen. Bei den komplementären Ionen handelt es sich jedoch genau um diese Art von Ionen, bei welchen sich die Modifikationsmasse durch das angebrachte Markierungsreagenz während der Peptidfragmentierung ändert, weswegen sie schlecht mit der üblichen Software analysiert werden können.

Aus diesem Grund musste ein Programm entwickelt werden, welches in der Lage ist, zehntausende Spektren automatisch nach möglicherweise gebildeten komplementären Ionen zu durchsuchen und die Ergebnisse auswertbar zugänglich zu machen. Die Identifikation der Peptide sollte dabei jedoch weiterhin durch robuste und bewährte Algorithmen wie *Sequest* oder *Andromeda* erfolgen. Als Programmiersprache wurde Java ausgewählt, da so bereits veröffentlichte Bibliotheken zum Einlesen der aufgenommenen Spektren verwendet werden konnten. Im Folgenden soll die Funktionsweise des *SpectraAnalyzer*-genannten Programmes, welches aus 26 individuellen Java-Klassen besteht, kurz zusammengefasst werden. Eine schematische Übersicht des Programms ist in Abbildung 5.30 gezeigt.

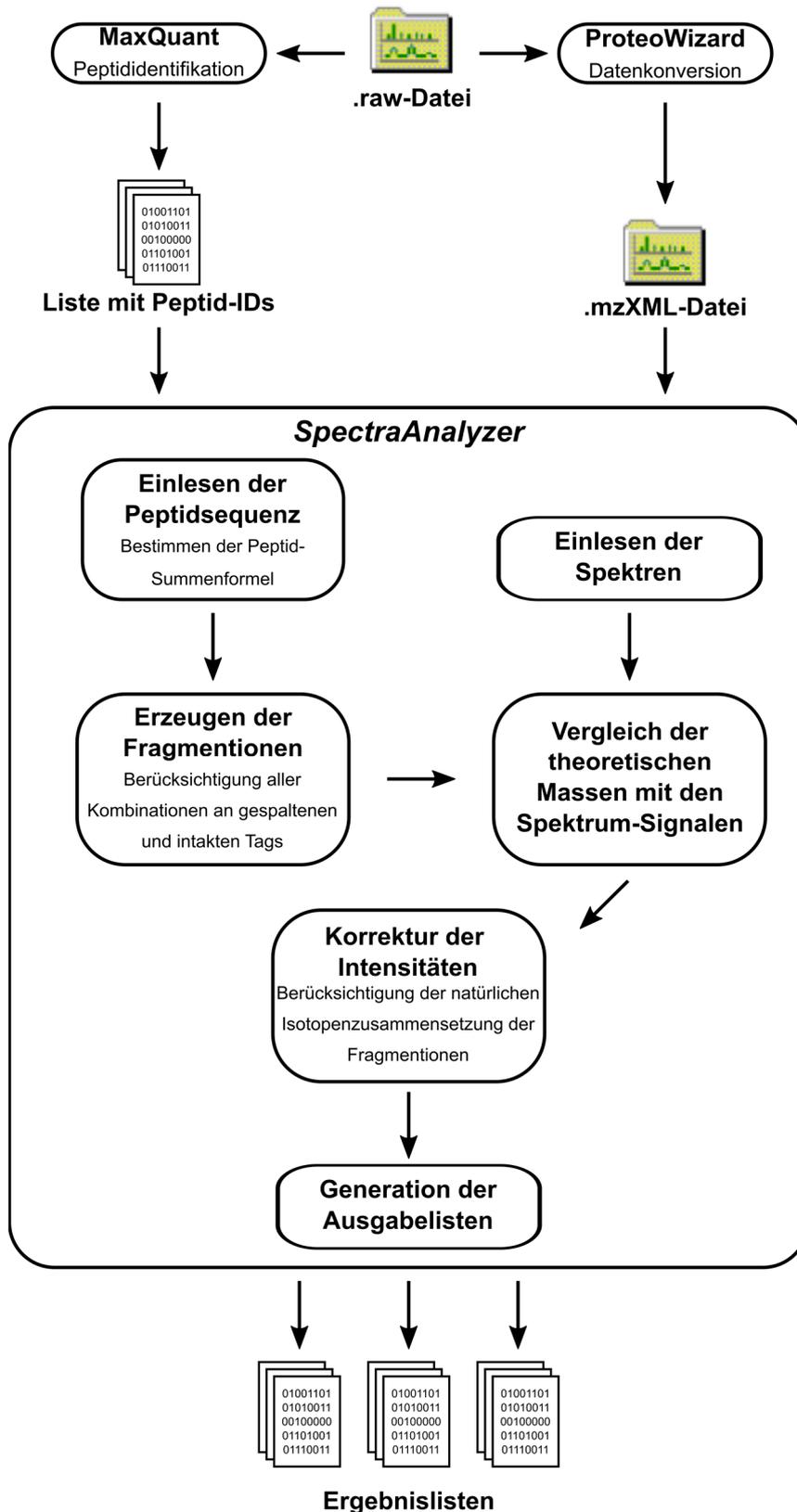


Abbildung 5.30: Schematische Übersicht über die Funktionsweise des SpectraAnalyzer-Programms. Die .raw-Dateien werden zunächst mit MaxQuant ausgewertet und durch ProteoWizard in .mzXML-Dateien umgewandelt. Anschließend können die Dateien in das Java-Programm eingelesen werden. Für jedes in MaxQuant identifizierte Peptid wird eine Liste an möglichen Fragmentationen mit intakten oder gespaltenen SOT- oder TMT-Modifikationen erstellt und das entsprechende Spektrum wird nach deren Massen durchsucht, um komplementäre Ionen zu identifizieren. Nach Korrektur der gemessenen Intensitäten werden Ausgabelisten erstellt, welche alle benötigten Informationen beinhalten, um quantitative Aussagen über die Bildung der komplementären Ionen treffen zu können.

Zur Analyse der Daten bezüglich der Entstehung von komplementären Fragmentionen wurde zunächst eine Identifikation der Peptide mit *MaxQuant* durchgeführt. Um das Einlesen der MS-Daten zu vereinfachen, wurden die Spektren-Dateien anschließend mit der *ProteoWizard*-Software in das offene *mzXML*-Dateiformat umgeschrieben.

Die so erhaltene Liste der Peptid-Identifikationen und die *mzXML*-Daten konnten daraufhin von der *SpectraAnalyzer*-Software prozessiert werden. Für jedes in *MaxQuant* identifizierte Peptid, welches eine oder mehrere SOT- oder TMT-Modifikationen trägt, wurde die Summenformel des entsprechenden, modifizierten Peptids bestimmt. Anschließend konnten die Summenformeln und exakten Massen der b- und y-Fragmentionen für das Peptid generiert werden. Hierbei wurden *in silico* zwei Arten von Fragmentionen gebildet: zum einen die üblichen Fragmentionen, welche die mögliche Spaltung der Reagenzien ignorieren und so mit dem intakten Quantifizierungsreagenz modifiziert sind. Zum anderen wurden aber auch die komplementären Ionen berücksichtigt, bei welchen das eingesetzte Reagenz fragmentiert vorliegt. Gerade dieser zweite Satz von Fragmentionen ist zur Analyse der Entstehung komplementärer Ionen notwendig und wird in den geläufigen Softwarepaketen nicht gebildet.

Zur Überprüfung der Spektren wurden die Peakinformationen der entsprechenden Spektren zunächst mit der *jmz-Reader* Bibliothek von *Griss et al.*^[156] und einer eigenen Klasse extrahiert. Daraufhin erfolgte der Vergleich aller möglichen Fragmentionen-Massen mit den Signales des MS-Spektrums unter Einhaltung sehr strenger Fehlergrenzen von maximal 5 ppm Massenabweichung. So war es möglich, Listen mit allen identifizierten Fragmentionen zu erzeugen, welche die intakte oder gespaltene Form des eingesetzten isobaren Markierungsreagenzes enthalten. Für weitere Auswertungen wurden Eigenschaften wie die Intensität der Signale oder deren Massenabweichung von den berechneten Massen ebenfalls gespeichert.

Um eine Quantifizierung durch die komplementären Ionen möglich zu machen, mussten die gemessenen Intensitäten der Ionenpaare zunächst korrigiert werden. Grund dafür ist zum einen das natürlich auftretende Isotopenmuster des leichteren, nicht isotopenmarkierten komplementären Ions von SOT¹⁸⁰, welches das Signal des isotopenmarkierten SOT¹⁷⁹ überlagert und zu dessen Intensität beiträgt. Zum anderen enthält der ¹³C-markierte Massenausgleicherteil des SOT¹⁷⁹-Reagenz einen geringen Anteil an natürlichem ¹²C anstelle der Isotopenmarkierung, wodurch die Intensität des leichteren komplementären Ions erhöht wird. Zur Veranschaulichung dieser überlagerten Effekte ist ein Beispiel in Abbildung 5.31 gezeigt.

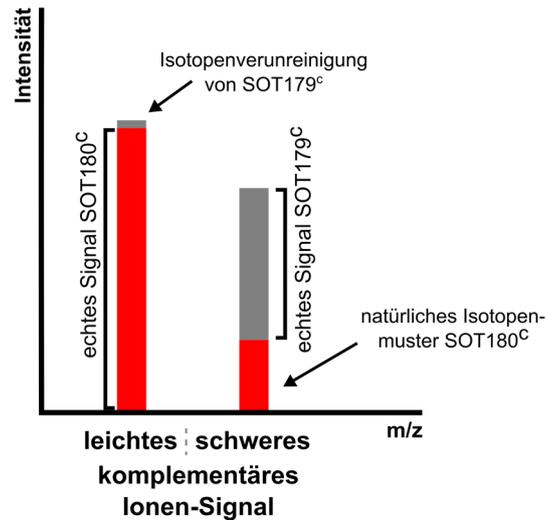


Abbildung 5.31: Signalzusammensetzung der komplementären Ionen des SOT-Duplex-Reagenz. Während das Signal des leichteren SOT180^c (rot) durch Isotopenverunreinigungen im SOT179-Reagenz erhöht wird, hat das natürliche Isotopenmuster des SOT180^c-Fragmentions einen Einfluss auf das Signal von SOT179^c (grau).

Das Ausmaß der Isotopenverunreinigung kann durch massenspektrometrische Analyse des SOT¹⁷⁹-Reagenzes einfach bestimmt werden und beträgt mit der durchgeführten Synthese lediglich 0.42 % der ¹²C-Spezies im Verhältnis zur gewünschten ¹³C-Spezies. Um den Einfluss des natürlichen Isotopenmusters des SOT180^c-Ions auf das SOT179^c-Ion abschätzen zu können, ist die Kenntnis der Summenformel des Fragmentions notwendig. Diese wurde während des Auswertungsprozesses bereits durch den *SpectraAnalyzer* bestimmt und kann für die benötigten Rechnungen verwendet werden. Als Grundlage für die Berechnungen wurden die veröffentlichten Werte der Isotopenzusammensetzung der Elemente der IUPAC verwendet.^[157] Mit den korrigierten Intensitäten der komplementären Ionen kann anschließend durch Bildung des Signalverhältnisses die Quantifizierung durchgeführt werden.

Mit Hilfe der *SpectraAnalyzer*-Software ist es möglich, eine beliebige Anzahl an MS²-Spektren in Bezug auf die Bildung der komplementären Ionen automatisch zu untersuchen. Die Ergebnisse werden abschließend als Textdateien zugänglich gemacht und können in geläufigen Programmen zur Tabellenkalkulation, wie beispielsweise *Microsoft Excel*, analysiert werden. Unter anderem enthalten die Ergebnislisten Identität, korrigierte Intensitäten aller komplementären Ionen, die Eigenschaften der gemessenen Reporterionen und eine Zusammenfassung aller komplementären Ionen pro Peptidspektrum. Die Generation dieser Ergebnislisten nimmt dabei nur wenige Minuten pro 10000 zu überprüfenden Spektren in Anspruch, so dass auch komplette MS-Experimente rasch analysiert werden können.

5.2.7 Massenspektrometrische Untersuchung komplexer SOT-markierter Proben

Durch die Entwicklung der *SpectraAnalyzer*-Software war es nun möglich, komplexe Proben sowohl mit dem TMT- als auch mit dem SOT-Duplex zu markieren, um statistische Aussagen über die unterschiedliche Effizienz der Entstehung von komplementären Ionen treffen zu können. Als komplexe

Probe wurde ein Lysat von HEK-Zellen gewählt. Nach einem Standardprotokoll zur Vorbereitung der Proben wurde hierzu das Lysat mit Dithiothreitol (DTT) reduziert, um Disulfidbrücken in Proteinen zu spalten. Zur Verhinderung einer Reoxidation der Cystein-Seitenketten wurden diese mit Iodacetamid alkyliert. Der Verdau der Proteine folgte anschließend mit Trypsin. Nach Entsalzung und Konzentration der Peptidprobe wurde diese in vier gleiche Teile aufgeteilt und jeweils mit den isobaren Markierungsreagenzien TMT¹²⁶, TMT¹²⁷, SOT¹⁷⁹ (**73**) und SOT¹⁸⁰ (**74**) markiert. Die Reaktion mit den SOT-Reagenzien erfolgte dabei in einem 150 mM TEAB-Puffer bei einem pH-Wert von 8.5. Zum Labeln von 8.5 µg Peptiden wurde eine Menge von je 1.5 mg der SOT-Reagenzien, gelöst in DMSO, eingesetzt, um eine möglichst vollständige Markierung aller Peptid-N-Termini und Lysin-Seitenketten zu erhalten. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von Hydroxylamin gestoppt. Anschließend konnten die TMT- und SOT-markierten Proben je im Verhältnis 1:1 kombiniert und analysiert werden. Das MS-Experiment wurde mit einem 120 min HPLC-Gradient durchgeführt, um viele Peptide in der komplexen Probe identifizieren zu können. Die Fragmentierung der Peptide erfolgte dabei mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 28 % HCD-Energie, was eine zur Analyse komplexer Proben übliche Energie ist.

Die Analyse der Ladungszustände der selektierten Vorläuferionen in den beiden Proben zeigt bereits erste Unterschiede. Ähnlich wie bei der Konjugation der TMT⁰- und SOT⁰-Strukturen mit dem Testpeptid zeigten die SOT-Duplex-markierten Peptide im Experiment einen höheren Ladungszustand als die TMT-Peptidkonjugate. Die Anteile der jeweiligen Ladungszustände sind in Abbildung 5.32 gezeigt. Während in der TMT-markierten Probe die Mehrheit der Peptide in einem Ladungszustand von +2 vorliegen, verändert sich die Verteilung bei der Betrachtung SOT-markierter Peptide deutlich. Wie durch den Einbau des zweiten, tertiären Amins in die Massenausgleichsgruppe vermutet, können sogar zwei Drittel der selektierten Vorläuferionen mit einem Ladungszustand von +3 und höher beobachtet werden.

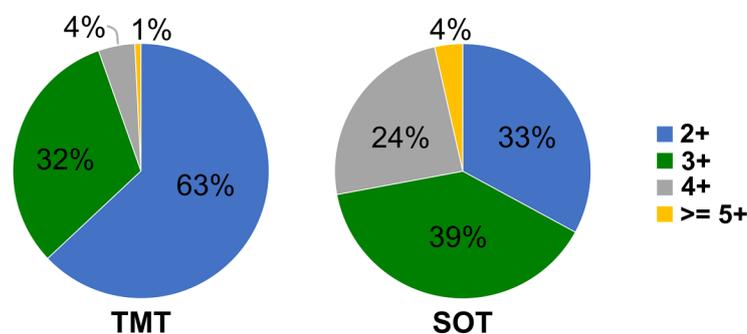


Abbildung 5.32: Vergleich der Ladungszustände der Vorläuferionen in mit TMT- oder SOT-Duplex markierten HEK-Lysatproben. Es kann eine deutliche Verschiebung hin zu höheren Ladungszuständen bei Einsatz des SOT-Duplex-Reagenzes beobachtet werden. Modifiziert nach ^[128].

Dies sollte zu einer höheren Ladungsdichte der Peptide und damit verbunden zu einer effizienteren Fragmentierung führen. Allerdings bringt dies mit sich, dass sich die Intensität der Peptid-Ionen auf mehrere Ladungszustände aufteilen kann und die einzelnen Signale dadurch eine geringere Intensität zeigen. Durch eine Erhöhung des Ameisensäure-Gehalts, welcher im LC-MS-Experiment bei 0.1 % lag, könnte jedoch eventuell ein höherer Protonierungsgrad der Probe erreicht werden, wodurch noch weniger zweifach positiv geladene Peptide in der Gasphase vorkommen sollten.

Als Nächstes sollte der Einfluss des Markierungsreagenzes auf die Peptidfragmentierung untersucht werden. Durch die komplexere Probe war es hier im Gegensatz zum Testpeptid-Experiment möglich, Fälle zu finden, in welchen das Peptid nach der Markierung mit den beiden Reagenzien den gleichen Ladungszustand zeigte. So war ein direkter Vergleich der Fragmentierungseffizienz, unabhängig von unterschiedlichen Ladungszuständen, möglich. Ein Beispiel ist für das doppelt markierte Peptid DLPEHAVLK, welches zum nuklearen Ribonukleoprotein HNRNPU gehört, in Abbildung 5.33 gezeigt.

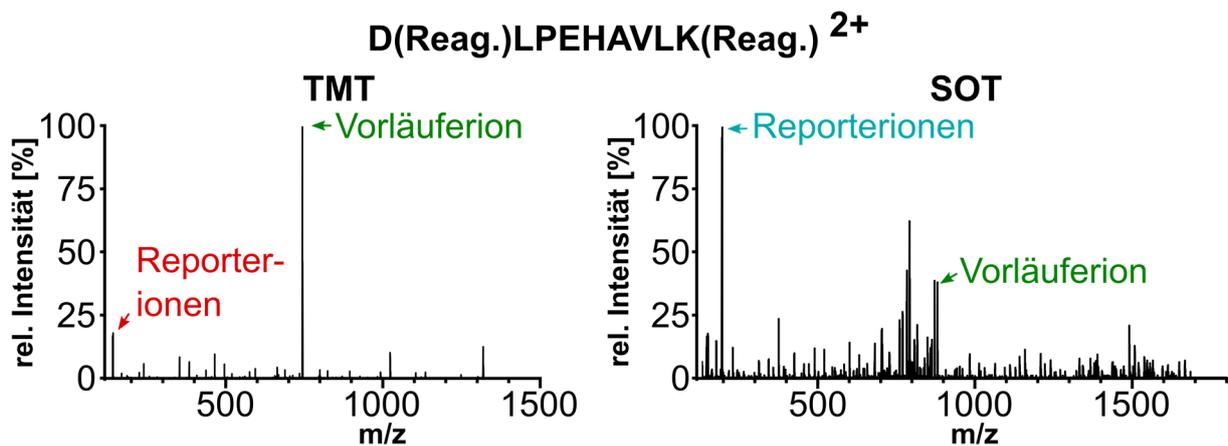


Abbildung 5.33: Vergleich der Peptidfragmentierung des doppelt-markierten, zweifach positiv geladenen Peptids DLPEHAVLK bei einer normalisierten HCD-Energie von 28 %. Während bei der Markierung mit TMT das Spektrum vom Vorläuferion dominiert wird und die Reporterionen nur eine geringe Intensität aufweisen, ist die SOT-markierte Probe weitaus effizienter fragmentiert. Das Vorläuferion kann noch mit einer Intensität von etwa 45 % gemessen werden. Die Reporterionen weisen dagegen die höchste relative Intensität auf. Reag. = verwendetes Reagenz, TMT bzw. SOT. Modifiziert nach ^[128].

Wie erwartet waren sowohl der *N*-Terminus als auch die Lysin-Seitenkette in diesem Peptid mit den eingesetzten Reagenzien markiert. Obwohl hier eine geringfügig höhere normalisierte HCD-Energie von 28 % im Vergleich zu 25 % bei der Fragmentierung des TMT⁰- und SOT⁰-markierten Testpeptids verwendet wurde, decken sich die Beobachtungen weitgehend. Für das TMT-Peptid liegt das Vorläuferion größtenteils intakt vor und stellt das Signal mit der höchsten Intensität dar. Die zur Identifizierung verwendeten Fragmentionen, sowie auch die Reporterionen hingegen sind nur in geringen Intensitäten sichtbar. Dies zeigt erneut, dass die für die Peptididentifikation verwendete Energie von 28 % HCD zumindest für doppelt geladene, TMT-markierte Peptide nicht ausreicht, um eine effiziente Fragmentierung des Peptids zu erzielen. Im Gegensatz dazu konnte das doppelt SOT-markierte Peptid selbst beim Ladungszustand von +2 in weitaus größerem Ausmaß fragmentiert werden. Das

Vorläuferion liegt hier lediglich mit einer relativen Intensität von etwa 45 % vor und auch sonstige Fragmentionen können in weitaus größerer Zahl detektiert werden, als bei dem TMT-markierten Peptid. Ein sehr großer Unterschied zwischen den Reagenzien zeigt sich vor allem in der Generation der Reporterionen. Diese stellen im Falle des SOT-markierten Peptids die intensivsten Signalen im MS²-Spektrum dar, während die analogen TMT-Reporterionen hier lediglich mit einer relativen Intensität von unter 25 % detektierbar sind. Auch eine Analyse der gebildeten komplementären (Fragment-)Ionen zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Reagenzien. Obwohl die komplementären Ionen des TMT-Duplex-Reagenz durch den beobachteten CO-Verlust (siehe Abbildung 5.27A) nicht unterscheidbar sind und sich die Intensitäten der Ionen aus beiden Konditionen addieren, konnten hier 12 komplementäre Fragmentionen mit einer mittleren relativen Intensität von lediglich 0.29 % beobachtet werden. Bei Einsatz des SOT-Reagenzes hingegen konnten 16 komplementäre Fragmentionepaare mit einer mittleren relativen Intensität von 4.71 % identifiziert werden. Dies bestätigte im Falle dieses Peptids die Annahme, dass die komplementären Ionen bei Verwendung von SOT zahlreicher und in höheren Intensitäten gebildet werden, als beim Einsatz von TMT als Quantifizierungsreagenz.

Um eine Aussage über das allgemeine Fragmentierungsverhalten treffen zu können, war es jedoch nicht ausreichend, einzelne Peptide zu analysieren. Vielmehr sollten alle in der Probe identifizierten Peptide untersucht werden, um statistische Aussagen über eine große Ionenpopulation treffen zu können. Zur Analyse der Daten wurde daher im Weiteren die entwickelte *SpectraAnalyzer*-Software verwendet.

Zunächst sollte die relative Intensität der Reporterionen in den Spektren analysiert werden, welche erste Indizien zur Spaltungseffizienz der Reagenzien liefert. Zur Visualisierung sind die Boxplots der relativen Intensitäten der jeweiligen Reporterionen in Abbildung 5.34 dargestellt.

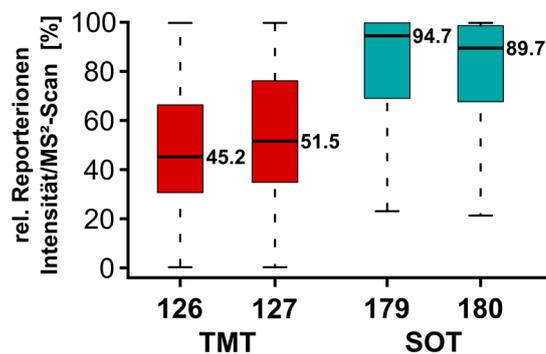


Abbildung 5.34: Statistische Auswertung der relativen Reporterionenintensität in den markierten HEK-Proben. Dargestellt sind jeweils die gemessenen relativen Intensitäten in den MS²-Scans. Bei der verwendeten normalisierten Fragmentierungsenergie von 28 % HCD bilden die SOT-markierten Peptide deutlich intensivere Reporterionen. Modifiziert nach ^[128].

Auch wenn alle in der jeweiligen Probe identifizierten Peptide betrachtet werden, ist ein signifikanter Unterschied zwischen dem Signal der gebildeten Reporterionen zu beobachten. Während der Median

der relativen TMT-Reporterionenintensität in den Spektren bei 45.2 % für TMT126 und 51.5 % für TMT127 liegt, sind die Werte mit 94.7 % für SOT179 und 89.7 % für SOT180 deutlich höher. Die Sichtbarkeit der SOT-Reporterionen ist damit bei der verwendeten Energie sehr viel besser, als die der TMT-Reporterionen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Fragmentierung der SOT-Struktur bei diesen Energien weitaus effizienter ablaufen muss, als die der TMT-Struktur, auch wenn viele verschiedene Peptide mit verschiedenen Ladungszuständen und -dichten betrachtet werden. Durch die exzellente Intensität der Reporterionen bei geläufigen Fragmentierungsenergien könnte das SOT-Reagenz ideal zur Reporterionen-Quantifizierung herangezogen werden.

Da diese Quantifizierungsmethode jedoch wie bereits erläutert stark durch co-isolierte Interferenzen verzerrt ist, sollte im Weiteren die Bildung der verzerrungsfreien komplementären Ionenpaare betrachtet werden. In Abbildung 5.35 ist die statistische Auswertung durch die *SpectraAnalyzer*-Software gezeigt.

Zunächst wurden alle in den MS-Analysen gebildeten Fragmentionen betrachtet, welche durch den eingesetzten TMT- oder SOT-Duplex markiert vorlagen. So wurden beispielsweise γ -Ionen von Peptiden, welche C-terminal auf Arginin enden, nicht berücksichtigt, da diese nicht mit einem Reagenz konjugiert sind. Für die verbleibenden, markierten Fragmentionen gibt es zwei Möglichkeiten: In einem Fall ist das gesamte Reagenz mit dem Fragmention verbunden, wodurch es sich um ein intaktes Fragmention handelt. Im anderen Fall kommt es zur Abspaltung der Reportergruppe, was zur Entstehung eines Massenausgleichs-Fragmentionen-Konjugats, also des komplementären Ions, führt.

In Abbildung 5.35A ist die Verteilung zwischen den intakten und komplementären Ionen aller identifizierten Fragmentionen für die eingesetzten Reagenzien gezeigt. Wieder zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen TMT- und SOT-markierten Peptiden, die auf die unterschiedlichen Spaltungseffizienzen der Reagenzien zurückzuführen sind. So liegen lediglich 15 % aller TMT-markierten Fragmentionen in ihrer gespaltenen Form vor und für die Mehrheit der Fragmentionen fand keine Abspaltung der Reportergruppe statt. Betrachtet man die Verteilung in der SOT-Duplex-markierten Probe, ist diese weitaus ausgeglichener. So bilden hier 42 % aller markierten Fragmentionen die komplementären Ionenpaare aus. Da bei der Spaltung SOT-Duplex markierter Fragmentionen zwei Ionenspezies entstehen, bei welchen es sich um die komplementären Ionen von SOT179 und SOT180 handelt, die Spaltung des TMT-Duplex durch den bereits diskutierten CO-Neutralverlust (siehe Abbildung 5.27A) jedoch nur in einer Ionenspezies resultiert, wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit den TMT-Daten die Anzahl an gespaltenen SOT-Fragmentionen durch 2 geteilt. Dadurch wird das entstehende komplementäre Ionenpaar als ein zusammengehörendes Signal interpretiert. Positiv ist bei der Betrachtung der SOT-Verteilung vor allem das recht ausgeglichene Verhältnis zwischen den intakten Fragmentionen, welche von den Standard-Suchalgorithmen zur Identifikation berücksichtigt werden, und den gespaltenen,

komplementären Ionenpaaren, welche zur verzerrungsfreien Quantifizierung verwendet werden können.

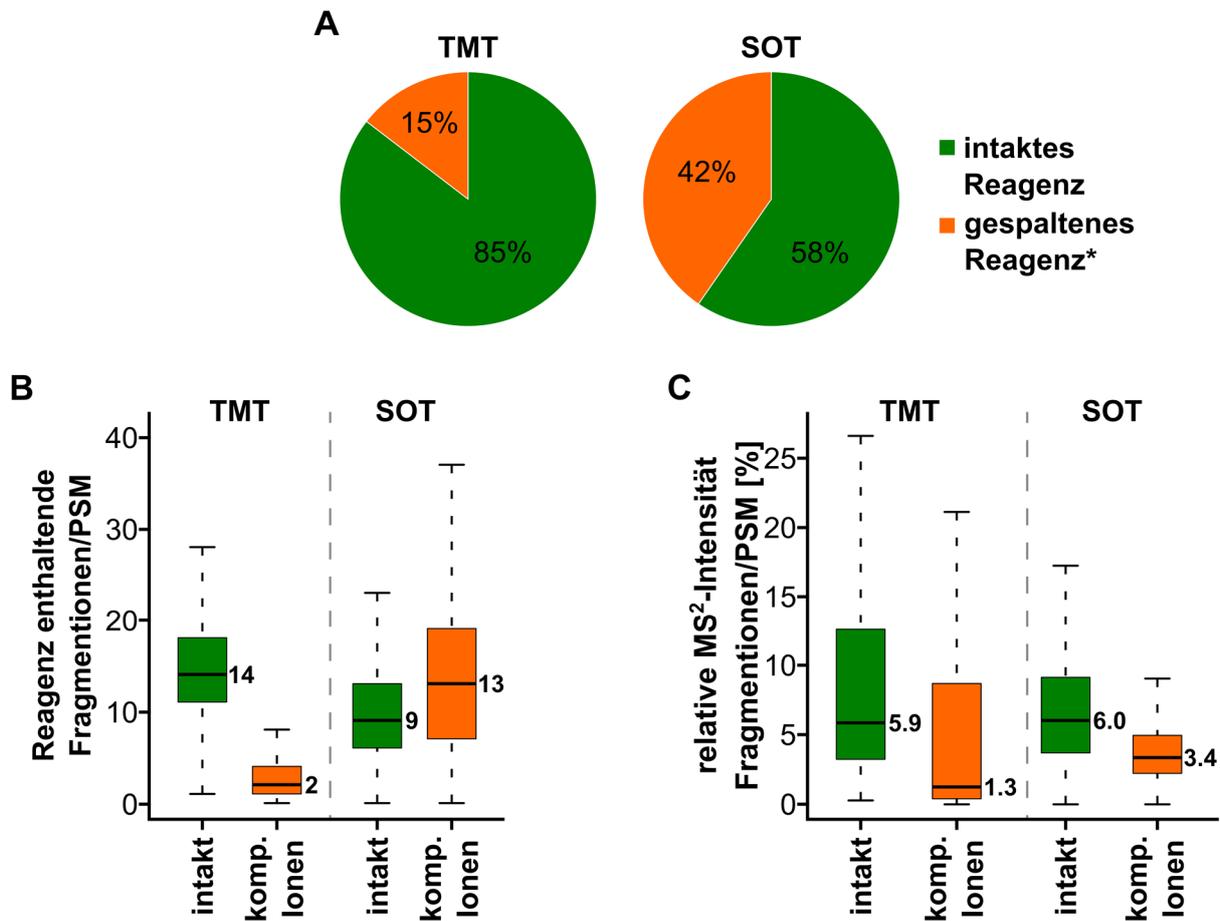


Abbildung 5.35: Statistische Untersuchung der Bildung von komplementären Ionen in markierten HEK-Proben. A) Prozentuale Verteilung aller markierten Fragmentationen. Erfolgte keine Spaltung, so liegt intaktes Reagenz vor. Wurde stattdessen die Reportergruppe abgespalten und ein komplementäres Ion gebildet, so handelt es sich um ein gespaltenes Reagenz. Da sich im Falle des SOT-Duplex zwei komplementäre Ionen nach der Spaltung bilden und im Falle des TMT-Duplex nur ein komplementäres Ion entsteht, wurde zur besseren Vergleichbarkeit die Anzahl an Ionen mit gespaltenem Reagenz für SOT durch 2 geteilt. Prozentual entstehen für SOT-markierte Peptide mehr gesplante Fragmentationen, als dies bei TMT der Fall ist. B) Anzahl der Fragmentationen, welche pro Peptid-Spektrumszuordnung (peptide spectral match, PSM) identifiziert wurden. Bei der Verwendung des SOT-Duplex bilden sich signifikant mehr komplementäre Ionen aus. C) Vergleich der relativen Intensitäten der beobachteten Signale im MS²-Spektrum pro PSM. Während die durchschnittlichen Intensitäten der intakten, markierten Fragmentationen bei der Verwendung von TMT oder SOT ähnlich sind, steigt die mittlere rel. Intensität bei Verwendung des SOT-Duplex deutlich für die komplementären Ionen an. Entnommen aus ^[128].

Als nächstes sollte untersucht werden, wie die Verteilung zwischen intakten und komplementären Fragmentationen nicht auf einer globalen Ebene, sondern pro individuellem MS²-Spektrum aussieht. Dazu wurden alle Peptid-Spektrumszuordnungen (*peptide spectral match*, PSM) einzeln durch die *SpectraAnalyzer*-Software analysiert und die erhaltenen Häufigkeiten in einem Boxplot dargestellt (siehe Abbildung 5.35B). Auch wenn man die individuellen Peptidspektren betrachtet, so sind die auf globaler Ebene gezeigten Unterschiede zwischen der TMT- und SOT-Fragmentierung weiterhin sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass das Fragmentierungsverhalten für tryptische Peptide recht universell zu sein scheint und im Mittel nicht von verschiedenen Ladungszuständen oder spezifischen

Peptidsequenzen beeinflusst werden sollte. Während TMT-markierte Fragmentionen im Mittel lediglich 2 komplementäre Ionen bilden, ist diese Anzahl bei der SOT-Probe mit im Mittel 13 komplementären Ionen deutlich höher. Dieser Trend bleibt selbst dann bestehen, wenn man ähnlich wie bei Abbildung 5.35A die Zahl der komplementären Ionen zur Kompensation der nur bei SOT-entstehenden Ionenpaare durch zwei teilt, wodurch man 6 – 7 komplementäre Ionenpaare erhält. Mit dieser Auswertung konnte deutlich gezeigt werden, dass das SOT-Reagenz, entsprechend seines Designs, mehr komplementäre Fragmentionen bilden kann, als TMT. Gleichzeitig sinkt die mittlere Zahl der intakten Ionen von 14 für TMT-markierte Fragmentionen auf 9 bei Verwendung von SOT ab. Dies könnte bedeuten, dass bei der Verwendung von SOT weniger Fragmentionen zur Verfügung stehen, welche durch bestehende Algorithmen identifiziert werden können.

Für die automatische Auswertung der MS²-Spektren ist nicht nur das Auftreten der Ionen wichtig, sondern auch deren relative Intensität im Spektrum. Deswegen wurden auch die rel. Intensitäten der Fragmentionen pro MS²-Spektrum analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.35C gezeigt. Nicht nur die Anzahl der komplementären Ionen ist bei der Verwendung von SOT deutlich höher als bei TMT, sondern auch deren relative Intensität. Diese steigt im Mittel von 1.3 % bei TMT auf 3.4 % bei SOT deutlich an. Die mittlere relative Intensität der intakten Fragmentionen, welche zur Sichtbarkeit der zur Identifikation notwendigen Ionen beiträgt, ändert sich zwischen TMT und SOT kaum.

Durch die Analyse der komplexen HEK-Probe konnte deutlich gezeigt werden, dass sich die Fragmentierungseigenschaften zwischen TMT und SOT stark unterscheiden. Wie durch das Design des Reagenzes erwartet, bilden sich die komplementären Fragmentionen signifikant häufiger und mit höheren relativen Intensitäten aus. Gerade diese Eigenschaft sollte dazu führen, dass die Quantifizierung über die komplementären Ionenpaare nach der TMT^c (bzw. TMTc⁺)-Methode bei Einsatz der SOT-Reagenzien nicht mehr durch die Entstehung der komplementären Ionen limitiert wird. Zusätzlich können anstelle des intakten komplementären Peptidions auch die bei SOT häufig auftretenden komplementären Fragmentionen zur Quantifizierung herangezogen werden, was durch die Verwendung mehrerer Quantifizierungspunkte pro Spektrum in einer noch akkurateren Quantifizierung resultieren könnte.

Um zu untersuchen, ob die Quantifizierung über die komplementären Fragmentionen des SOT-Duplex bei stark von *ratio-distortion*-betroffenen Proben akkurater abläuft als die klassische Reporterionen-Quantifizierung, wurde zunächst eine stark verzerrte Probe hergestellt. Die Grundlage des Experiments ist in Abbildung 5.36A dargestellt. Eine komplexe HEK-Peptidprobe wurde mit TMT- bzw. SOT-Duplex markiert und die leichten und schweren Kanäle anschließend im Verhältnis 1 zu 1 gemischt, um einen Peptidhintergrund zu simulieren.

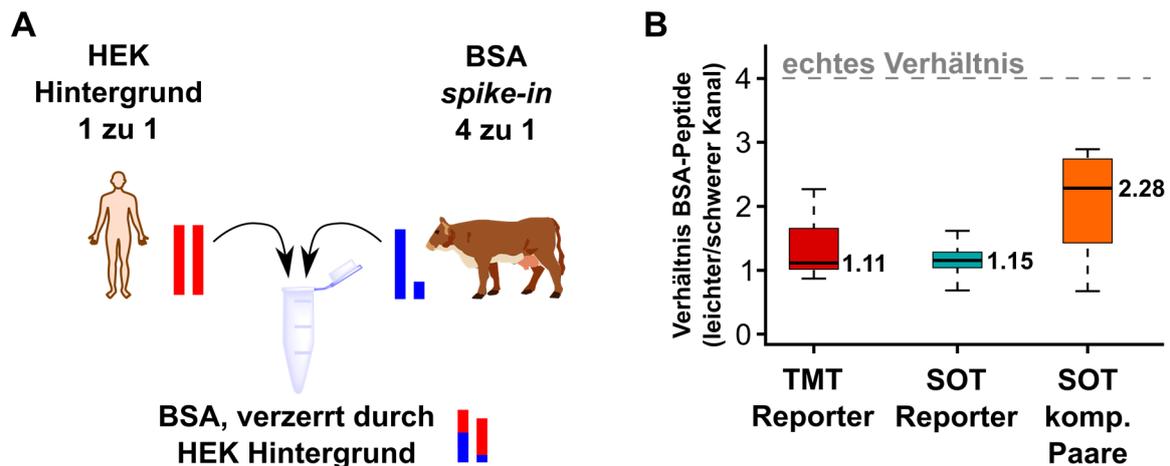


Abbildung 5.36: Experiment zur Quantifizierung über die komplementären Ionenpaare. A) Aufbau des Experiments. In einen großen Überschuss 1:1-markierter humaner HEK-Peptide wird eine geringe Menge an 4:1-markierten BSA-Peptide gegeben. So wird das Verhältnis der BSA-Peptide durch den HEK-Hintergrund stark Richtung 1:1 verzerrt. B) Ergebnisse der Quantifizierung. Während die Reporterquantifizierung mit TMT oder SOT den vermuteten, starken *ratio distortion*-Effekt zeigt und das normalisierte Verhältnis falsch als etwa 1:1 angenommen wird, verbessert sich das normalisierte, mittlere Verhältnis bei Quantifizierung über die komplementären Ionenpaare von SOT deutlich auf 2.28:1. Entnommen aus ^[128].

Zusätzlich wurde auch Rinder-Serumalbumin (BSA) mit den jeweiligen Reagenzien markiert, hier aber im Verhältnis 4 zu 1 gemischt. Anschließend wurden die beiden Proben kombiniert, so dass eine geringe Menge an markierten BSA-Peptiden (1 pmol) in einer großen Menge an markierten humanen Peptiden (1 µg) als Hintergrund vorlag. Dies sollte zu einer sehr stark verzerrten Probe führen, da viele humane Peptide als Interferenzen agieren können und das gemessene Reporter-Verhältnis auf 1:1 normalisieren.

Die Ergebnisse der BSA-Quantifizierung mit TMT und SOT sind in Abbildung 5.36B gezeigt. Wie erwartet führt die Reporterquantifizierung zu gemessenen Verhältnissen, welche durch den humanen Peptidhintergrund sehr stark in Richtung 1 zu 1 verzerrt sind. Dabei macht es keinen Unterschied, ob die Reporterquantifizierung über die TMT- oder die SOT-Reporterionen erfolgt, da jegliche MS²-Quantifizierung über die Reporterionen der gleichen Interferenz unterliegt. Wurden stattdessen die komplementären Fragmentionen der SOT-markierten Peptide zur Quantifizierung herangezogen, konnten 155 komplementäre Ionenpaare, verteilt auf 17 BSA-Peptide, verwendet werden. Wie durch das Design des SOT-Reagenzes erhofft, sind somit über neun Mal mehr Quantifizierungspunkte vorhanden, als wenn nur die üblichen Reporterionenpaare oder die komplementären Ionenpaare des intakten Peptids verwendet werden. Nach der Normalisierung des gemessenen Proteinhintergrunds auf 1 zu 1 konnte so ein mittleres Verhältnis von 2.28 zu 1 gemessen werden. Dies zeigt eine deutliche Verbesserung gegenüber der Reporterquantifizierung um den Faktor zwei. Allerdings war es nicht möglich, über diese Methode das wahre Verhältnis von 4 zu 1 zu ermitteln. Eine Ursache dafür könnte in

Annäherungen bei der Korrektur der gemessenen Intensitäten liegen (siehe Abbildung 5.31), welche nicht das komplette Isolationsfenster des Vorläuferions mitberücksichtigt. Des Weiteren ist es möglich, dass die Markierungseffizienz auf Grund von unterschiedlichen Reinheiten der SOT179- und SOT180-Reagenzien in diesem Experiment nicht gleichmäßig war. Da die Normalisierung auf den Proteinmedian, welche üblicherweise zumindest geringe Unterschiede zwischen den Markierungseffizienten ausgleichen kann, hier auf den humanen Peptidhintergrund ausgeführt werden musste und die BSA-Peptide aus einem separaten Markierungsexperiment stammen mussten, ist die gleichbleibend hohe Markierungseffizienz besonders wichtig. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Quantifizierung über die abundanten komplementären Fragmentationen der SOT-markierten Peptide akkurater durchführbar ist, als über die Reporterquantifizierung.

5.2.8 Limitationen beim Einsatz der SOT-Reagenzien

Durch die massenspektrometrische Untersuchung der komplexen, SOT-markierten HEK-Probe konnte gezeigt werden, dass sich die Fragmentierungseigenschaften deutlich von denen der TMT-markierten Probe unterscheiden. Insbesondere die hohe Anzahl an gebildeten komplementären Ionen entspricht hier den Erwartungen des Reagenzdesigns. Allerdings konnten auch Herausforderungen beim Einsatz der SOT-Reagenzien festgestellt werden.

Durch die Markierung der Peptide mit dem SOT-Duplex kommt es zu einer Verminderung der MS²-Spektrums-Identifikationsrate von Peptiden im Vergleich mit TMT-markierten Proben. Beispielsweise wurde im Fall der markierten HEK-Lysate die Identifikationsrate von 35 % für TMT auf 20 % für SOT gesenkt. Die Anzahl an aufgenommenen MS²-Spektren war jedoch mit 46062 Spektren in der TMT-markierten und 42169 Spektren in der SOT-markierten Probe vergleichbar (Unterschied von ≈ 8.5 %). Dies bedeutet, dass in beiden Proben eine ähnliche Anzahl an Signalen mit ausreichender Intensität und einer Ladung von mindestens +2 zur Isolation und Fragmentierung zur Verfügung standen, die Identifikation der aufgenommenen Spektren für SOT jedoch nicht optimal funktioniert hat. Hierfür könnten zwei Ursachen in Frage kommen: unvollständige Markierung mit den eingesetzten SOT-Reagenzien oder das komplizierte Fragmentierungsverhalten der SOT-markierten Peptide.

Zur Identifikation der markierten Peptide wurde während der Datenanalyse in *MaxQuant*, wie für isobare Markierungsexperimente üblich, angenommen, dass es sich bei den an die Lysin-Seitenketten und N-Termini angebrachten Reagenzien um statische Modifikationen handelt, d.h. dass diese an jeder möglichen Stelle auch erfolgreich konjugiert wurden. Ist dies nicht der Fall, wenn beispielsweise der N-Terminus eines Peptids unmarkiert bleibt, so misslingt die Identifikation, da das Kandidatenpeptid ohne erfolgreiche Markierung nicht in Betracht gezogen wird. Da die Reinheit von SOT179 und SOT180 jedoch nicht genau festgestellt werden konnte, ist es möglich, dass die Markierung nicht vollständig

abliefe. Um einen möglichst vollständigen Markierungsgrad zu gewährleisten, wurde für die Markierungsexperimente daher ein sehr hoher Überschuss von 1.5 mg Reagenz (≈ 3147 nmol) pro 40 μg Peptide eingesetzt, wohingegen bei TMT lediglich 0.32 mg (≈ 940 nmol) Reagenz zum Einsatz kamen. Auf die Verwendung eines noch höheren Überschusses an den SOT-Reagenzien wurde verzichtet, um Serin-, Threonin-, und Tyrosin-Markierungen und eine zu hohe Menge an schwer abtrennbarem, gequenchtem Reagenz zu vermeiden. Zur Feststellung des Markierungsgrades wurde eine dynamische Suche mit dem *Sequest*-Algorithmus durchgeführt, bei welcher sowohl eine vollständige als auch unvollständige Markierung in Betracht gezogen wird. Bei dieser Suche verbesserte sich die Identifikationsrate auf 33.3 % und es konnte festgestellt werden, dass 31.3 % aller identifizierbaren Peptide nicht vollständig gelabelt waren: 19.4 % wurden nicht am N-Terminus markiert, bei 9.9 % fehlte die Markierung einer Lysin-Seitenkette und 1.8 % wurden gar nicht markiert (alle Prozentsätze nach Berücksichtigung der Falschidentifikationsrate). In der TMT-Probe betrug die Rate der nicht vollständig markierten Peptide dahingegen nur 7.1 % und lediglich 0.2 % der Lysin-Reste waren nicht umgesetzt. Da eine unvollständige Markierung nicht nur zu einer größeren Variation in der Quantifizierung führt, sondern auch die MS^1 -Spektralkomplexität erhöht wird, sinkt die Peptidentifikationsrate auch bei einer dynamischen Suche ab. Durch eine Verbesserung der Markierungsrate, etwa durch Bestimmung der Reagenzien-Reinheit oder durch optimierte Protokolle zur Peptidkonjugation, könnten so vermutlich auch mehr Peptide identifiziert werden.

Als zweite Ursache könnte das komplexe Fragmentierungsverhalten SOT-markierter Peptide in Frage kommen. Da die meisten Suchalgorithmen die zusätzlich gebildeten, komplementären Fragmentationen nicht berücksichtigen, entstehen viele weitere Signale im MS^2 -Spektrum, welche nicht vom Algorithmus erklärt werden können. Dadurch sinkt der *Score* des Peptids ab und einige der Peptide werden von der Software fälschlicherweise als falsch-positive Identifikationen gewertet. Des Weiteren scheint es zusätzlich zur Bildung der komplementären Ionen auch zur Entstehung weiterer, nicht-klassischer Peptidfragmente zu kommen. So ist in Abbildung 5.37 als Beispiel ein Spektrum des doppelt markierten Peptids EILIPVFK⁴⁺ gezeigt. Zwar sind in diesem Spektrum wieder sehr deutlich die intensiven Reportationen zu sehen, und auch sieben komplementäre Fragmentationenpaare und sieben intakte Fragmentationen können in ausreichender Intensität detektiert werden, aber bei der Mehrheit der Signale scheint es sich um Spezies zu handeln, welche nicht eindeutig zugeordnet werden können. Gerade im niedrigen m/z -Bereich entstehen einige Signale mit hohen relativen Intensitäten. Um die Peptidentifikationsrate zu verbessern, müssten zunächst die komplementären Fragmentationenpaare mit in die Suchalgorithmen einbezogen werden. Darüber hinaus wäre es hilfreich, die Herkunft der bis jetzt nicht zugeordneten Fragmentationen aufzuklären, um diese ebenfalls in den Suchalgorithmen berücksichtigen zu können.

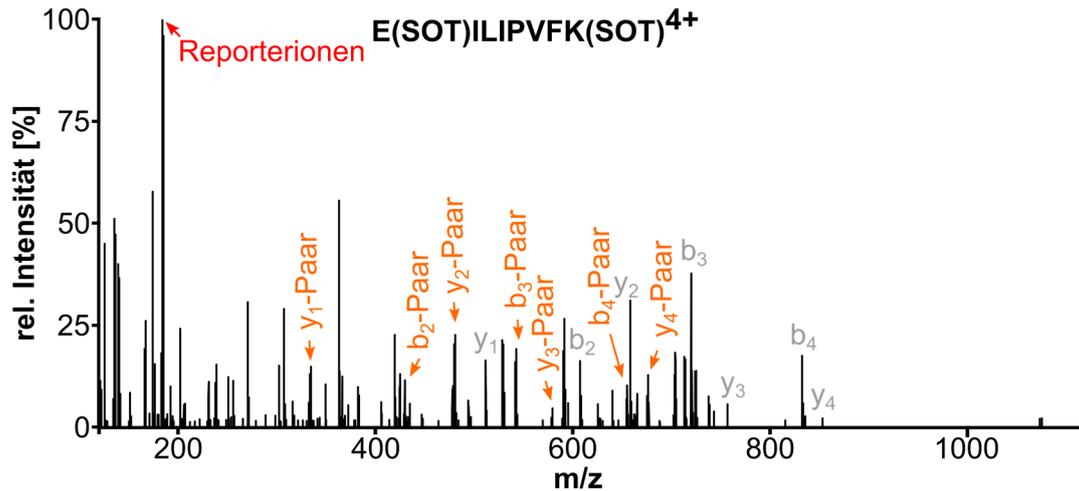


Abbildung 5.37: MS²-Spektrum des doppelt markierten, vierfach positiv geladenen Peptids EILIPVFK. Die sehr gut sichtbaren Reporterionen sind durch einen roten Pfeil, komplementäre Fragmenten-Paare durch orangene Pfeile und intakte Fragmentionen durch graue Buchstaben markiert. Entnommen aus ^[128].

5.2.9 Untersuchung einer modifizierten Reagenzstruktur

Eine Erhöhung der Peptid-Identifikationsrate könnte vermutlich durch ein Reagenz erreicht werden, welches zu einer vollständigen Markierung aller Peptide führt und welches bei der Fragmentierung weniger unspezifische Ionen bildet. Um den Einfluss der Reagenzstruktur auf diese Ziele zu untersuchen, wurde eine vereinfachte Teststruktur **73** entworfen, welche in Abbildung 5.38 gezeigt ist.

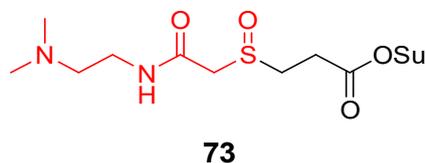


Abbildung 5.38: Struktur des Testreagenzes **73** zur Untersuchung des Einflusses der Massenausgleichsgruppe auf die Markierungseffizienz und Fragmentierungseigenschaften.

Diese Struktur unterscheidet sich im Vergleich zum SOT-Reagenz **57** durch das Entfernen der Massenausgleichs-Gruppe. Dadurch sollten gleich mehrere Fragestellungen untersucht werden. So könnte die Markierungseffizienz des SOT-Reagenz **57** durch sterische Gründe verringert worden sein, welche in der Teststruktur **73** durch das Fehlen des Massenausgleichs-Teils nicht auftreten können. Zusätzlich sollte mit nur einem statt zwei tertiären Aminen die Ladungsdichte der markierten Peptide gesenkt werden, was zu einer etwas geringeren Fragmentierungseffizienz führen könnte. Die Bildung von unspezifischen Fragmenten könnte dadurch verringert werden, ohne die Entstehung der komplementären Fragmentionen zwangsläufig deutlich zu verringern. Das unmarkierte Testreagenz **73** wurde von *Jana Bogena, M. Sc.*, synthetisiert und wird im Folgenden mit IsSOT (*less steric SOT*) bezeichnet.

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurden *E.Coli*-Lysate zunächst unter den gleichen Bedingungen wie bei den vorherigen HEK-Lysaten mit TMT126 und IsSOT (**73**) markiert. Die Auswertung der

Daten erfolgte anschließend mit einer dynamischen Suche nach den Modifikationen, um die Markierungseffizienz feststellen zu können. Während mit TMT126 ähnliche Markierungslevel wie bei den vorherigen Experimenten erreicht werden konnten (7.4 % nicht vollständig markierte Peptide), verlief die Markierung der Peptide mit IsSOT weniger erfolgreich. So waren 43.8 % der identifizierten Peptide nicht vollständig markiert, von welchen 21.5 % unmarkierte Lysine enthielten.

Um den Grad der Markierung zu erhöhen, wurde als Nächstes ein optimiertes Markierungsprotokoll herangezogen, welches EPPS-Puffer verwendet, die Markierung bei einem pH-Wert von 8 durchführte und Guanidiniumchlorid einsetzte, um die Peptide während der Reaktion zur besseren Zugänglichkeit zu linearisieren.^[158] Mit diesem Protokoll konnte die Anzahl unvollständig markierter Peptide beim Einsatz von TMT auf 2.2 % reduziert werden. Obwohl mit diesem Protokoll die Markierung mit IsSOT auch besser verlief, waren immer noch 36.4 % der Peptide unvollständig markiert. Auch die Verwendung eines zweiten Produkt-Batches konnte diesen Wert nicht verbessern.

Da die optimalen Markierungsbedingungen eventuell von der Struktur des Reagenzes abhängen können, wurden im Weiteren einige Parameter geändert. Die Erhöhung der Reagenzmenge von 79 nmol auf 125 nmol pro μg Peptidmenge führte zu einer Probe, in der kaum Peptide identifiziert werden konnten. Dies könnte darauf hindeuten, dass in dem verwendeten Reagenz Verunreinigungen enthalten sind, welche die Peptide ebenfalls modifizieren können. ^1H -NMR-Analysen des Reagenzes bestätigten jedoch dessen Reinheit, so dass es sich bei diesen Verunreinigungen eventuell um im Protonen-NMR nicht sichtbare Salze handeln könnte. Bei dem nächsten Versuch wurde die Reagenzmenge wieder reduziert und stattdessen der pH-Wert während der Reaktion auf einen Wert von 8.5 erhöht, um eine schnellere Reaktion mit den bei diesem pH-Wert nukleophileren *N*-Termini und Lysin-Seitenketten herbeizuführen. Dies ist jedoch gleichzeitig immer auch mit einer schnelleren Hydrolyse des Aktivesters verbunden. Mit diesen Reaktionsbedingungen wurde eine unvollständige Markierung der Peptide von 41.6 % gemessen, wobei das Verhältnis von unmarkierten *N*-Termini und Lysin-Seitenketten jedoch ausgeglichener war. In einem weiteren Markierungsversuch wurde das Reagenz nicht auf einmal zugegeben, sondern bei einem pH-Wert von 8.0 in sechs Portionen alle zehn Minuten. Dies sollte dazu führen, dass stets frisches, unhydrolysiertes Reagenz zur Reaktion bereitgestellt wird. Allerdings konnte auch durch diese Veränderung des Protokolls keine Verbesserung der Markierungseffizienz festgestellt werden, da immer noch 45.9 % der Peptide unvollständig markiert vorlagen.

Um zu überprüfen, ob es während der Markierungsreaktion zu ungewünschten Nebenreaktionen kommt, wurden die Messungen nach der Markierung mit den EPPS-pH 8-Bedingungen einer offenen Suche unterzogen. Hierbei handelt es sich um eine Auswertemethode, bei welcher dem *Sequest*-Algorithmus sehr große Fehlergrenzen des Vorläuferions, in diesem Fall von ± 260 Da, eingeräumt werden. Zwar erhöht dies die zur Peptididentifikation benötigte Zeit deutlich und die Zahl falsch-positiver

Zuordnungen steigt an, allerdings können so häufig vorkommende, unbekannte Modifikationen an den Peptiden festgestellt werden.

Für die hier analysierten Proben wurde zusätzlich zu den hohen Fehlergrenzen auch die statische Modifikation aller Lysine und *N*-Termini durch die jeweiligen Reagenzien angenommen. Die Massenabweichung der identifizierten Peptidionen gibt somit an, um wie viel die Masse von den erwarteten, vollständig markierten Peptiden abweicht. Nur, wenn eine Massenabweichung häufiger vorkommt, ist sie im Histogramm deutlich zu erkennen und weist damit auf eine tatsächlich vorkommende Modifikation hin. Nachdem die Peptididentifikation durch den Algorithmus abgeschlossen war, wurde ein Histogramm der jeweiligen Masseabweichungen mit einer Bin-Größe von 0.5 Da erstellt. Die Histogramme sind in Abbildung 5.39 dargestellt.

Das Histogramm der TMT126-markierten Probe zeigt die erwartete Verteilung. Der Großteil der Massenabweichungen beträgt zwischen 0 und 1 Da, was bedeutet, dass die meisten Peptide vollständig markiert vorliegen. Ein erhöhtes Auftreten von etwa 16 Da Massenabweichung entsteht durch die Oxidation von Methionin-Seitenketten, welche erwartet und üblicherweise in Form einer dynamischen Modifikation berücksichtigt wird. Auffällig ist zusätzlich ein Signal bei etwa 226 Da Massenabweichung, was einer zusätzlichen Markierung mit TMT entspricht. Hierbei handelt es sich vermutlich um Peptide, bei welchen nicht nur der *N*-Terminus und eventuell vorhandene Lysine, sondern auch Serine, Threonine oder Tyrosine markiert vorliegen.

Im Gegensatz dazu sind im Histogramm der IsSOT-markierten Probe, zusätzlich zu den erwarteten Signalen bei 0 Da und 16 Da, noch einige weitere Signale zu beobachten. Häufig kommt hier beispielsweise eine Masseabweichung von -232 Da vor, welche von unvollständig markierten Peptiden stammt. Eine öfter beobachtete Abweichung von etwa -178 Da könnte durch eine Sulfoxid-Spaltung und den damit einhergehenden Verlust der Reportergruppe in der Ionenquelle herbeigeführt werden, da die entstehende Alken-Modifikation die Masse von 54.0106 Da besitzt, was der Differenz aus der IsSOT-Masse von 232 Da und der Reportergruppe von 178 Da entspricht. Die Herkunft anderer häufig beobachteter Masseabweichungen von etwa -160 Da und -132 Da kann jedoch nicht erklärt werden. Auch für die häufiger vorkommenden, positiven Modifikationsmassen konnten keine offensichtlichen Erklärungen gefunden werden. So scheint es, dass die Reinheit der Reagenzien eindeutig verbessert werden muss, um unspezifische Nebenreaktionen bei der Peptidmarkierung zu vermeiden.

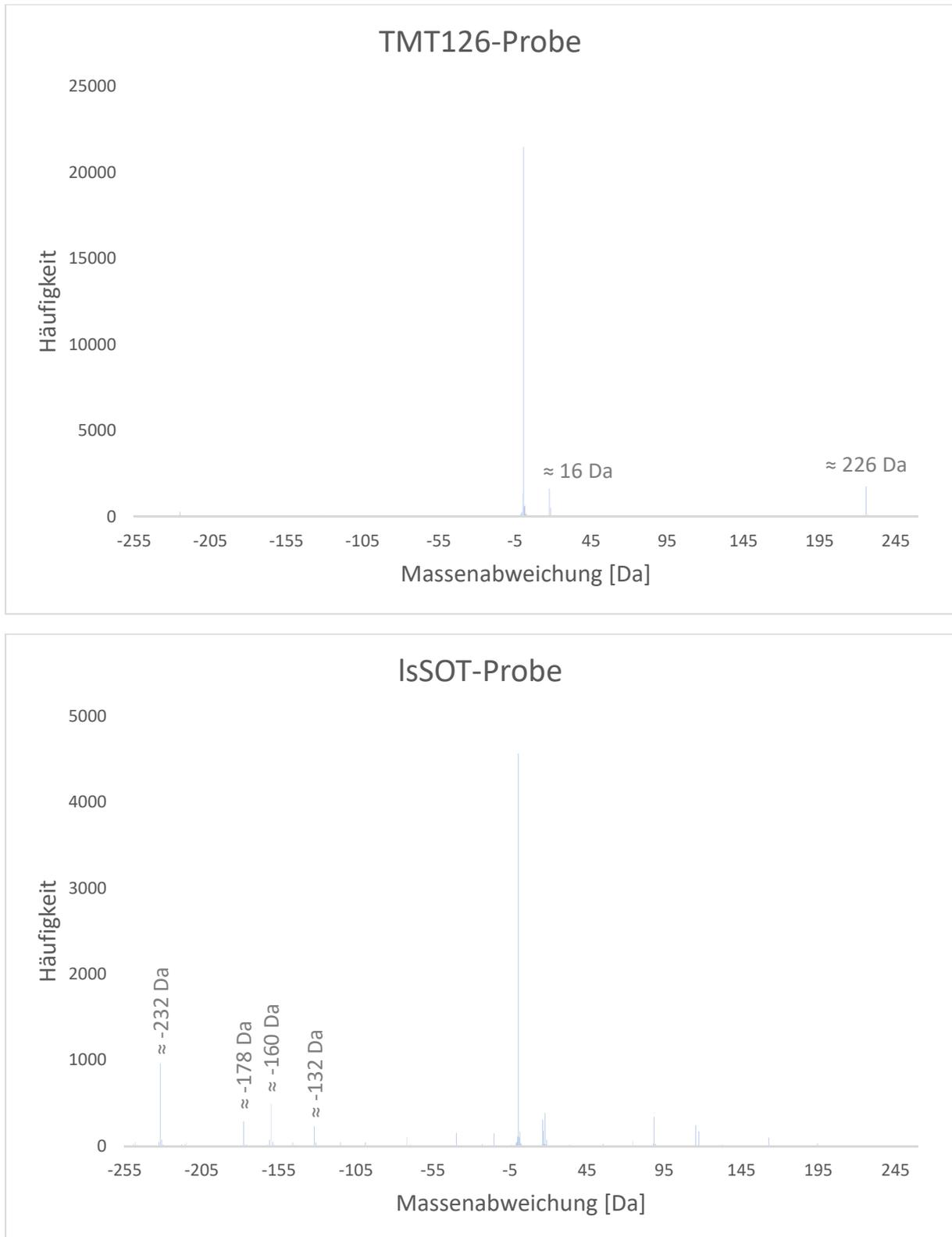


Abbildung 5.39: Histogramme nach offenen Suchen markierter E.Coli Proben. Es wurden Massenabweichungen von -260 Da bis +260 Da erlaubt. Bei der TMT126-Markierung werden kaum unerwartete Massenabweichungen detektiert. Im Falle der IsSOT-markierten Peptide jedoch können einige zusätzliche häufig vorkommende Modifikationsmassen detektiert werden.

Um zu untersuchen, ob die Verwendung eines *rp*-HPLC-aufgereinigten NHS-Esters durch höhere Sauberkeit bessere Markierungseffizienzen liefern kann, wurde ein Vorläufer des IsSOT-Reagenzes getestet, bei welchem die Oxidation noch nicht durchgeführt wurde und somit ein unpolares Molekül

darstellt. Das IsST (**74**) (*less steric sulfide tag*) genannte Reagenz ist in Abbildung 5.40 gezeigt und wurde von *Jana Bogena, M. Sc.*, synthetisiert sowie über HPLC aufgereinigt.

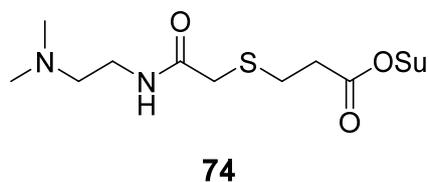


Abbildung 5.40: Struktur des IsST-Reagenz 74 zur Untersuchung der Markierungseffizienz. Aufgrund des fehlenden Sulfoxids ist dieses Reagenz vermutlich nicht zur Durchführung von Quantifizierungsexperimenten, sondern lediglich zur Markierung von Peptiden geeignet. Das Reagenz wurde von *Jana Bogena, M. Sc.*, synthetisiert und aufgereinigt.

Nach Aufreinigung des Reagenzes wurden erneut Markierungsexperimente mit *E. Coli*-Lysat durchgeführt. Dazu wurden 10 µg Lysat einmal als Kontrolle mit TMT⁶-126 in der üblichen Konzentration (9.67 mM) und zweimal mit dem IsST-Reagenz in der gleichen (9.67 mM) und doppelten (19.34 mM) Konzentration bei Verwendung des EPPS-Puffersystems in Gegenwart von Guanidiniumchlorid markiert. Bei der Verwendung des IsST-Reagenzes (**74**) konnte eine weitaus bessere Markierungseffizienz festgestellt werden. Während in der TMT-Kontrolle 2.2 % der Peptide nicht vollständig markiert waren, betrug die unvollständige Markierung bei Verwendung des IsST-Reagenzes in der gleichen Konzentration 2.5 %. Die Peptididentifikationsrate war dabei in beiden Proben vergleichbar hoch. In der Probe, welche mit der doppelten Menge IsST markiert wurde, konnte der Anteil unvollständig markierter Peptide auf 1.9 % gesenkt werden, allerdings wurden so 11.1 % weniger Peptide identifiziert. Der Einsatz des HPLC-aufgereinigten Reagenz **74** zeigte somit, dass eine vergleichbare Markierungseffizienz zum kommerziellen TMT-Reagenz erzielt werden kann. Interessanterweise zeigte eine genauere Untersuchung der MS²-Spektren der IsST (**74**) markierten Peptide das Auftreten eines einfach positiv geladenen Ions mit der Masse 163.0900 Da in geringen bis mittleren Intensitäten. Eine mögliche Struktur dieses Ions **75** ist in Abbildung 5.41 dargestellt. Durch die Erhöhung der Fragmentierungsenergie von 32 % normalisierter HCD-Energie auf 36 – 40 % könnte dieses Ion eventuell auch für Quantifizierungsexperimente herangezogen werden.

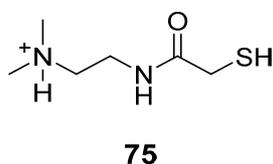


Abbildung 5.41: Potenzielle Struktur des bei der Fragmentierung von IsST-markierten Peptiden auftretenden Ions 75 mit m/z 163.0900.

Da anhand von Reagenz **74** bestätigt werden konnte, dass die Reinheit der Moleküle entscheidend für eine hohe Markierungseffizienz ist, wurde auch das IsSOT-Reagenz **73** in einem weiteren Experiment von *Jana Bogena, M. Sc.*, HPLC-aufgereinigt, um eine sehr reine Probe des Reagenz zu erhalten.

Anschließend wurde das mit IsST (**74**) durchgeführte Experiment mit HPLC-aufgereinigtem **73** unter denselben Bedingungen wiederholt.

Dadurch war es möglich, die Markierungseffizienz signifikant zu steigern. Bei einer Konzentration von 9.67 mM an HPLC-gereinigtem IsSOT (**73**) wurden so nur 3.0 % nicht vollständig markierte Peptide detektiert. Eine Verdopplung der eingesetzten Reagenzmenge verbesserte die Markierungseffizienz weiter, so dass nur 2.5 % der Peptide nicht vollständig markiert waren. Die so erhaltenen Werte der Markierungseffizienz sind durchaus mit denen beim Einsatz anderer Reagenzien, wie IsST (**74**) oder TMT vergleichbar.

Dennoch konnte auch in den so beinahe vollständig markierten Proben gezeigt werden, dass die Peptididentifikationsrate durch Einsatz des Sulfoxid-basierten Reagenzes verringert wird. Konnten im durchgeführten Kontrollexperiment mit IsST (9.67 mM, **74**) 11695 Peptide bei einer Falscherkennungsrate von 1 % identifiziert werden, so sank dieser Wert bei den IsSOT-Proben auf 3164 bzw. 3310 (bei der Konzentration von 9.67 mM bzw. 19.34 mM) ab. Dies entspricht einer Reduktion um 72.9 % bzw. 71.8 % und geht mit einer Verringerung der MS/MS-Identifikationsrate von 58.7 % (IsST, **74**) auf 28.4 % bzw. 27.7 % einher. Erstmals war es damit durch den direkten Vergleich der Reagenzien mit (IsSOT) und ohne (IsST) Sulfoxidfunktion möglich, den Einfluss der unterschiedlichen starken Fragmentierung auf die Peptididentifikationsrate abschätzen zu können.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass auch beim Einsatz von Sulfoxid-enthaltenden Molekülen hohe Markierungseffizienzen erreicht werden können, wenn dafür hochreine Reagenzien eingesetzt werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die Markierungseffizienz des SOT-Reagenzes (**57**) ebenfalls gesteigert werden kann. Des Weiteren muss untersucht werden, ob die Peptididentifikationsrate durch Verwendung anderer Suchalgorithmen gesteigert werden kann, oder die Komplexität der MS²-Spektren aufgrund der Sulfoxid-Fragmentierung dafür zu hoch ist. Selbst, wenn die Peptididentifikation nicht durch die Modifizierung der Suchalgorithmen verbessert werden kann, könnten die Sulfoxid-basierten Quantifizierungsreagenzien ideal für den Einsatz bei der gezielten Quantifizierung von Peptiden geeignet sein (engl. *targeted proteomics*). Da die Identitäten der Zielpeptide in diesem Fall im gesamten Experiment bekannt sind, ist die Datenbank-Identifikation der Peptide nicht notwendig und die relative Quantifizierung könnte anhand der effizient gebildeten komplementären Fragmentionen akkurat erfolgen.

5.2.10 Autorenbeiträge

Von Dr. Milan Dejmek wurden Studien zur Darstellung der PyrRep-Struktur sowie die Synthese des Pyrrol-basierten Testmoleküls **43** und die Syntheserouten zum angestrebten Sulfoxid **44** durchgeführt, die Strukturen der PyrRep-Grundstruktur, deren Retrosynthese und die Struktur der Reagenzien wurde

dabei von mir erarbeitet. *Oleg Grossmann, M. Sc.*, führte die Synthesen zu Reagenz **44** und zum Reagenz der zweiten Generation **49** im Rahmen einer Masterarbeit durch. *Sarah Breuer, M. Sc.*, führte im Rahmen einer Masterarbeit die Synthese zur Sulfoxid-Struktur **51** der dritten Generation durch. Die Masterarbeiten von *Oleg Grossmann, M. Sc.*, und von *Sarah Breuer, M. Sc.*, wurden von mir betreut. Die Strukturen der Syntheseziele wurden dabei von mir entwickelt.

Synthesen zur Darstellung des unmarkierten SOT-Reagenzes **57** wurden von *Jana Bogena, M. Sc.*, und *Dr. Miriam Wallner* durchgeführt. Synthesestudien zur Herstellung des Alkylierungsreagenzes **68** und zur Schützung und Entschützung von Benzylester **70** wurden von mir in Zusammenarbeit mit *Jana Bogena, M. Sc.*, und *Dr. Miriam Wallner* durchgeführt. Der markierte SOT-Duplex wurde von *Jana Bogena, M. Sc.*, und *Dr. Miriam Wallner* zur Verfügung gestellt. Die unmarkierten IsSOT-(**73**) und IsST (**74**)-Reagenzien wurden von *Jana Bogena, M. Sc.*, synthetisiert.

Die Strukturen der SOT- und IsSOT-Reagenzien wurden von mir entwickelt. Die massenspektrometrische Analyse aller dargestellten Test- und Zielmoleküle sowie Peptid- und Proteinexperimente wurden von mir durchgeführt. Die *SpectraAnalyzer*-Software wurde von mir entwickelt und alle erhaltenen MS-Daten wurden von mir ausgewertet.

6 Ausblick

6.1 Entwicklung von massenspaltbaren und anreicherbaren XL-Reagenzien

Mit dem Design und der Synthese der beiden Reagenzien HSAK (**13**) und HSAKp (**14**) konnten zwei neue, Sulfoxid-basierte Crosslinker hergestellt werden, welche durch das Vorhandensein einer Alkin-Funktionalität das Problem geringer Abundanz von Crosslinks durch Anreicherung potentiell verringern können, dabei aber exzellente Eigenschaften für die MS-Analyse beibehalten.

Um die Crosslinking-Reagenzien routinemäßig zur Aufklärung von Strukturen einzelner Proteine oder kleiner Proteinkomplexe oder auch zur Erfassung von Interaktionsnetzwerken verwenden zu können, muss das Anreicherungsprotokoll deutlich verbessert werden. Hier stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, um die herausfordernde Click-Reaktion in der komplexen Proteinmatrix zu verbessern. So können beispielsweise andere Cu^I-Quellen und Liganden getestet werden oder Picolylazide zum Einsatz kommen, welche die Effizienz der CuAAC deutlich steigern. Sollte sich herausstellen, dass die Click-Reaktion in der komplexen Protein- oder Peptidmatrix nicht zufriedenstellend durchgeführt werden kann, ist es auch möglich, bereits konjugierte XL-Biotin-Reagenzien zu synthetisieren oder unmittelbar vor der Verwendung *in situ* herzustellen.

Durch die Aufklärung der Fragmentierungsverhalten der Crosslinker HSAK und HSAKp ist es weiterhin möglich, MS³-Methoden zur Analyse komplexer Proben zu entwickeln. Die Implementierung auf Massenspektrometern mit Ionenfallen muss hier noch erfolgen. Dazu ist es notwendig, die spezifischen Fragmente unter Ionenfallen-CID-Bedingungen genauer zu untersuchen und deren Intensitäten zu quantifizieren, was durch die Analyse vieler verschiedener quervernetzter Peptide in Kombination mit der softwaregestützten Auswertung der resultierenden MS²-Spektren geschehen kann. So könnten eventuell neue MS³-Methoden entwickelt werden, welche die gespaltenen Peptide im MS²-Scan besser erkennen und so die Dauer des Scanzzyklus reduzieren könnten.

Die Untersuchung komplexer Interaktionsnetzwerke könnte durch die weitere Modifikation der Crosslinker-Struktur in höherer Auflösung ermöglicht werden, wenn das etablierte Grundgerüst durch Vergrößerung der *Spacerlänge* verändert wird. So könnte ein Set an molekularen Linealen geschaffen werden, welche Interaktionen verschieden weit entfernter Proteine besser erfassen könnten.

Weiterentwicklungen der verwendeten Massenspektrometer und der eingesetzten Softwarelösungen werden dazu beitragen, dass XL-MS in den kommenden Jahren zur Aufklärung von immer mehr biologischen Fragestellungen eingesetzt werden kann. Dabei spielt nicht nur die Kopplung der

Ionenmobilitätsspektrometrie eine entscheidende Rolle, welche die Sensitivität von Massenspektrometern zur Analyse wenig abundanter Ionen enorm steigern kann, sondern auch die kontinuierliche Weiterentwicklung der verwendeten Crosslinking-Reagenzien.

6.2 Entwicklung eines neuartigen isobaren Quantifizierungsreagenzes

Durch die Entwicklung der Sulfoxid-basierten SOT-Struktur **57** konnte ein neues isobares Quantifizierungsreagenz entwickelt werden, welches sich in seinem Fragmentierungsverhalten sehr stark von etablierten Reagenzien wie TMT unterscheidet. Dies ist von großer Bedeutung, um weitere Fortschritte in Richtung der verzerrungsfreien Quantifizierung auf dem MS²-Level erreichen zu können. Gerade die Verwendung der komplementären Fragmentionen könnte in der Zukunft sehr interessant werden, wenn sich die MS-basierte Proteomik mehr in Richtung einer gezielten Quantifizierung wichtiger Zielpeptide bzw. -proteine oder der Verwendung von *data-independent acquisition*-Methoden weiterentwickelt.

Für eine routinemäßige Anwendung der Reagenzien ist es jedoch enorm wichtig, eine hohe Reinheit gewährleisten zu können, damit die Markierung der Peptide robust und effizient ist. Durch die Synthese größerer Mengen der hoch polaren Reagenzien könnte es sein, dass eine Aufreinigung der Reagenzien mit Hilfe von Umkristallisation möglich wird, was die Reinheit des Produkts erhöhen könnte. Auch die Verwendung von Umkehrphasen-HPLC könnte in Betracht gezogen werden, wie bei der Aufreinigung des IsSOT-Reagenz **73** gezeigt werden konnte. Bei dieser kommt es zwar zur teilweisen Hydrolyse des NHS-Esters, allerdings könnten mögliche Nebenprodukte effizient abgetrennt werden und zur Markierung der Peptide könnte die erhaltende Mischung aus Aktivester und Hydrolyseprodukt in größeren Mengen verwendet werden.

Des Weiteren ist es zumindest zur proteomweiten relativen Quantifizierung von Proben notwendig, die Peptididentifikationsrate zu erhöhen. Dazu müssen die geläufigen Suchalgorithmen modifiziert werden, um mit den zusätzlich gebildeten, komplementären Fragmentionen und der resultierenden, höheren MS²-Spektralkomplexität umgehen zu können.

Um perfekt geeignete Reagenzien zu schaffen, welche einen Kompromiss zwischen effizienter Bildung der komplementären (Fragment-)Ionen und MS²-Spektralkomplexität bilden, werden weiterhin neue Strukturen durch organische Synthese hergestellt werden müssen. Interessant könnte hier die Modifikation der 2015 veröffentlichten *combinatorial mass tags* sein, welche komplementäre Ionen effizienter bilden als TMT, dabei allerdings die Peptididentifikation nicht negativ beeinflussen. Durch spezifisches Tuning der Fragmentierungseffizienz könnte somit ein Reagenz synthetisiert werden, welches in der Zukunft weitflächig zur verzerrungsfreien MS²-Quantifizierung eingesetzt werden kann.

7 Experimentalteil

7.1 Chemische Materialien und Methoden

Alle feuchtigkeits- oder sauerstoffempfindlichen Reaktionen wurden unter Schlenk-Bedingungen in einer Argonatmosphäre durchgeführt.

7.1.1 Chemikalien und Lösemittel

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *ABCR*, *Acros organics*, *Bachem*, *Fluka*, *Sigma Aldrich* (jetzt *Merck*) und *TCI Europe* bezogen und mit Ausnahme von Pyrrol ohne vorherige Aufreinigung verwendet. Pyrrol wurde vor der Benutzung destilliert und wurde nur verwendet, wenn keine Verfärbung beobachtet wurde.

Trockene Lösungsmittel (Wassergehalt > 50 ppm) wurden von *Acros organics* oder *Sigma-Aldrich (Merck)* bezogen und unter Argonatmosphäre über Molekularsieb aufbewahrt. Für Extraktionen und Säulenchromatographien wurden Lösungsmittel technischer Qualität verwendet, welche vor der Benutzung einmal destilliert wurden.

7.1.2 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde zur qualitativen Reaktions- und Fraktionskontrolle mit den Fertigplatten Kieselgel F254 von *Merck* durchgeführt. Je nach den zu beobachteten Verbindungen wurden folgende Methoden zur Detektion verwendet:

- aromatische und fluoreszente Verbindungen wurden durch Bestrahlung der DC-Platten mit UV-Licht ($\lambda_1=254$ nm, $\lambda_2=366$ nm) sichtbar gemacht.
- Dünnschichtchromatogramme ungesättigter Substanzen wurden für etwa zehn Sekunden in eine Iodkammer gegeben.
- Amine wurden durch Eintauchen der Chromatogramme in eine Ninhydrin-Tauchlösung (0.3 g Ninhydrin, 3 mL AcOH, in 100 mL *n*-Butanol) und anschließendes Erhitzen mit einem Heißluftföhn detektiert.
- für die Detektion von Aziden wurde das Chromatogramm für 20 Sekunden in eine 1 M Lösung von Triphenylphosphin in Dichlormethan getaucht und danach durch einen Heißluftföhn getrocknet. Anschließend wurde das Chromatogramm in eine Ninhydrinlösung (s.o.) getaucht und daraufhin mit einem Heißluftföhn stark erhitzt.
- für unspezifische Verbindungen wurde das Chromatogramm in eine Cer-Ammoniummolybdän-Tauchlösung (5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 20 mL konz. Schwefelsäure, 180 mL Wasser) getaucht und anschließend mit einem Heißluftföhn erhitzt.

Alle verwendeten Tauchlösungen wurden unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Für sehr polare Verbindungen wurde kein R_f -Wert angegeben.

Zur präparativen Aufreinigung der Verbindungen wurde Säulenchromatographie nach der *Flash*-Methode mit Stickstoff durchgeführt. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (Korngröße 0.063–0.200 mm) der Firma *Merck*.

7.1.3 Infrarotspektroskopie (IR)

IR-Spektren wurden an einem *Spectrum BX* FT-IR System von *Perkin Elmer* mit einem *DuraSample IR II* Messkopf von *Smiths* ohne weitere Präparation der Proben aufgenommen. Die Intensität der Signale wurde mit s (stark), m (medium), w (schwach) konkretisiert.

7.1.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Spektren (300, 400 und 600 MHz) sowie 2D-Spektren (COSY, HSQC, HMBC) wurden, soweit nicht spezifiziert, bei Raumtemperatur von der NMR-Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie (Haus F), an einem *Bruker ARX 300*, *Varian Inova 400* und an einem *Bruker ARX 600* oder persönlich an einem *Bruker Ascend 400* gemessen. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zum Lösemittel als internen Standard aufgezeichnet. Die Multiplizitäten der Signale wurden als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Pentett), m (Multipllett) und deren Kombinationen angegeben. Kopplungskonstanten in ^1H -Spektren beziehen sich, falls nicht anders angegeben auf ^1H , ^1H -Kopplungen. Zur Auswertung der NMR-Spektren wurde die Software *MestReNova* von *Mestrelab Research S.L.K* in den aktuellsten Versionen verwendet.

7.1.5 Massenspektrometrie kleiner Moleküle

Hochaufgelöste Massenspektren wurden von der Analytik-Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie (Haus F), oder persönlich aufgenommen, wobei ein *Finnigan LTQ FTICR* (ESI) (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet wurde.

Niederaufgelöste Massenspektren zur Reaktionskontrolle wurden an einem *MSQ Plus* System (ESI) (*Thermo Fisher Scientific*) aufgezeichnet. Bei Bedarf wurde ein *Ultimate 3000*-HPLC-System (*Thermo Fisher Scientific*) zur analytischen Auftrennung der Proben durch eine *Hypersil Gold 3 μm 100x2.1 mm* (*Thermo Fisher Scientific*) Säule verwendet, welche direkt an das *MSQ Plus* System gekoppelt war.

7.1.6 Rotationsverdampfer

Zum Entfernen der Lösemittel *in vacuo* und zum Destillieren der Lösemittel technischer Qualität wurde ein Rotationsverdampfer *Laborta 4000* von *Heidolph* verwendet.

7.1.7 Schmelzpunktmessung

Unkorrigierte Schmelzpunkte wurden an *Büchi Melting Point B-540* Geräten gemessen.

7.2 Materialien und Methoden zur Durchführung der Crosslinking-Experimente

Zur Durchführung von Proteomik-Experimenten wurden stets Lösungsmittel und Reagenzien in HPLC- oder LC-MS-Qualität verwendet, soweit nicht anders spezifiziert. *Albumin Fraction V (pH 7.0) for Western Blotting* von *AppliChemPanreac* wurde für BSA-Crosslinking eingesetzt.

7.2.1 Konzentration von Peptidproben

Die Konzentration von Peptidproben erfolgte an einem *Christ RVC2-25*-Midikonzentrator (*Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH*) bei einer Temperatur von 40 °C.

7.2.2 Reaktion von Crosslinkern mit Arginin

In 15 µL eines Phosphatbuffers (150 mM, pH = 8) wurden 5 µL einer wässrigen Argininlösung (0.0144M, 72 nmol) gegeben. Zu dieser Lösung wurden je nach Experiment zwischen 2 und 10 Äquivalente an Crosslinkerreagenz, gelöst in trockenem MeCN für HSAK sowie HSAKp und in trockenem DMSO für DSSO, gegeben, so dass die Gesamtmenge an organischem Lösungsmittel 20 µL betrug. Nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 1% TFA_(aq) gestoppt und die Reaktionsmischungen wurden durch Stage-Tips mit *Empore SDB-RPS*-Material aufgereinigt.^[159]

7.2.3 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Zur Anreicherung der Crosslinks über Größenausschlusschromatographie wurde ein *ÄKTApurifier*-System (*GE Healthcare*) bei 4 °C und eine *SuperdexTM Peptide 3.2/300*-Säule verwendet. Die Säule wurde über ein Verbindungsstück direkt an den UV-Detektor gekoppelt und Quarzglas-Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 150 µL wurden zur Minimierung von Totvolumina eingesetzt. Als Laufmittel wurde ein PBS-Puffer (50 mM Phosphat, 0.15 M, pH = 7, MilliQ-Wasser(*Sartorius arium pro*)) bei einer Flussrate von 50 µL/min genutzt. Zwischen 40 µg und 90 µg der entsalzten Peptidprobe wurden in 15 µL des PBS-Puffers gelöst, 10 min bei 15 kg zentrifugiert, um eventuell unlösliche Rückstände abzutrennen und der Überstand wurde über einen 20 µL Injektionsloop auf die Säule geladen. Die UV-Absorption bei 215 nm wurde zur Detektion der Peptide verwendet und alle 2 min (100 µL) wurde die gesammelte Fraktion gewechselt.

Fractionen mit angereicherten Crosslinks wurden an einem Midikonzentrator zur Trockene eingengt und anschließend zur MS-Analyse in einem SEC-MS-Solvent (5 % Ameisensäure, 2 % MeCN, H₂O) angelöst.

7.2.4 Optimiertes Crosslinking-Protokoll

100 µg der Proteinprobe wurden in 100 µL HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7.4) gelöst. 5.26 µL einer 20 mM Crosslinker-Lösung in trockenem DMSO wurden für eine Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Lösung wurde zur Durchmischung 1 s gevortext. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden 2.15 µL einer frischen, wässrigen Lösung von NH_4HCO_3 (1 M) zugegeben, um die XL-Reaktion zu stoppen. Die Lösung wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reduktion der Disulfidbrücken erfolgte mit $\text{DTT}_{(\text{aq})}$ in einer Endkonzentration von 5 mM bei 60 °C für 20 min. zur Alkylierung der Sulfide wurde $\text{IAA}_{(\text{aq})}$ in einer Endkonzentration von 20 mM verwendet, die Inkubation erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Zur Aufreinigung der Proteinmischung wurde das vierfache Volumen von eiskaltem Aceton (HPLC-Qualität) zugegeben und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 15 kg für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde entfernt und der Rückstand wurde für 10 Minuten an Luft getrocknet. Zur Resuspension wurden 15 µL Resuspensionspuffer (6M Gua-Cl, 10 mM EPPS, pH = 8.5) zugegeben, gründlich gevortext und für 15 min auf 37 °C erhitzt. Anschließend wurden 185 µL Verdünnungspuffer (10 mM EPPS, pH = 8.5) zugegeben, um eine Gua-Cl-Konzentration von unter 0.5 mM zu erreichen. Der Verdau erfolgte durch Zugabe von 2.5 µg Trypsin-LysC-Mix (in 50 mM $\text{AcOH}_{(\text{aq})}$, *Promega*) bei 37 °C über Nacht. Die resultierende Peptidmischung wurde mit 1 % $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ angesäuert und über *C₁₈-ZipTips* (0.6 µL Harz, *Merck*) aufgereinigt. Unmittelbar vor der MS-Analyse wurden die aufgereinigten Peptide in MS-Solvent (0.1 % Ameisensäure, 2 % MeCN, H₂O) auf eine Konzentration von 1 µg/µL resuspendiert.

7.2.5 Durchführung der CuAAC-Reaktion auf der Proteinebene

Crosslinking-Proben von 100 µg BSA wurden zunächst wie nach dem optimierten Protokoll vorbereitet. Nach Durchführung der ersten Acetonfällung wurden die Proteine in 45 µL Resuspensionspuffer (6M Gua-Cl, 10 mM EPPS, pH = 8.5) aufgenommen, gründlich gevortext und für 15 min auf 37 °C erhitzt. Anschließend wurde die Probe mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7.4) auf 500 µL verdünnt. Die Click-Reaktion erfolgte durch Zugabe folgender Reagenzien: Biotin-Azid auf eine Endkonzentration von 100 µM (100x Stocklösung in DMSO), eine Mischung aus CuSO_4 und THPTA (50 µM bzw. 250 µM Endkonzentration, 100x Stocklösung in Wasser) und Natriumascorbat (2.5 mM Endkonzentration, 100x Stocklösung in Wasser). Die Lösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (650 rpm) und eine erneute Menge an Natriumascorbat wurde zugegeben (2.5 mM Endkonzentration, 100x Stocklösung in Wasser) und die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur fortgesetzt (650 rpm). Danach wurde eine zweite Acetonfällung durchgeführt (vierfaches Volumen Aceton, -20 °C über Nacht). Der Verdau der Proteinmischung erfolgte nach demselben Protokoll wie oben beschrieben.

Zur Anreicherung biotinylierter Peptide aus der resultierenden, entsalzten komplexen Peptidmischung wurden 100 μL magnetische *Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Vorbereitung der Beads, Bindung an die Beads und Waschschritte zur Entfernung der unmodifizierten Peptide erfolgten dabei nach Herstellerangaben. Zur Abspaltung der angereicherten Peptide wurden die gewaschenen Beads in 50 μL Kaliumphosphatbuffer (50 mM, pH = 7.4) resuspendiert und TCEP wurde zugegeben (10 mM Endkonzentration, 500 mM Stocklösung in Wasser). Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Beads wurden mit 50 μL Kaliumphosphatbuffer nachgewaschen und die Waschlösung wurde zum Überstand gegeben. Entstehende Sulfide wurden mit IAA alkyliert (40 mM Endkonzentration, 1 M Stocklösung in Wasser, Inkubation 45 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss). Überschüssiges IAA wurde mit DTT gequencht (20 mM Endkonzentration, 500 mM Stocklösung in Wasser, Inkubation 15 min bei Raumtemperatur). Die erhaltenen Peptide wurden über *C₁₈-ZipTips* (0.6 μL Harz, Merck) aufgereinigt. Unmittelbar vor der MS-Analyse wurden die aufgereinigten Peptide in MS-Solvent (0.1 % Ameisensäure, 2 % MeCN, H₂O) auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ resuspendiert.

7.2.6 nanoLC-MS-Methoden

Zur Analyse der Peptidmischungen wurde ein *Ultimate 3000 RSLCnano-LC-System* (Dionex, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Proben wurden zum Beladen der Säule auf einer μ -Vorsäulenkartusche (*PepMap 100, C₁₈, 5 μm , 100 Å , 300 μm ID x 5 mm, Dionex, Thermo Fisher Scientific) konzentriert. Als analytische Säule kam ein mit C₁₈-Säulenmaterial (*ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 μm , 120 Å , Dr. Maisch GmbH*) selbst bepackter *PicoTip*-Emitter (Quarzglas mit 8 μm Glasspitze, 75 μm ID x 15 cm, *New Objective*) zum Einsatz, an welchen zur Durchführung der ESI über ein T-Stück eine Spannung von 2.2 kV angelegt wurde. Die Säule wurde durch Verwendung eines Säulenofens (*Sonation*) auf 30 °C temperiert.*

Zur Auftrennung der Peptide bei einer Flussrate von 300 nL/min wurden Gradienten mit folgendem Aufbau verwendet, wobei als Lösungsmittel A Wasser + 0.1 % FA und als Lösungsmittel B MeCN + 0.1 % FA verwendet wurde. Angegeben ist der Prozentsatz an Lösungsmittel B:

1 % für 5 min; von 1 % auf 6 % in 1 min; von 6 % auf 28 % in X Minuten; von 28 % auf 85 % in 3 min; 85 % für 3 min; von 85 % auf 1 % in 3 min; 1 % für 7 min.

Je nach Komplexität der Probe wurde die Dauer von X angepasst, um Methodenlängen zwischen 60 min und 120 min zu erreichen.

Zur Analyse der Proben wurde für *psuedo-MS³* und *MS²*-Messungen ein *Q Exactive HF*-Massenspektrometer von *Thermo Fisher Scientific* verwendet.

Für *pseudo*-MS³-Messungen wurde folgende Methode verwendet:

Ein erster Full-Scan zur Detektion der intakten Crosslinks wurde bei einer Auflösung von 60k im Massenbereich zwischen m/z 300 und 2000, einem AGC-Target von 3e6 Ladungen und einer maximalen Injektionszeit von 20 ms durchgeführt. Anschließend erfolgte der *in-source*-Fragmentierungsscan ebenfalls bei einer Auflösung von 60k, im Massenbereich zwischen m/z 300 und 2000, einem AGC-Target von 3e6 Ladungen und einer maximalen Injektionszeit von 25 ms, allerdings bei Anlegen einer *in-source* CID-Energie zwischen 35 eV und 50 eV, je nach Methode. Die zehn in diesem Scan intensivsten Ionen mit einem Ladungszustand zwischen 2 – 6 wurden für MS²-Scans mit folgenden Einstellungen isoliert und fragmentiert: 15k Auflösung, AGC-Target von 2e5 Ladungen, maximaler Injektionszeit von 110 ms, einem Isolationsfenster von 2.0 m/z mit einem Offset von 0.3 m/z und einer normalisierten HCD-Energie von 28 %. Die „*Peptide match*“-Einstellung wurde auf ‚-‘ gestellt und die Ionen aus demselben Isotopenmuster bereits fragmentierter Ionen wurden von der Isolation ausgeschlossen. Nach einmaliger Messung wurden Signale für 20 s von der erneuten Isolation ausgeschlossen.

Für MS²-Messungen wurde folgende optimierte Methode verwendet:

Ein Full-Scan wurde bei einer Auflösung von 120k im Massenbereich zwischen m/z 300 und 1750 mit einem AGC-Target von 3e6 Ladungen und einer maximalen Injektionszeit von 20 ms durchgeführt. Die 15 in diesem Scan intensivsten Ionen mit einem Ladungszustand zwischen 3 – 6 wurden für MS²-Messungen mit folgenden Einstellungen isoliert und fragmentiert: 15k Auflösung, AGC-Target von 2e5 mit einer maximalen Injektionszeit von 125 ms, einem Isolationsfenster von 2.0 m/z und einem Offset von 0.2 m/z bei abgestuften normalisierten HCD-Energien von 25 % und 30 %. Ionen wurden nur zur Isolation ausgewählt, wenn sie eine minimale Intensität von 8e5 erreicht hatten. Die „*Peptide match*“-Einstellung wurde auf ‚-‘ gestellt und die Ionen aus demselben Isotopenmuster bereits fragmentierter Ionen wurden von der Isolation ausgeschlossen. Nach einmaliger Messung wurden Signale für 10 s von der erneuten Isolation ausgeschlossen.

MS³-Messungen DSSO-crossgelinkter Proben wurden an einem *Orbitrap Fusion Lumos*-Massenspektrometer von *Thermo Fisher Scientific* durchgeführt. Dazu wurde folgende Methode verwendet:

Der MS¹-Scan wurde bei einer Auflösung von 120k im Massenbereich zwischen m/z 375 und 1750, einem AGC-Target von 1e6 Ladungen und einer maximalen Injektionszeit von 50 ms bei einem RF-Lens-Level von 25 % durchgeführt. Zur Auslösung für MS²-Scans wurden folgende Parameter gewählt: Ladungszustand zwischen 3 – 8, dynamische Ausschließung bereits selektierter Ionen für 10 s und Ausschluss von Isotopen bereits selektierter Signale, minimale Intensität von 2e4, einer *monoisotopic precursor selection* im „*Peptide*“-Modus und einer kompletten Scanzykusdauer von 3 s. Die MS²-Scans wurden mit folgenden Einstellungen durchgeführt: der Quadrupol wurde zur Selektion verwendet, das

Isolationsfester betrug 1.6 m/z ohne Offset; die Massenauflösung betrug 15k, bei einem AGC-Target von $5e4$ Ladungen, einer maximalen Injektionszeit von 50 ms und einer Fragmentierung mit 25 % CID-Energie.

Für MS^3 -Scans galten folgende Einstellungen: Ladungszustände zwischen 2 – 6 wurden berücksichtigt, Vorläuferionen wurden nicht berücksichtigt. Eine Fragmentierung wurde durchgeführt, wenn eine Delta-Masse von 31.9721 Da identifiziert wurde. Beide Signale des Massepaares wurden daraufhin fragmentiert, wobei maximal 4 MS^3 -Scans pro MS^2 -Scan durchgeführt wurden. Die Aufnahme des MS^3 -Scans geschah nach MS^2 - und MS^3 -Isolation in einem Isolationsfenster von je 2 m/z . Das AGC-Target betrug $5e4$ Ladungen, bei einer maximalen Injektionszeit von 150 ms. Die Fragmentierung wurde mit einer normalisierten HCD-Energie von 25 % durchgeführt und die Auflösung der Ionenfalle zur Erzeugung der MS^3 -Spektren war „Rapid“.

7.2.7 Datenauswertung

Zur Auswertung der Daten wurden stets aktuelle Proteinsequenzen oder organismusweite .FASTA-Dateien der *Universal Protein Database (Uniprot, www.uniprot.org)* verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden Peptididentifikationen und Crosslinkidentifikationen bei einer Falscherkennungsrate von 1 % durchgeführt.

Zur Analyse der *pseudo-MS³*-Daten kam eine modifizierte MaxQuant zum Einsatz, welche von *Dr. Richard Scheltema* zur Verfügung gestellt wurde. Die Crosslinkidentifikation erfolgte hier bei einer Falscherkennungsrate von 5 %.

MS^3 -Daten von DSSO wurden im *xLinkx*-Node der *Proteome Discoverer Software 2.2* von *Thermo Fisher Scientific* analysiert. Dazu wurden folgende Einstellungen verwendet:

XLinkx Detect: $MS_2_MS_3$, DSSO/+158.004 Da (K), Minimum S/N 1.5, Enable Protein-N-Term false

XLinkx Search: Enzyme Name: Trypsin; Maximum missed Cleavages: 2; Precursor Mass Tolerance 10 ppm; FTMS Fragment Tolerance: 20 ppm; ITMS Fragment Tolerance: 0.6 Da; Static Modification: Carbamidomethyl/ +57.021 Da (C); Dynamic Modification: Oxidation/+15.995 Da (M); Minimum Score: 40; Minimum Score Difference: 4.

XLinkx Validator: FDR treshold: 0.01; FDR strategy: Percolator.

MS^2 -Daten des HSAKp-Crosslinkers wurden mit *MeroX* in der Version 1.6.6.5 analysiert.^[101] Die .raw-Dateien wurden zur Analyse mit der *ProteoWizard*-Software in .mgf-Dateien umgewandelt. Als .Fasta-Dateien wurden jeweils die Uniprot-Sequenz-.Fasta-Dateien der jeweiligen Proteine verwendet. Für

Cysteine wurde die statische Carbamidomethylierung (+57.0214 Da) und die dynamische Oxidation von Methioninen (+15.9949 Da) angenommen. Folgende Einstellungen wurden dafür verwendet:

Crosslinker: HSAKp, C12H13NO4S;

Specificity: Site1: K{; Site2: KSTY{;

Dead-end crosslinks (type 0): enabled, H2O;

Modifications of Fragments at Site 1: SO1, C3H4O2S; dehydro1, C3H2OS, essential; alk1, C3H2O, essential;

Modifications of Fragments at Site 2: alk2, C9H9NO2, essential; SO2, C9H11NO3S; dehydro2, C9H9NO2S, essential;

Precursor precision 6 ppm, Fragment ion precision 15 ppm, S/N-ratio 1.5, Ion types: a, b, y; deisotoping;

Prescore: >5 % intensity, Score cut off -1; standard scoring, mixed target-decoys, shuffled sequences but keep protease sites.

Zur Modellierung mit *I-TASSER* wurde das Protokoll von *Orbán-Németh et al.* befolgt.^[91] Folgende reduzierte TET3cd-Sequenz wurde für die Modelling-Studien verwendet:

```
RSEFPTCDCVEQIVEKDEGPYYTHLGSQPTVASIRELMEDRYGEK GKAIRIEKVIYTGKEGKSSRGCPPIAKWVIRRHTE  
EEKLLCLRHRHAGHHCQNAVIVIVIOLETTWEGIPRSLGDTLYQELTDLRKYGNPTSRRCGLNDDRTCACQKDPN  
TCGASFSGCSWSMYFNGCKYARSKTPRKFRITGDNPKKEEVLNRSFQDLATEVAPLYKRLAPQAYQNQVTNEDV  
AIDCRLGLKEGRPFSGVTACMDFCFAHAHKDQHNLNGCTVVCTLTKEGNRCVGPQIPEDEQLHVLPLYKMASTDEF  
GSEENQNAKVSSGAIQVLTAFPVRRRLPEPAKSCRQRQLEARKAAAEEKKLQKEKLSTPEKIKQEALAGVTTDPG  
LSLKGGLSQSLKPSLKVPEQNHFFSKYSGNAVVESYVLGSCRSPDPYSMSSVYSYHSRYAQPGLASVNGFHSKYT  
LPSFGYYGFSSNPVFPVPSQFLGPSAWGHGGSGGSFEKPKDLHALHNSLNPAYGGAFAELPGQAVATDNHHPIPH  
HQQPAYPGPKEYLLPKVQLHPASRDSPFAQSSSCYNRSIKQEPIDPLTQAESIPRDSAKMSRTPLPEASQNGGPS  
HLWGQYSGGSPMSPKRTNSVGGNWGVFPPEGESPTIVPDKLNSFGASCLTPSHFPESQWGLFTGEGQQSAPHAG  
ARLRGKPWSPCKFGNGTSALTGPSLTEKPWGMGTGDFNPALKGGPGFQDKLWNPVKVEEGRIPTPGANPLDKA  
WQAFGMPLSSNEKLFALKSEEKLWDPFSEEGTAEPPSKGVVKEEKSGPTVEEDEELWSDSEHNFLDENIGGV  
AVAPAHCSILIECARRELHATTPLKKNRCHPTRISLVFYQHKNLNQPNHGLALWEAKMKQLAERARQRQEEAARL  
GLGQQEAKLYGKKRKGWGGAMVAEPQHKEKKGAIPTRQALAMPTDSAVTVSSYAYTKVTGPYSRWI
```

Das Alignment der modellierten Strukturen mit der Tet2cd-Struktur (pdb: 4nm6) wurde mit Topmatch (<https://topmatch.services.came.sbg.ac.at/>) durchgeführt.^[160]

Die Berechnung der Crosslink-Distanzen in der BSA-Kristallstruktur (pdb: 4f5s) erfolgte mit der xWalk-Software (<http://www.xwalk.org/>).^[161]

7.3 Materialien und Methoden zur Durchführung der isobaren Quantifizierungsexperimente

7.3.1 Konjugation mit Testpeptiden

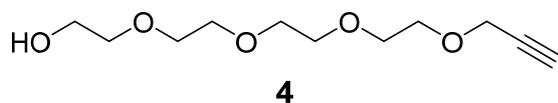
Die Konjugation von TMT⁰ und SOT⁰ mit dem Peptid Ac-IEAKGER erfolgte nach derselben Vorschrift wie die Konjugation von Arginin mit Crosslinkern, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. TMT⁰ wurde dabei in MeCN, SOT⁰ in DMSO angelöst. Es wurden 5 Äquivalente der Reagenzien in Bezug auf das Peptid verwendet. Ac-IEAKGER wurde von der Firma *ProteoGenix* in einer Reinheit von >95 % bezogen.

7.3.2 Konjugation mit komplexen Lysaten, MS-Analyse und Datenauswertung

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in *Stadlmeier et al.* beschrieben.^[128] Der Quellcode der entwickelten *SpectraAnalyzer*-Software ist frei verfügbar und kann auf <https://github.com/Entropy224/NiceSpectraAnalyzer> eingesehen werden.

7.4 Synthese des Dithiopyrrollinkers und von DSSO

7.4.1 3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-ol (4)



Natriumhydrid (60 % in Mineralöl, 1.60 g, 40.0 mmol, 1.6 Äq.) wurde in trockenem 1,4-Dioxan (20 mL) suspendiert und Tetraethylenglykol (19.4 g, 17.3 mL, 100 mmol, 4.0 Äq.) wurde über 5 min bei 0 °C hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung wurde für 20 min gerührt. Propargylbromid (80 % in Toluol, 3.72 g, 2.79 mL, 25.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem 1,4-Dioxan (30 mL) gelöst und die Lösung wurde unter Lichtausschluss über 1 h zur Reaktionsmischung getropft. Nach Rühren der Lösung für 90 min unter Lichtausschluss wurde Wasser (15 mL) hinzugefügt und die Lösung wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in DCM (200 mL) aufgenommen und mit gesättigter NaCl_(aq)-Lösung (3x50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silicagel, DCM:Aceton 9:1) lieferte 3.60 g (15.5 mmol, 62 %) an Alkin **4** in der Form eines gelben Öls.

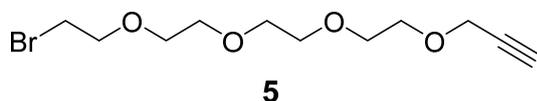
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 2.41 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, HC≡C-), 3.61 – 3.72 (m, 16H, -CH₂-O-CH₂-), 4.17 (d, ⁴J = 2.4 Hz, 2H, HC≡C-CH₂-).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3418 (w), 3252 (w), 2872 (m), 2360 (w), 2341 (w), 1957 (w), 1717 (m), 1644 (w), 1454 (w), 1350 (m), 1327 (w), 1287 (m), 1247 (m), 1183 (m), 1090 (s), 1032 (s), 939 (m), 884 (m), 840 (m), 668 (w).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₁H₂₀O₅Na⁺ ([M+Na]⁺): 255.1203; gefunden: 255.1201 (Δ*m* = 0.78 ppm).

Retentionsfaktor: R_F (DCM:Aceton 9:1) = 0.12.

7.4.2 1-Bromo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in (5)



Zu einer Lösung von Alkohol **4** (2.32 g, 10.0 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (16 mL) wurde CBr₄ (3.67 g, 11 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Nach Kühlen des Reaktionsgemischs auf 0 °C wurde über 2 min PPh₃ (2.89 g, 11.0 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde für 13 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silicagel, *i*-Hexan:AcOEt 4:1 → 1:1). So wurden 2.31 g (7.83 mmol, 78 %) and Bromid **5** in der Form eines farblosen Öls erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 2.42 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, HC≡C-), 3.46 (td, ³J = 6.3 Hz, 0.4 Hz, 2H, Br-CH₂-), 3.64 – 3.72 (m, 12H, -O-CH₂-CH₂-O-), 3.80 (td, ³J = 6.3 Hz, 0.4 Hz, 2H, Br-CH₂-CH₂-), 4.20 (d, ⁴J = 2.4 Hz, 2H, HC≡C-CH₂-).

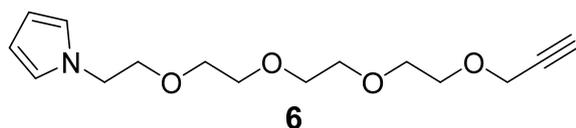
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 30.4 (Br-CH₂-), 58.5 (HC≡C-CH₂-), 69.3 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.6 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.7 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.8 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.8 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.8 (-O-CH₂-CH₂-O-), 71.4 (Br-CH₂-CH₂-), 74.6 (HC≡C-), 79.8 (HC≡C-).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3248 (w), 2865 (m), 2113 (w), 1736 (w), 1460 (w), 1348 (m), 1276 (m), 1246 (w), 1092 (s), 1032 (s), 919 (m), 878 (w), 841 (m), 669 (m), 664 (m).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₁H₁₉NO₄BrNa⁺ ([M+Na]⁺): 317.0359; gefunden: 317.0358 (Δm = 0.32 ppm).

Retentionsfaktor: R_F (*i*-Hexan:AcOEt 1:1) = 0.43.

7.4.3 1-(3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-yl)-1H-pyrrol (6)



Pyrrol (335 mg, 0.346 mL, 5.00 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DMF (95 mL) gelöst und NaH (60 % in Mineralöl, 300 mg, 7.50 mmol, 1.5 Äq.) wurde portionsweise bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 20 min wurde zu der trüben Suspension Bromid **5** (1.77 g, 6.00 mmol, 1.2 Äq.), gelöst in DMF (5 mL), gegeben. Die resultierende klare Lösung wurde für 12 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch *in vacuo* auf die Hälfte des Volumens konzentriert und Wasser (100 mL) wurde zugegeben. Es wurde mit Diethylether (4x100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen (4x20 mL), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silicagel, *i*-Hexan:AcOEt 7:1 → 2:1) lieferte 1.24 g (4.41 mmol, 88 %) des substituierte Pyrrols **6** in der Form eines gelblichen Öls.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 2.42 (d, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, HC≡C-), 3.55 – 3.72 (m, 12H, -O-CH₂-CH₂-O-), 3.74 (t, ³J = 5.7 Hz, 2H, -N-CH₂-CH₂-), 4.05 (t, ³J = 5.7 Hz, 2H, -N-CH₂-CH₂-), 4.20 (m, 2H, HC≡C-CH₂-), 6.13 (s, 2H, -CH=CH-N-), 6.70 (s, 2H, -CH=CH-N-).

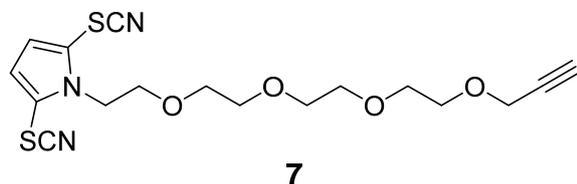
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 49.6 (-N-CH₂-CH₂-), 58.5 (HC≡C-CH₂-), 69.2 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.5 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.7 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.7 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.8 (-O-CH₂-CH₂-O-), 70.8 (-O-CH₂-CH₂-O-), 71.4 (-N-CH₂-CH₂-), 74.6 (HC≡C-), 79.8 (HC≡C-), 108.2 (-CH=CH-N-), 121.1 (-CH-CH-N-).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3254 (w), 2868 (m), 2111 (w), 1499 (m), 1439 (w), 1349 (m), 1286 (m), 1089 (s), 1033 (m), 919 (w), 842 (w), 728 (s), 656 (w).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $C_{15}H_{24}NO_4^+$ ($[M+H]^+$): 282.1700; gefunden: 282.1698 ($\Delta m = 0.71$ ppm);
 berechnet für $C_{15}H_{23}O_4NNa^+$ ($[M+Na]^+$): 304.1519; gefunden: 304.1518 ($\Delta m = 0.33$ ppm);

Retentionsfaktor: R_f (*i*-Hexan:AcOEt 2:1) = 0.19.

7.4.4 1-(3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-yl)-2,5-dithiocyanato-1H-pyrrol (7)



Zu einer Lösung aus Pyrrol **6** (1.24 g, 4.41 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (40 mL) wurden NH_4SCN (1.51 g, 19.9 mmol, 4.5 Äq.) sowie Oxone® ($KHSO_5 \cdot 0.5 KHSO_4 \cdot 0.5 K_2SO_4$, 6.10 g, 19.9 mmol, 4.5 Äq.) zugegeben und die resultierende pinke Suspension wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser (150 mL) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde mit Diethylether (2x150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silicagel, *i*-Hexan:AcOEt 2:1) lieferte 1.18 g (2.99 mmol, 67 %) an Dithiocyanat **7** in Form eines gelblichen Öls.

1H -NMR (599 MHz, $CDCl_3$): δ /ppm = 2.43 (m, 1H, $HC\equiv C-$), 3.52 – 3.71 (m, 12H, $-O-CH_2-CH_2-O-$), 3.78 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, $-N-CH_2-CH_2-$), 4.20 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 2H, $HC\equiv C-CH_2-$), 4.53 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, $-N-CH_2-CH_2-$), 6.76 (s, 2H, $-C_{Ar}H$).

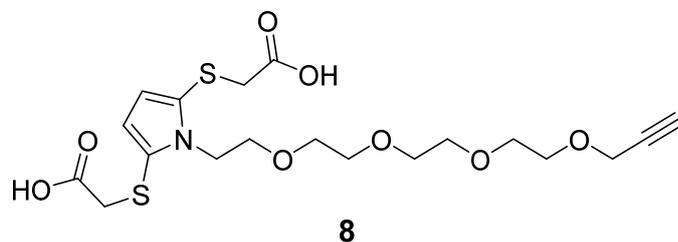
^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ /ppm = 46.2 ($-N-CH_2-CH_2-$), 58.5 ($HC\equiv C-CH_2-$), 69.2 ($-O-CH_2-CH_2-O-$), 69.8 ($-N-CH_2-CH_2-$), 70.5 ($-O-CH_2-CH_2-O-$), 70.6 ($-O-CH_2-CH_2-O-$), 70.6 ($-O-CH_2-CH_2-O-$), 70.7 ($-O-CH_2-CH_2-O-$), 70.9 ($-O-CH_2-CH_2-O-$), 74.7 ($HC\equiv C-$), 79.8 ($HC\equiv C-$), 109.6 ($-SCN$), 114.4 ($-CH-C(SCN)-$), 121.1 ($-CH-C(SCN)-$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/cm^{-1}$ = 3280 (w), 3123 (w), 2868 (m), 2158 (m), 2112 (w), 1731 (w), 1561 (w), 1441 (m), 1389 (m), 1348 (m), 1289 (s), 1247 (m), 1095 (s), 1031 (s), 939 (m), 918 (m), 840 (m), 772 (m), 671 (s).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $C_{17}H_{21}N_3O_4S_2Na^+$ ($[M+Na]^+$): 418.0866; gefunden: 418.0858 ($\Delta m = 1.91$ ppm).

Retentionsfaktor: R_f (*i*-Hexan:AcOEt 1:1) = 0.49.

7.4.5 2,2'-(1-(3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-yl)-1H-pyrrol-2,5-diyl)diessigsäure (**8**)



Dithiocyanat **7** (396 mg, 1.00 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeOH (7 mL) gelöst und 2-Bromessigsäure (334 mg, 2.40 mmol, 2.4 Äq.) wurde hinzugegeben. Die Lösung wurde mit einem Aceton-Trockeneisbad auf $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und eine Lösung von KOH (415 mg, 7.40 mmol, 7.4 Äq.) wurde über 10 min zugegeben, in welcher Zeit sich das Reaktionsgemisch über orange, schwarz und grün verfärbte und sich dann vollständig entfärbte. Nach Entfernen des Kältebads wurde das Reaktionsgemisch für 90 min gerührt und Wasser (20 mL) wurde zugegeben. Die resultierende Suspension wurde mit $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (2M, 4 mL) auf einen pH von etwa 1 eingestellt und die Suspension wurde mit AcOEt (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silicagel, Toluol:AcOEt 3:1 + 2 % AcOH \rightarrow 1:2 + 2 % AcOH) lieferte 0.30 g (0.65 mmol, 65 %) von Disäure **8** in Form eines orangenen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6): δ/ppm = 2.93 (t, 4J = 2.4 Hz, 1H, $\text{HC}\equiv\text{C-}$), 3.53 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3.54 – 3.64 (m, 12H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 3.75 (t, 3J = 5.9 Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 4.17 (d, 4J = 2.4 Hz, 2H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-}$), 4.52 (t, 3J = 5.9 Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 6.42 (s, 2H, $-\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$).

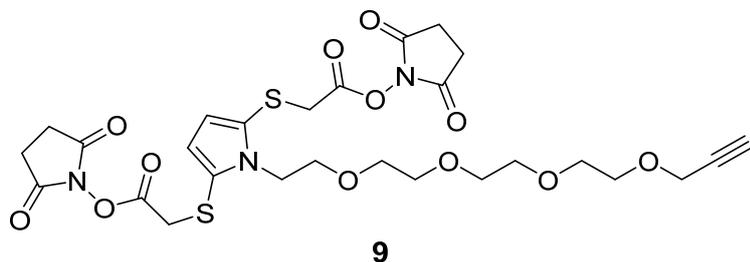
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, Aceton- d_6): δ/ppm = 40.4 ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$), 45.2 ($-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 58.6 ($\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-}$), 69.7 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 70.9 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 71.0 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 71.1 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 71.1 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 71.3 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 71.6 ($-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 75.8 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$), 80.9 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$), 118.8 ($-\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 124.7 ($-\text{N-C-S-}$), 170.9 ($-\text{COOH}$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3267 (w), 2916 (m), 2114 (w), 1720 (s), 1384 (m), 1348 (m), 1288 (s), 1258 (s), 1084 (s), 1027 (s), 884 (m), 797 (s), 768 (s).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NO}_8\text{S}_2\text{Na}^+$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 484.1070; gefunden: 484.1067 (Δm = 0.62 ppm); berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NO}_8\text{S}_2^-$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 460.1105; gefunden: 460.1100 (Δm = 1.09 ppm).

Retentionsfaktor: R_f (Toluol:AcOEt 1:1 + 2 % AcOH) = 0.34.

7.4.6 Bis(*N*-hydroxysuccinimidyl)-2,2'-(1-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-yl)-1H-pyrrol-2,5-diyl)diacetat (9)



Disäure **8** (60 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DCM (6 mL) gelöst und trockenes Pyridin (22 mg, 22 μ L, 0.27 mmol, 2.1 Äq.) sowie NHS-TFA (142 mg, 0.673 mmol, 5.2 Äq.) wurden hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und es wurde DCM (10 mL) zugegeben. Anschließend wurde mit basischem Wasser (pH \approx 8 durch NaOH, 10 mL) und neutralem Wasser (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. So wurden 59 mg (90 μ mol, 69 %) an Di-NHS-Ester **9** in der Form eines farblosen Öls erhalten.

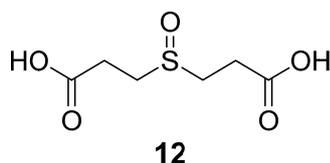
1H -NMR (400 MHz, Aceton- d_6): δ /ppm = 2.87 (s, 8H, NHS-Hs), 2.90 (t, 4J = 2.4 Hz, 1H, $HC\equiv C$ -), 3.48 – 3.63 (m, 12H, -O- CH_2 - CH_2 -O-), 3.76 (t, 3J = 5.4 Hz, 2H, -N- CH_2 - CH_2 -O-), 3.85 (s, 4H, -S- CH_2 -COOSu), 4.16 (dd, 4J = 2.4 Hz, 0.2 Hz, 2H, $HC\equiv C$ - CH_2 -), 4.54 (t, 3J = 5.4 Hz, 2H, -N- CH_2 - CH_2 -O-), 6.63 (s, 2H, - $C_{Ar}H$).

^{13}C -NMR (101 MHz, Aceton- d_6): δ /ppm = 26.3 (- CH_2 -CO-N-O-), 37.0 (-S- CH_2 -COOSu), 45.7 (-N- CH_2 - CH_2 -O-), 58.6 ($HC\equiv C$ - CH_2 -), 69.8 (-O- CH_2 - CH_2 -O-), 71.0 (-O- CH_2 - CH_2 -O-), 71.0 (-O- CH_2 - CH_2 -O-), 71.1 (-O- CH_2 - CH_2 -O-), 71.2 (-O- CH_2 - CH_2 -O-), 71.4 (-O- CH_2 - CH_2 -O-), 72.0 (-N- CH_2 - CH_2 -O-), 75.7 ($HC\equiv C$ -), 81.0 ($HC\equiv C$ -), 120.4 (- $C_{Ar}H$), 123.9 (-CH=CS-N), 166.5 (-COOSu), 170.3 (-CO-N-CO-).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $C_{27}H_{33}N_3O_{12}S_2Na^+$ ($[M+Na]^+$): 678.1398; gefunden: 678.1394 (Δm = 0.59 ppm).

Retentionsfaktor: R_f (AcOEt) = 0.61.

7.4.7 3,3'-Sulfinyldipropionsäure (12)



Zu einer Lösung von 3,3'-Thiodipropionsäure (**11**) (300 mg, 1.68 mmol, 1.0 Äq.) in 40 °C warmem AcOEt (15 mL) wurde *m*CPBA (77 %, 377 mg, 1.68 mmol, 1.0 Äq.) gegeben, wodurch es sofort zur Bildung eines Niederschlags kam. Die Suspension wurde für 15 min bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und der Rückstand wurde mit kaltem AcOEt (2x15 mL) und DCM (15 mL) gewaschen. Nach Trocknen des

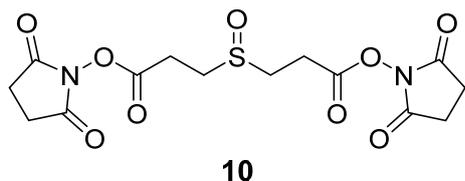
Rückstands *in vacuo* wurden 269 mg (1.39 mmol, 82 %) des Sulfoxids **12** in der Form eines farblosen Pulvers erhalten.

¹H-NMR (599 MHz, CD₃OD): δ /ppm = 2.76 – 2.82 (m, 4H, -SO-CH₂-CH₂-), 2.98 (dt, ^{2,3}J = 13.4 Hz, 6.7 Hz, 2H, m, 4H, -SO-CH₂-CH₂-), 3.17 (dt, ^{2,3}J = 13.4 Hz, 7.7 Hz, 2H, -SO-CH₂-CH₂-).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): δ /ppm = 27.7 (-SO-CH₂-CH₂-), 47.9 (-SO-CH₂-CH₂-), 174.4 (-COOH).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₆H₉O₅S⁻ ([M-H]⁻): 193.0176; gefunden: 193.0176 (Δ m = 0.00 ppm).

7.4.8 Bis(N-hydroxysuccinimidyl)-3,3'-sulfinyldipropionat (**10**)



Zu einer Lösung von Sulfoxid **12** (42 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (1 mL) wurden trockenes Pyridin (38 mg, 38 μ L, 0.48 mmol, 2.2 Äq.) sowie NHS-TFA (100 mg, 0.476 mmol, 2.2 Äq.) zugegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand wurde mit Aceton (3x5 mL) gewaschen. Nach Trocknen des Rückstands *in vacuo* wurde Di-NHS-Ester **10** (78 mg, 0.20 mmol, 93 %) in der Form eines farblosen Pulvers erhalten.

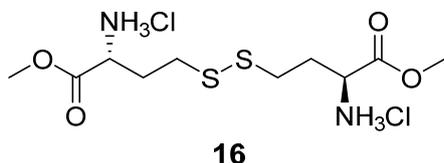
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 2.82 (s, 8H, NHS-Hs), 3.01 – 3.10 (m, 2H, -SO-CH₂-CH₂-), 3.11 – 3.17 (m, 4H, -SO-CH₂-CH₂-), 3.19 – 3.27 (m, 2H, -SO-CH₂-CH₂-).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 23.4 (-SO-CH₂-CH₂-), 25.5 (-CH₂-CO-NO-), 44.6 (-SO-CH₂-CH₂-), 167.7 (-CO-ON-), 170.0 (-CO-NO-).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₄H₂₀N₃O₉S⁺ ([M+NH₄]⁺): 406.0915; gefunden: 406.0915 (Δ m = 0.00 ppm).

7.5 Synthesen von HSAK (**13**) und HSAKp (**14**)

7.5.1 DL-Homocystin bis(methylester) dihydrochlorid (**16**)



Zu einer Lösung von DL-Homocystin (**15**) (2.00 g, 7.45 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Methanol (30 mL) wurde langsam bei 0 °C Thionylchlorid (3.54 g, 29.8 mmol, 4.0 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* lieferte 2.93 g eines gelben Schaumes, welches noch Methanol enthielt, aber ohne zusätzliche

Aufarbeitung weiterverwendet wurde. Quantifizierung *via* $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie zeigte eine quantitative Ausbeute.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta/\text{ppm} = 2.24 - 2.45$ (m, 4H, -S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -), 2.83 - 2.96 (m, 4H, -S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -), 3.87 (s, 6H, - COOCH_3), 4.21 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, -CH-).

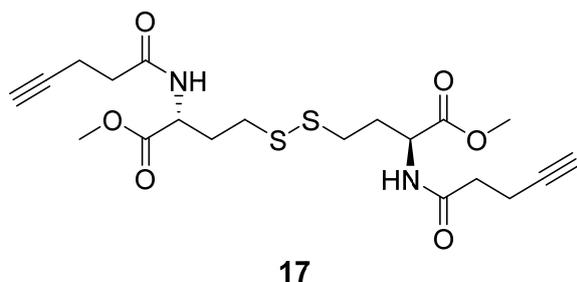
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): $\delta/\text{ppm} = 170.5$ (- COOMe), 53.9 (- COOCH_3), 52.7 (-CH-), 33.7 (-S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -), 31.0 (-S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 2854$ (m), 1988 (w), 1739 (s), 1590 (w), 1504 (m), 1438 (m), 1380 (w), 1286 (m), 1224 (s), 1180 (m), 1139 (m), 1068 (w), 1026 (w), 977 (w), 939 (w), 903 (w), 788 (w), 746 (w), 652 (w), 620 (w).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2^+$ ($[\text{M} - 2 \text{HCl} + \text{H}]^+$): 297.0937; gefunden: 297.0937 ($\Delta m = 0.03$ ppm).

Schmelzpunkt: $T_s = 78 - 82$ °C.

7.5.2 *N,N'*-bis(Pent-4-inoyl) DL-homocystin bis(methylester) (**17**)



Zu einer Lösung von 4-Pentinsäure (174 mg, 1.77 mmol, 2.6 Äq.) in trockenem DMF (5 mL) wurden Triethylamin (416 mg, 570 μL , 4.08 mmol, 6.0 Äq.), 1-HOBT $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (220 mg, 1.63 mmol, 2.4 Äq.), EDC $\cdot\text{HCl}$ (312 mg, 1.63 mmol, 2.4 Äq.) und Dihydrochlorid **16** (250 mg, 677 μmol , 1.0 Äq.) gegeben und die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 15 h gerührt. Wasser (20 mL) wurde hinzugegeben und die Suspension wurde mit $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (2 M) auf einen pH von 2 angesäuert. Die resultierende Lösung wurde mit AcOEt (2x30 mL) extrahiert. Danach wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silicagel, *i*-Hexan:AcOEt 1:2), um 221 mg (480 μmol , 71 %) von **17** in Form eines farblosen Öls zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (599 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 2.03$ (t, $^4J = 2.6$ Hz, 2H, - $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.03 - 2.12 (m, 2H, -S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -), 2.21 - 2.29 (m, 2H, -S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -), 2.43 - 2.60 (m, 8H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{CH}_2$ -), 2.73 (m, 4H, -S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -), 3.76 (s, 3H, -O- CH_3), 3.77 (s, 3H, -O- CH_3), 4.74 (m, 2H, -CH-), 6.49 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, -NH-), 6.49 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, -NH-).

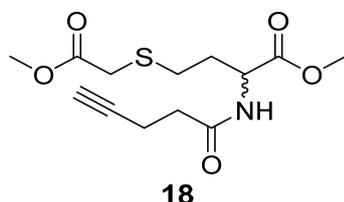
$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 15.0$ ($\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 32.4 (-S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -), 34.7 (-S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -), 35.3 ($\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 51.4 (-CH-), 52.8 (-O- CH_3), 69.7 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$), 82.9 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$), 171.1 (-CONH-), 172.4 (-COMe).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3286$ (w), 2854 (m), 2002 (w), 1742 (s), 1647 (m), 1514 (m), 1437 (m), 1375 (m), 1286 (m), 1220 (s), 1178 (s), 1070 (m), 1025 (w), 982 (m), 942 (w), 905 (w), 797 (w), 750 (m), 634 (m).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $C_{20}H_{29}N_2O_6S_2^+$ ($[M+H]^+$): 457.1462; gefunden: 457.1458 ($\Delta m = 0.87$ ppm).

Retentionsfaktor: R_f (*i*-Hexan:AcOEt 1:2) = 0.27.

7.5.3 Methyl S-(2-methoxy-2-oxoethyl)-N-(pent-4-inoyl)homocysteinat (**18**)



Zu einer Lösung von Disulfid **17** (106 mg, 0.232 mmol, 1.0 Äq.) in einer Mischung von DMF und Wasser (4:1, 4 mL) wurden TCEP·HCl (67 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) and $NaHCO_3$ (82 mg, 0.97 mmol, 4.2 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 135 min bei Raumtemperatur gerührt und es wurde Methyl-2-bromoacetat (71 mg, 44 μ L, 0.46 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wurde Wasser (20 mL) zugegeben und die Mischung wurde mit AcOEt (2x30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silicagel, *i*-Hexan:AcOEt 1:1) lieferte 57 mg (0.19 mmol, 82 %) an **18** in der Form eines farblosen Öls.

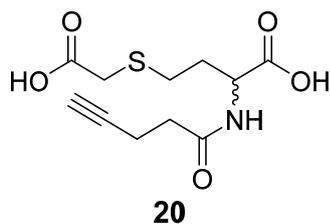
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ /ppm = 1.95 – 2.06 (m, 2H, $-C\equiv CH$, $-S-CH_2-CH_2-$), 2.19 (m, 1H, $-S-CH_2-CH_2-$), 2.43 – 2.57 (m, 4H, $HC\equiv C-CH_2-CH_2-$), 2.67 (m, 2H, $-S-CH_2-CH_2-$), 3.22 (s, 2H, $-S-CH_2-COOMe$), 3.73 (s, 3H, $-O-CH_3$), 3.76 (s, 3H, $-O-CH_3$), 4.73 (td, $^3J = 7.5$ Hz, 5.0 Hz, 1H, $-CH-$), 6.39 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, $-NH-$).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ /ppm = 14.9 ($HC\equiv C-CH_2-CH_2-$), 28.4 ($-S-CH_2-CH_2-$), 31.7 ($-S-CH_2-CH_2-$), 33.3 ($-S-CH_2-COOMe$), 35.3 ($HC\equiv C-CH_2-CH_2-$), 51.5 ($-CH-$), 52.6 ($-O-CH_3$), 52.7 ($-O-CH_3$), 69.6 ($HC\equiv C-$), 82.9 ($HC\equiv C-$), 170.9 ($-COX$), 170.9 ($-COX$), 172.3 ($-COX$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/cm^{-1}$ = 2952 (m), 2854 (m), 2000 (w), 1739 (s), 1649 (w), 1592 (w), 1515 (m), 1437 (m), 1364 (w), 1284 (m), 1222 (s), 1180 (m), 1139 (m), 1069 (m), 981 (w), 941 (w), 903 (w), 862 (w), 841 (w), 789 (w), 746 (w), 635 (m).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $C_{13}H_{20}NO_5S^+$ ($[M+H]^+$): 302.1057; gefunden: 302.1057 ($\Delta m = 0.00$ ppm).

Retentionsfaktor: R_f (*i*-Hexan:AcOEt 1:1) = 0.26.

7.5.4 *S*-(Carboxymethyl)-*N*-(pent-4-inoyl)homocystein (**20**)


Zu einer Lösung von Diester **18** (250 mg, 0.830 mmol, 1.0 Äq.) in einem Gemisch aus THF (4 mL) und Wasser (3 mL) wurden bei 0 °C 99 mg (4.2 mmol, 5.0 Äq.) LiOH gegeben und die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde Wasser (20 mL) zugegeben, die Lösung mit HCl_(aq) (2M) auf einen pH von 1 gebracht und mit AcOEt (5x15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. So wurden ohne weitere Aufreinigung 216 mg (0.790 mmol, 95 %) an Disäure **20** als farbloser Feststoff erhalten.

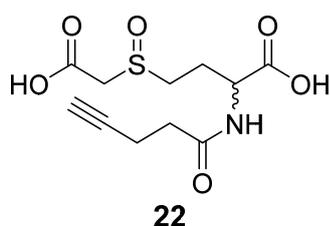
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ/ppm = 1.92 – 2.03 (m, 1H, -S-CH₂-CH₂-), 2.17 (m, 1H, -S-CH₂-CH₂-), 2.25 – 2.29 (m, 1H, -C≡CH), 2.41 – 2.52 (m, 4H, HC≡C-CH₂CH₂-), 2.62 – 2.81 (m, 2H, -S-CH₂-CH₂-), 3.25 (d, ²J = 0.9 Hz, 2H, -S-CH₂-COOH), 4.56 (dd, ³J = 9.3 Hz, 4.5 Hz, 1H, -CH-).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ/ppm = 15.6 (HC≡C-CH₂-CH₂-), 29.7 (-S-CH₂-CH₂-), 32.2 (-S-CH₂-CH₂-), 34.1 (-S-CH₂-COOH), 35.8 (HC≡C-CH₂-CH₂-), 52.6 (-CH-), 70.3 (HC≡C-), 83.5 (HC≡C-), 174.2 (-COX), 174.2 (-COX), 174.9 (-COX).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3392 (w), 2855 (m), 2000 (w), 1742 (s), 1708 (m), 1592 (w), 1505 (m), 1439 (m), 1363 (w), 1286 (m), 1223 (s), 1182 (m), 1143 (m), 1069 (m), 1027 (w), 973 (w), 949 (w), 904 (w), 862 (w), 788 (w), 746 (w), 620 (w).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₁H₁₄NO₅S⁻ ([M-H]⁻): 272.0598; gefunden: 272.0599 (Δ*m* = 0.37 ppm).

Schmelzpunkt: T₅ = 97 – 99 °C.

 7.5.5 *S*-Oxo-*S*-(carboxymethyl)-*N*-(pent-4-inoyl)homocystein (**22**)


Zu einer Lösung von Disäure **20** (84 mg, 0.31 mmol, 1.0 Äq.) in 35 °C warmen AcOEt (2 mL) wurde *m*CPBA (77 %, 69 mg, 0.31 mmol, 1.0 Äq.) gegeben. Die entstehende Suspension wurde für 15 min gerührt, auf 0 °C gekühlt und filtriert. Der Rückstand wurde mit eiskaltem AcOEt (2x3 mL) und DCM (3 mL)

gewaschen und anschließend *in vacuo* getrocknet. Das erhaltene Öl wurde mit MeOH coevaporiert, bis Reste an AcOEt entfernt waren und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. So wurden 63 mg (0.22 mmol, 71 %) an Sulfoxid **22** in der Form eines farblosen Öls erhalten, welches nach Lagerung bei -20 °C zu einem farblosen Feststoff erstarrte. Das isolierte Diastereomerengemisch wurde ohne weitere Auftrennung verwendet.

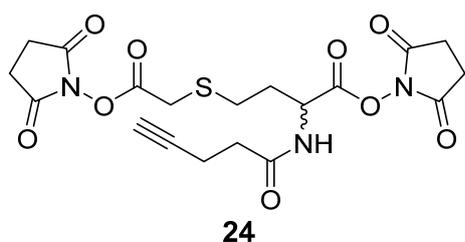
¹H-NMR (599 MHz, CD₃OD): δ /ppm = 2.07 – 2.19 (m, 1H, -S-CH₂-CH₂-), 2.26 – 2.31 (m, 1H, -C≡CH), 2.33 – 2.41 (m, 1H, -S-CH₂-CH₂-), 2.44 – 2.53 (m, 4H, HC≡C-CH₂CH₂-), 2.93 – 3.10 (m, 2H, -S-CH₂-CH₂-), 3.75 (dd, ²J = 14.6 Hz, 5.9 Hz, 1H, -SO-CH₂-COOH), 3.93 (dd, ²J = 14.6 Hz, 4.4 Hz, 1H, -SO-CH₂-COOH), 4.59 (ddd, ³J = 17.0 Hz, 9.1 Hz, 4.8 Hz, 1H, -CH-).

Durch das Diastereomerengemisch wurden im ¹³C-NMR mehrere, sich teilweise überlappende Signale erhalten. Soweit sich die Signale nicht überlagert haben, wurden Signale der beiden Diastereomere angegeben (durch * wurde das Signal des jeweils anderen Diastereomers markiert).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): δ /ppm = 15.6 (HC≡C-CH₂-CH₂-), 15.6* (HC≡C-CH₂-CH₂-), 26.0 (-S-CH₂-CH₂-), 26.0* (-S-CH₂-CH₂-), 35.8 (HC≡C-CH₂-CH₂-), 35.8* (HC≡C-CH₂-CH₂-), 49.6 (-S-CH₂-CH₂-), 49.9* (-S-CH₂-CH₂-), 52.3 (-CH-), 52.7* (-CH-), 56.6 (-S-CH₂-COOH), 56.7* (-S-CH₂-COOH), 70.4 (HC≡C-), 70.5* (HC≡C-), 83.6 (HC≡C-), 83.6* (HC≡C-), 168.2 (-SO-CH₂-COOH), 168.3* (-SO-CH₂-COOH), 173.9 (-COX), 173.9* (-COX), 174.1 (-COX), 174.2* (-COX).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₁H₁₆NO₆S⁺ ([M+H]⁺): 290.0693; gefunden: 290.0693 ($\Delta m = 0.00$ ppm).

7.5.6 Bis-*N*-hydroxydisuccinimidyl-*S*-(carboxymethyl)-*N'*-(pent-4-inoyl)homocysteinat (**24**)



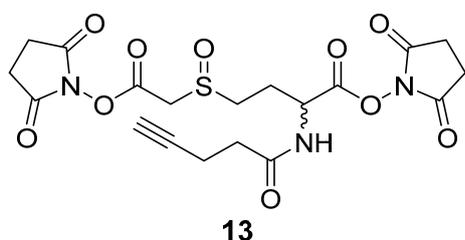
Zu einer Lösung von Disäure **20** (151 mg, 0.553 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (2.5 mL) wurden *N*-Hydroxysuccinimid (316 mg, 2.75 mmol, 5.0 Äq.) und trockenes Pyridin (109 mg, 111 μ L, 1.38 mmol, 2.5 Äq.) gegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und es wurde Trifluoressigsäureanhydrid (521 mg, 345 μ L, 2.48 mmol, 4.5 Äq.) zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung wurde für 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde DCM (20 mL) zugegeben und die Reaktionslösung wurde mit saurem Wasser (2x4 mL, pH \approx 4 durch HCl_(aq)) und basischem Wasser (2x5 mL, pH \approx 8 durch NaOH) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde in DCM (1 mL) gelöst und mit

Aktivkohle (10 mg) versetzt, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. So wurden 190 mg (0.406 mmol, 73 %) von Di-NHS-Ester **24** als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 2.01 (t, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, -C≡CH), 2.19 – 2.37 (m, 2H, -S-CH₂-CH₂-), 2.43 – 2.56 (m, 4H, HC≡C-CH₂CH₂-), 2.80 – 2.92 (m, 10H, -S-CH₂-CH₂-, NHS-Hs), 3.53 (s, 2H, -S-CH₂-CONHS), 5.10 (td, ³J = 7.7 Hz, 5.1 Hz, 1H, -CH-), 6.79 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, -NH-).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₉H₂₂N₃O₉S⁺ ([M+H]⁺): 468.1071; gefunden: 468.1076 (Δ*m* = 1.07 ppm); berechnet für C₁₉H₂₅N₄O₉S⁺ (M+NH₄)⁺: 485.1337; gefunden: 485.1337 (Δ*m* = 0.00 ppm).

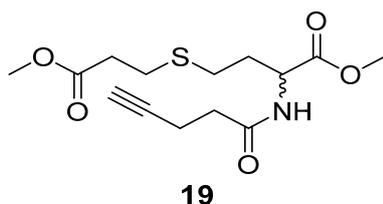
7.5.7 Bis-*N*-hydroxydisuccinimidyl-*S*-oxo-*S*-(carboxymethyl)-*N'*-(pent-4-inoyl)homocysteinat (HSAK, 13)



Zu einer Lösung von Di-NHS-Ester **24** (83 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) in AcoEt (3 mL) wurde bei 0 °C *m*CPBA (77 %, 42 mg, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung wurde für 15 min gerührt, wobei sich eine Suspension bildete. DCM (5 mL) wurde zugegeben und die Lösung wurde mit *i*-Hexan (5 mL) versetzt, wodurch es zur Bildung eines farblosen Niederschlags kam. Nach Filtration wurde der Rückstand mit *i*-Hexan (3 x 8 mL) gewaschen. Der Niederschlag wurde *in vacuo* getrocknet. So wurden 80 mg (0.17 mmol, 93 %) an Crosslinker **13** (HSAK) in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₉H₂₂N₃O₁₀S⁺ ([M+H]⁺): 484.1020; gefunden: 484.1023 (Δ*m* = 0.62 ppm); berechnet für C₁₉H₂₅N₄O₁₀S⁺ ([M+NH₄)⁺): 501.1286; gefunden: 501.1286 (Δ*m* = 0.00 ppm).

7.5.8 Methyl *S*-(3-methoxy-3-oxopropyl)-*N*-(pent-4-inoyl)homocysteinat (19)



Zu einer Lösung von Disulfid **17** (1.50 g, 3.29 mmol, 1.0 Äq.) in einer Mischung von DMF und Wasser (4:1, 25 mL) wurden TCEP·HCl (940 mg, 3.29 mmol, 1.0 Äq.) and NaHCO₃ (1.16 g, 13.8 mmol, 4.2 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und es wurden

TCEP·HCl (284 mg, 0.991 mmol, 0.3 Äq.) und Methyl-3-bromopropionat (1.37 g, 895 μ L, 8.21 mmol, 2.5 Äq.) zugegeben. Nach Rühren bei 45 °C für 44 h wurde Wasser (100 mL) zugegeben und die Mischung wurde mit AcOEt (2x100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silicagel, *i*-Hexan:AcOEt 3:1→1:1) lieferte 1.13 g (3.61 mmol, 55 %) an **19** in der Form eines farblosen Öls.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 1.93 – 2.01 (m, 1H, -CH-CH₂-), 2.02 (t, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, HC≡C-), 2.17 (m, 1H, -CH-CH₂-), 2.40 – 2.62 (m, 8H, HC≡C-CH₂CH₂-, -S-CH₂-CH₂-COOMe, -CH-CH₂-CH₂-S-), 2.76 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, -S-CH₂-CH₂-COOMe), 3.69 (s, 3H, -OCH₃), 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 4.72 (td, ³J = 7.5 Hz, 4.9 Hz, 1H, -CH-), 6.36 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, -NH-).

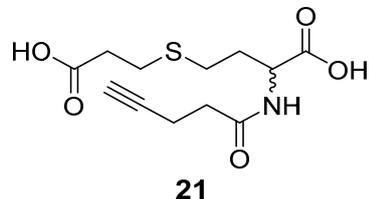
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 14.9 (HC≡C-CH₂-CH₂-), 27.0 (-S-CH₂-CH₂-COOMe), 28.0 (HC≡C-CH₂-CH₂-), 32.3 (-CH-CH₂-), 34.7 (-S-CH₂-CH₂-COOMe), 35.3 (-CH-CH₂-CH₂-S-), 51.7 (-CH-), 52.0, (-OCH₃), 52.7 (-OCH₃), 69.6 (HC≡C-), 82.9 (HC≡C-), 170.9 (-CH-COOMe), 172.4 (-COX), 172.5 (-COX).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3288 (w), 2953 (w), 1737 (s), 1655 (m), 1537 (s), 1437 (m), 1361 (m), 1215 (m).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₄H₂₂NO₅S⁺ ([M+H]⁺): 316.1213; gefunden: 316.1216 (Δ m = 0.95 ppm).

Retentionsfaktor: R_F (*i*-Hexan:AcOEt 1:1) = 0.36.

7.5.9 S-(2-Carboxyethyl)-N-(pent-4-inoyl)homocysteine (**21**)



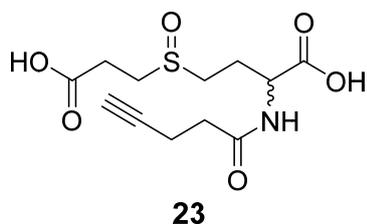
Zu einer Lösung von Diester **19** (156 mg, 0.495 mmol, 1.0 Äq.) in einem Gemisch aus THF (3 mL) und Wasser (3 mL) wurden bei 0 °C 60 mg (2.5 mmol, 5.0 Äq.) LiOH gegeben und die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde Wasser (15 mL) zugegeben, die Lösung mit HCl_(aq) (2M) auf einen pH von 1 gebracht und mit AcOEt (5x15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. So wurden ohne weitere Aufreinigung 128 mg (0.445 mmol, 91 %) an Disäure **21** als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ /ppm = 1.89 – 2.03 (m, 1H, -CH-CH₂-), 2.13 (m, 1H, -CH-CH₂-), 2.25 – 2.28 (m, 1H, HC≡C-), 2.43 – 2.51 (m, 4H, HC≡C-CH₂CH₂-), 2.54 – 2.70 (m, 4H, -CH-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-COOH), 2.76 (m, 2H, -S-CH₂-CH₂-COOH), 4.53 (m, 1H, -CH-).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ/ppm = 14.2 ($\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 26.4 ($\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 27.7 ($-\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 31.6 ($-\text{CH-CH}_2\text{-}$), 34.4 ($-\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 34.5 ($\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 51.7 ($-\text{CH-}$), 68.9 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$), 82.2 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$), 172.7 ($-\text{COX}$), 174.2 ($-\text{COX}$), 174.5 ($-\text{COX}$).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_5\text{S}^-$ ($[\text{M-H}]^-$): 286.0755; gefunden: 286.0756 ($\Delta m = 0.36$ ppm).

7.5.10 *S*-Oxo-*S*-(carboxyethyl)-*N*-(pent-4-inoyl)homocystein (23)

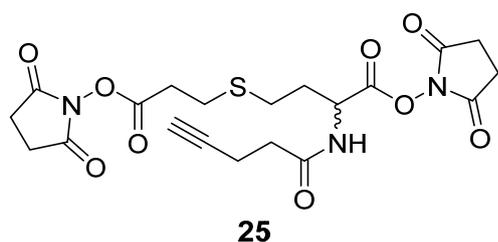


Zu einer Lösung von Disäure **21** (81 mg, 0.28 mmol, 1.0 Äq.) in AcOEt (5 mL) wurde *m*CPBA (77 %, 63 mg, 0.28 mmol, 1.0 Äq.) gegeben. Die entstehende Suspension wurde für 60 min gerührt, auf 0 °C gekühlt und filtriert. Der Rückstand wurde mit eiskaltem AcOEt (2x8 mL) und DCM (5 mL) gewaschen und anschließend *in vacuo* getrocknet. So wurden 71 mg (0.23 mmol, 82 %) an Sulfoxid **23** in der Form von farblosen Kristallen erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ/ppm = 2.09 – 2.22 (m, 1H, $-\text{CH-CH}_2\text{-}$), 2.30 – 2.43 (m, 2H, $-\text{CH-CH}_2\text{-}$, $\text{HC}\equiv\text{C-}$), 2.49 (m, 4H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 2.84 (t, $^3J = 7.0$, 2H, $-\text{SO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 2.89 – 3.25 (m, 4H, $-\text{SO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, $-\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO-}$), 4.57 (m, 1H, $-\text{CH-}$).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_6\text{S}^+$ ($[\text{M+H}]^+$): 304.0849; gefunden: 304.0851 ($\Delta m = 0.33$ ppm).

7.5.11 *Bis-N*-hydroxydisuccinimidyl-*S*-(2-Carboxyethyl)-*N'*-(pent-4-inoyl)homocysteinat (25)



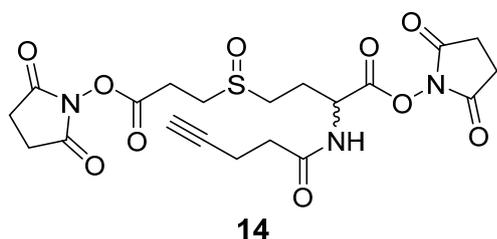
Zu einer Lösung von Disäure **21** (122 mg, 0.425 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem MeCN (4.5 mL) wurden trockenes Pyridin (71 mg, 72 μL , 0.89 mmol, 2.1 Äq.) sowie NHS-TFA (359 mg, 1.70 mmol, 4.0 Äq.) gegeben und die Reaktionslösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in CHCl_3 (30 mL) aufgenommen und mit basischem Wasser (1x30 mL, $\text{pH} \approx 9$ durch NaOH) und saurem Wasser (2x15 mL, $\text{pH} \approx 3$ durch $\text{HCl}_{(\text{aq})}$) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel

wurde *in vacuo* entfernt. So wurden 170 mg (0.353 mmol, 83 %) von Di-NHS-Ester **25** als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 2.04 (t, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, HC≡C-), 2.15 – 2.32 (m, 2H, -CH-CH₂-), 2.43 – 2.59 (m, 4H, HC≡C-CH₂CH₂-), 2.75 (m, 2H, -S-CH₂-CH₂-CH), 2.85 (s, 8H, NHS-Hs), 2.88 – 2.99 (m, 4H, -S-CH₂-CH₂-CONHS), 5.16 (m, 1H, -CH-), 6.55 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, -NH-).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₂₀H₂₄N₃O₉S⁺ ([M+H]⁺): 482.1228; gefunden: 482.1233 (Δ*m* = 1.04 ppm); berechnet für C₂₀H₂₇N₄O₉S⁺ ([M+NH₄]⁺): 499.1493; gefunden: 499.1496 (Δ*m* = 0.60 ppm).

7.5.12 Bis-*N*-hydroxydisuccinimidyl-*S*-oxo-*S*-(carboxyethyl)-*N'*-(pent-4-inoyl)homocysteinat (HSAKp, **14**)



Zu einer Lösung von Di-NHS-Ester **25** (169 mg, 0.351 mmol, 1.0 Äq.) in AcOEt (2 mL) wurde *m*CPBA (77 %, 79 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.) gegeben. Die entstehende Suspension wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt, DCM (4 mL) wurde zugegeben und die Lösung wurde mit *i*-Hexan (8 mL) versetzt, wodurch es zur Bildung eines farblosen Niederschlags kam. Nach Filtration wurde das Filtrat erneut mit weiterem *i*-Hexan (5 mL) versetzt und es wurde filtriert. Die kombinierten Niederschläge wurden mit DCM (5 mL), eiskaltem AcOEt (10 mL) und eiskaltem Aceton (5 mL) gewaschen und *in vacuo* getrocknet. So wurden 99 mg (0.2 mmol, 57 %) an Crosslinker **14** (HSAKp) in Form eines farblosen Schaums erhalten. Das isolierte Diastereomeregemisch wurde ohne weitere Auftrennung für die MS-Experimente verwendet.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 2.04 (m, 1H, HC≡C-), 2.37 – 2.60 (m, 6H, -CH-CH₂-CH₂-SO-, HC≡C-CH₂CH₂-), 2.86 (s, 8H, NHS-Hs), 2.91 – 3.28 (m, 6H, -SO-CH₂-CH₂-CONHS, -CH-CH₂-CH₂-SO-), 5.07 – 5.23 (m, 1H, -CH-), 7.02 (d, ³J = 7.6 Hz, 0.5H, -NH-), 7.30 (d, ³J = 7.9 Hz, 0.5H, -NH-).

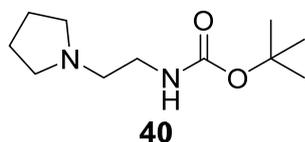
Durch das Diastereomeregemisch wurden im ¹³C-NMR mehrere, sich teilweise überlappende Signale erhalten. Soweit sich die Signale nicht überlagert haben, wurden Signale der beiden Diastereomere angegeben (durch * wurde das Signal des jeweils anderen Diastereomers markiert).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 14.6 (HC≡C-CH₂CH₂-), 14.7* (HC≡C-CH₂CH₂-), 23.5 (-CH₂-), 24.1* (-CH₂-), 25.6 (NHS-CH₂-), 25.8 (-CH₂-), 26.4 (-CH₂-), 34.8 (-CH₂-), 34.9* (-CH₂-), 45.5 (-CH₂-), 45.6* (-CH₂-), 49.3 (-CH-), 49.4* (-CH-), 69.5 (HC≡C-), 69.7* (HC≡C-), 82.7 (HC≡C-), 82.8* (HC≡C-), 167.0 (-CONHS), 167.0* (-CONHS), 167.1 (-CONHS), 168.8 (-CO-N-CO-), 171.1 (-CONH-), 171.2* (-CONH-).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $C_{20}H_{24}N_3O_{10}S^+$ ($[M+H]^+$): 498.1177; gefunden: 498.1188 ($\Delta m = 2.21$ ppm); berechnet für $C_{20}H_{27}N_4O_{10}S^+$ ($[M+NH_4]^+$): 515.1442; gefunden: 515.1453 ($\Delta m = 2.14$ ppm).

7.6 Synthesen zur Entwicklung isobarer Quantifizierungsreagenzien

7.6.1 *tert*-Butyl (2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)carbamate (**40**)



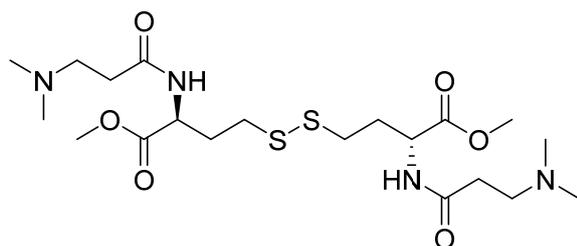
Boc₂O (1.80 g, 8.25 mmol, 1.1 Äq.) wurde in trockenem THF (7 mL) gelöst und die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. *N*-(2-Aminoethyl)pyrrolidin (**38**) (0.86 g, 0.95 mL, 7.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde innerhalb von 15 min zugetropft und das Eisbad wurde entfernt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (12 mL) aufgenommen und mit gesättigter NaHCO_{3(aq)} (15 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (10 mL) reextrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. So wurden ohne weitere Aufreinigung 1.54 g (7.17 mmol, 96 %) des Pyrrolidinderivats **40** in der Form eines farblosen Öls erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃-C-), 1.76 (td, $J = 6.7$ Hz, 3.0 Hz, 4H, Pyrrolidin-Hs), 2.50 (ddt, $J = 5.4$ Hz, 4.1 Hz, 1.4 Hz, 4H, Pyrrolidin-Hs), 2.56 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, -N-CH₂-CH₂-NH-), 3.23 (q, $^3J = 5.9$ Hz, 2H, -N-CH₂-CH₂-NH-), 5.05 (s, 1H, -NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 23.6 (Pyrrolidin-Cs), 28.6 (-C-(CH₃)₃), 39.4 (-N-CH₂-CH₂-NH-), 54.1 (Pyrrolidin-Cs), 55.4 (-N-CH₂-CH₂-NH-), 79.2 (-CO-O-C-(CH₃)₃), 156.2 (-COOtBu).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3353 (w), 3222 (w), 2969 (m), 2933 (m), 2878 (w), 2796 (m), 2363 (w), 1695 (s), 1518 (m), 1499 (m), 1456 (m), 1390 (m), 1364 (s), 1271 (s), 1248 (s), 1168 (s), 1052 (m), 1001 (w), 969 (m), 958 (m), 864 (m), 779 (m), 759 (m), 736 (m).

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $C_{11}H_{23}O_2N_2^+$ ($[M+H]^+$): 215.1754; gefunden: 215.1753 ($\Delta m = 0.46$ ppm).

7.6.2 *N,N'*-bis(3-(dimethylamino)propanoyl) DL-homocystin bis(methylester) (**58**)**58**

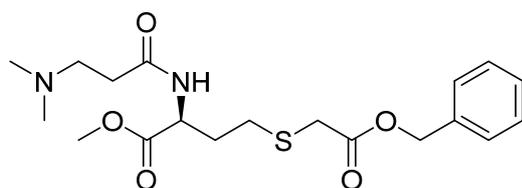
Dimethylester **16** (2.00 g, 5.42 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DMF (40 mL) gelöst und *N,N*-Dimethyl-betaalanin Hydrochlorid (1.83 g, 11.9 mmol, 2.2 Äq.), Triethylamin (1.92 g, 2.63 mL, 19.0 mmol, 3.5 Äq.), HOBT-Monohydrat (1.83 g, 11.9 mmol, 2.2 Äq.) sowie EDC·HCl (2.29 g, 11.9 mmol, 2.2 Äq) wurden hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 255 min gerührt, mit Wasser (50 mL) verdünnt und mit DCM (6xNa50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silicagel, DCM:MeOH 20:1 + 0.5 % NH₃ (7N in MeOH) → DCM:MeOH 17:1 + 0.5 % (7N in MeOH)) lieferte Disulfid **58** (1.66 g, 3.36 mmol, 62 %) in der Form eines gelblichen Feststoffs.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 2.00 – 2.08 (m, 2H, -CH-CH₂-CH₂-S-), 2.24 (m, 2H, -CH-CH₂-CH₂-S-), 2.30 (s, 12H, -N(CH₃)₂), 2.36 – 2.41 (m, 4H, Me₂N-CH₂-CH₂-), 2.53 – 2.63 (m, 4H, Me₂N-CH₂-CH₂-), 2.66 – 2.71 (m, 4H, -CH-CH₂-CH₂-S-), 3.73 (d, *J* = 1.6 Hz, 6H, -COOCH₃), 4.68 (tdd, *J* = 7.8, 5.0 Hz, 2.0 Hz, 2H, -CH-), 9.08 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 2H, -NH-).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 32.4 (-CH-CH₂-CH₂-S-), 32.9 (Me₂N-CH₂-CH₂-), 34.9 (-CH-CH₂-CH₂-S-), 35.0 (-CH-CH₂-CH₂-S-), 44.6 ((CH₃)₂N-), 51.1 (-CH-), 52.5 (-COOCH₃), 55.1 (Me₂N-CH₂-CH₂-), 172.5 (-COOMe), 172.6 (-CONH-).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3286 (w), 3042 (w), 2950 (m), 2862 (w), 2821 (m), 2778 (m), 1744 (s), 1650 (s), 1543 (s), 1462 (m), 1439 (m), 1373 (m), 1300 (m), 1266 (m), 1216 (s), 1171 (m), 1119 (w), 1099 (w), 1043 (w), 1024 (w), 988 (w), 938 (w), 899 (w), 859 (w), 783 (w), 725 (w), 684 (w).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₂₀H₃₉O₆N₄S₂⁺ ([M+H]⁺): 495.2306; gefunden: 495.2303 (Δ*m* = 0.61 ppm).

7.6.3 Methyl *S*-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-*N*-(3-(dimethylamino)propanoyl)-L-homocysteinat (**70**)**70**

Disulfid **58** (0.30 g, 0.61 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einer entgasten Mischung von 1,4-Dioxan und Wasser (4:1, 3 mL) gelöst und Natriumhydrogencarbonat (359 mg, 4.27 mmol, 7.0 Äq.), Benzyl-2-bromoacetat (699 mg, 3.05 mmol, 5.0 Äq.) sowie TCEP·HCl (210 mg, 0.732 mmol, 1.2 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 75 min bei Raumtemperatur gerührt. Wasser (10 mL) wurde zugegeben und die Suspension wurde mit AcOEt (5x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silicagel, DCM:MeOH 20:1 + 0.5 % NH₄OH (28 % in Wasser)) lieferte Benzylester **70** (90 mg, 0.23 mmol, 36 %) in der Form eines farblosen Öls.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 1.97 (m, 1H, -CH-CH₂-), 2.14 (m, 1H, -CH-CH₂-), 2.29 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.37 (m, 2H, Me₂N-CH₂-CH₂-), 2.50 – 2.68 (m, 4H, -S-CH₂-CH₂-, Me₂N-CH₂-CH₂-), 3.25 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, -S-CH₂-COOBn), 3.71 (s, 3H, -COOMe), 4.69 (td, ³*J* = 7.6 Hz, 5.1 Hz, 1H, -CH-), 5.15 (s, 2H, -COO-CH₂-Ph), 7.29 – 7.39 (m, 5H, -C_{Ar}H), 9.05 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, -NH-).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 28.5 (-CH-CH₂-CH₂-), 31.8 (-CH-CH₂-CH₂-), 32.8 (Me₂N-CH₂-CH₂-), 33.5 (-S-CH₂-COOBn), 44.6 (-N(CH₃)₂), 51.0 (-CH-), 52.5 (-COOCH₃), 55.1 (Me₂N-CH₂-CH₂-), 67.2 (-COO-CH₂-Ph), 128.4 (-C_{Ar}), 128.5 (-C_{Ar}), 128.7 (-C_{Ar}), 135.6 (-C_{Ar}), 170.1 (-COOBn), 172.5 (-COX), 172.6 (-COX).
 IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3286 (w), 3032 (w), 2951 (m), 2865 (w), 2822 (w), 2778 (w), 2363 (w), 2337 (w), 1737 (s), 1656 (s), 1540 (m), 1499 (w), 1456 (m), 1441 (m), 1375 (m), 1335 (w), 1272 (s), 1214 (s), 1171 (m), 1146 (m), 1132 (m), 1058 (w), 1043 (w), 1025 (w), 988 (m), 940 (w), 858 (w), 824 (w), 782 (w), 748 (m), 699 (m).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₉H₂₉O₅N₂S⁺ ([M+H]⁺): 397.1792; gefunden: 397.1791 (Δ*m* = 0.30 ppm).

8 Literaturverzeichnis

- [1] D. R. Zerbino, P. Achuthan, W. Akanni, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D754-D761.
- [2] I. Ezkurdia, D. Juan, J. M. Rodriguez, *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 5866-5878.
- [3] G. R. Wyatt, *Nature* **1950**, *166*, 237-238.
- [4] G. R. Wyatt, S. S. Cohen, *Nature* **1952**, *170*, 1072-1073.
- [5] M. Münzel, D. Globisch, T. Brückl, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *122*, 5503-5505.
- [6] T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7008-7012.
- [7] Y. F. He, B. Z. Li, Z. Li, *et al.*, *Science* **2011**, *333*, 1303-1307.
- [8] N. Savage, *Nature* **2015**, *527*, S6-7.
- [9] M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, *et al.*, *Biotechnology (N Y)* **1996**, *14*, 61-65.
- [10] T. Ly, A. Whigham, R. Clarke, *et al.*, *Elife* **2017**, *6*, e27574.
- [11] A. A. Cohen, N. Geva-Zatorsky, E. Eden, *et al.*, *Science* **2008**, *322*, 1511-1516.
- [12] S. R. Nagarajan, A. E. Brandon, J. A. McKenna, *et al.*, *PLoS One* **2017**, *12*, e0174431.
- [13] W. Zhou, L. A. Liotta, E. F. Petricoin, *Cancer Genom. Proteom.* **2012**, *9*, 373-381.
- [14] M. S. Robles, S. J. Humphrey, M. Mann, *Cell Metab.* **2017**, *25*, 118-127.
- [15] J. P. Lambert, M. Tucholska, C. Go, *et al.*, *J. Proteomics* **2015**, *118*, 81-94.
- [16] J. Solassol, W. Jacot, L. Lhermitte, *et al.*, *Expert Rev. Proteomic.* **2006**, *3*, 311-320.
- [17] M. C. Gast, J. H. Schellens, J. H. Beijnen, *Breast Cancer Res. Tr.* **2009**, *116*, 17-29.
- [18] C. H. Lee, E. J. Im, P. G. Moon, *et al.*, *BMC Cancer* **2018**, *18*, 1058.
- [19] M. Plebani, M. Pittoni, M. Celadin, *et al.*, *Autoimmun. Rev.* **2009**, *8*, 238-243.
- [20] I. J. Martins, *Proteomes* **2016**, *4*.
- [21] A. Venkatesh, C. Gil, M. Fuentes, *et al.*, *Proteomic. Clin. Appl.* **2018**, *12*, e1700139.
- [22] T. M. Greco, I. M. Cristea, *Mol. Cell. Proteomics* **2017**, *16*, S5-S14.
- [23] K. L. Oxford, J. P. Wendler, J. E. McDermott, *et al.*, *Expert Rev. Proteomic.* **2016**, *13*, 579-591.
- [24] T. T. Duarte, C. T. Spencer, *Proteomes* **2016**, *4*, 29.
- [25] G. Giudice, E. Petsalaki, *Brief. Bioinform.* **2017**.
- [26] K. K. Jain, in *Adv. Protein Chem. Struct. Biol., Vol. 102* (Ed.: R. Donev), Academic Press, **2016**, pp. 41-52.
- [27] P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007-4021.
- [28] H. J. Chial, H. B. Thompson, A. G. Splittgerber, *Anal. Biochem.* **1993**, *209*, 258-266.
- [29] C. Lelong, M. Chevallet, S. Luche, *et al.*, *Methods Mol. Biol., Vol. 519*, Humana Press, **2009**.
- [30] J. J. Thomson, *Lond. Edinb. Dubl. Phil. Mag.* **2009**, *24*, 209-253.
- [31] R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, *Science* **1976**, *191*, 920-925.
- [32] M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem. US* **1984**, *88*, 4451-4459.
- [33] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **2002**, *57*, 2935-2939.
- [34] G. Taylor, *Proc. R. Soc. Lon. Ser. A* **1964**, *280*, 383-397.
- [35] J. V. Iribarne, *J Chem Phys* **1976**, *64*, 2287-2294.
- [36] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, *et al.*, *J Chem Phys* **1968**, *49*, 2240-2249.
- [37] D. C. Gale, R. D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 1017-1021.
- [38] M. S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167-180.
- [39] M. Glückmann, M. Karas, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 467-477.
- [40] M. Karas, R. Kruger, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 427-440.
- [41] J. Kast, C. E. Parker, K. van der Drift, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1825-1834.
- [42] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153.
- [43] P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, B. Spengler, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1999**, *10*, 91-103.
- [44] J. Mohr, R. Swart, M. Samonig, *et al.*, *Proteomics* **2010**, *10*, 3598-3609.
- [45] G. Chowdhury, F. P. Guengerich, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2011**, *Chapter 7*, Unit 7 16 11-11.
- [46] S. Shah, S. H. Friedman, *Nat. Prot.* **2008**, *3*, 351-356.
- [47] A. Marie, F. Fournier, J. C. Tabet, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5106-5114.

- [48] S. D. Fuerstenau, W. H. Benner, J. J. Thomas, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 541-544.
- [49] M. M. Wolff, W. E. Stephens, *Rev. Sci. Instrum.* **1953**, *24*, 616-617.
- [50] B. A. Mamyurin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, *et al.*, *J. Exp. Theor. Phys.* **1973**, *37*, 45.
- [51] S. Beck, A. Michalski, O. Raether, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14*, 2014-2029.
- [52] D. J. Douglas, A. J. Frank, D. Mao, *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 1-29.
- [53] W. Paul, H. Steinwedel, in *Z. Naturforsch., Vol. 8*, **1953**, p. 448.
- [54] J. C. Schwartz, M. W. Senko, J. E. Syka, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2002**, *13*, 659-669.
- [55] M. B. Comisarow, A. G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282-283.
- [56] A. Makarov, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1156-1162.
- [57] A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, *et al.*, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2113-2120.
- [58] C. K. Frese, A. F. Altelaar, M. L. Hennrich, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 2377-2388.
- [59] Y. H. Yang, K. Lee, K. S. Jang, *et al.*, *Anal. Biochem.* **2009**, *387*, 133-135.
- [60] C. Cunningham, Jr., G. L. Glish, D. J. Burinsky, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2006**, *17*, 81-84.
- [61] J. V. Olsen, B. Macek, O. Lange, *et al.*, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 709-712.
- [62] J. E. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9528-9533.
- [63] A. Chi, C. Huttenhower, L. Y. Geer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2193-2198.
- [64] R. A. Scheltema, J. P. Hauschild, O. Lange, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 3698-3708.
- [65] M. J. Levy, M. P. Washburn, L. Florens, *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 3586-3592.
- [66] Y. Mao, S. G. Valeja, J. C. Rouse, *et al.*, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4239-4246.
- [67] L. Fornelli, K. Szrentic, R. Huguet, *et al.*, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 8421-8429.
- [68] M. Ehrlich, M. J. Gattner, B. Viverge, *et al.*, *Chemistry* **2015**, *21*, 7701-7704.
- [69] M. Schirm, I. C. Schoenhofen, S. M. Logan, *et al.*, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7774-7782.
- [70] D. L. Swaney, C. D. Wenger, J. J. Coon, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 1323-1329.
- [71] R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Biemann, *et al.*, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2621-2625.
- [72] K. W. Lau, S. R. Hart, J. A. Lynch, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1508-1514.
- [73] J. K. Eng, A. L. McCormack, J. R. Yates, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1994**, *5*, 976-989.
- [74] J. R. Yates, 3rd, J. K. Eng, A. L. McCormack, *et al.*, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1426-1436.
- [75] D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, *et al.*, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- [76] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 1794-1805.
- [77] J. E. Elias, S. P. Gygi, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 207-214.
- [78] M. Spivak, J. Weston, L. Bottou, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 3737-3745.
- [79] M. S. Kim, S. M. Pinto, D. Getnet, *et al.*, *Nature* **2014**, *509*, 575-581.
- [80] M. M. Makowski, C. Grawe, B. M. Foster, *et al.*, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1653.
- [81] T. Pfaffeneder, F. Spada, M. Wagner, *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 574-581.
- [82] B. Haupl, C. H. Ihling, A. Sinz, *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 3686-3699.
- [83] X. Zhang, A. H. Smits, G. B. van Tilburg, *et al.*, *Mol. Cell* **2017**, *65*, 941-955 e948.
- [84] A. Bruckner, C. Polge, N. Lentze, *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2763-2788.
- [85] J. Dengjel, I. Kratchmarova, B. Blagoev, *Methods in Molecular Biology, Vol. 658*, Humana Press, **2010**.
- [86] A. H. Smits, M. Vermeulen, *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 825-834.
- [87] M. R. Sciuto, U. Warnken, M. Schnolzer, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2018**, *17*, 993-1009.
- [88] E. V. Petrotchenko, J. J. Serpa, A. N. Cabecinha, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 527-535.
- [89] A. Leitner, R. Reischl, T. Walzthoeni, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, M111 014126.
- [90] B. Schilling, R. H. Row, B. W. Gibson, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2003**, *14*, 834-850.
- [91] Z. Orbán-Németh, R. Beveridge, D. M. Hollenstein, *et al.*, *Nat. Prot.* **2018**, *13*, 478.
- [92] O. Rinner, J. Seebacher, T. Walzthoeni, *et al.*, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 315-318.
- [93] Z. A. Chen, A. Jawhari, L. Fischer, *et al.*, *EMBO J.* **2010**, *29*, 717-726.
- [94] V. Tinnefeld, A. S. Venne, A. Sickmann, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 459-469.
- [95] S. Kang, L. Mou, J. Lanman, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1719-1726.
- [96] S. M. Chowdhury, X. Du, N. Tolic, *et al.*, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5524-5532.
- [97] A. M. Burke, W. Kandur, E. J. Novitsky, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5030-5037.
- [98] M. A. Nessen, G. Kramer, J. Back, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 3702-3711.

- [99] A. Leitner, T. Walzthoeni, A. Kahraman, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1634-1649.
- [100] F. Yu, N. Li, W. Yu, *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 3942-3952.
- [101] M. Gotze, J. Pettelkau, R. Fritzsche, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2015**, *26*, 83-97.
- [102] M. Gotze, J. Pettelkau, S. Schaks, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2012**, *23*, 76-87.
- [103] S. B. Fan, J. M. Meng, S. Lu, *et al.*, *Curr. Protoc. Bioinform.* **2015**, *49*, 8 21 21-19.
- [104] A. Panchaud, P. Singh, S. A. Shaffer, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 2508-2515.
- [105] J. F. Parcher, M. Wang, A. G. Chittiboyina, *et al.*, *Drug Test. Anal.* **2018**, *10*, 28-36.
- [106] C. Benda, J. Ebert, R. A. Scheltema, *et al.*, *Mol. Cell* **2014**, *56*, 43-54.
- [107] M. Stadlmeier, Masterarbeit, LMU München **2014**.
- [108] S. Madler, C. Bich, D. Touboul, *et al.*, *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 694-706.
- [109] C. B. Gutierrez, C. Yu, E. J. Novitsky, *et al.*, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 8315-8322.
- [110] A. Blencowe, W. Hayes, *Soft Matter* **2005**, *1*, 178-205.
- [111] G. D. Prestwich, G. Dorman, J. T. Elliott, *et al.*, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 222-234.
- [112] C. J. Collins, B. Schilling, M. Young, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4023-4026.
- [113] D. R. Müller, P. Schindler, H. Towbin, *et al.*, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1927-1934.
- [114] P. Novak, G. H. Kruppa, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2008**, *14*, 355-365.
- [115] E. J. Soderblom, M. B. Goshe, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8059-8068.
- [116] F. Dreiocker, M. Q. Muller, A. Sinz, *et al.*, *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 178-189.
- [117] M. Q. Muller, F. Dreiocker, C. H. Ihling, *et al.*, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6958-6968.
- [118] A. Kao, C. L. Chiu, D. Vellucci, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, M110 002212.
- [119] F. Liu, P. Lossl, R. Scheltema, *et al.*, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15473.
- [120] X. Tang, J. E. Bruce, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 939-947.
- [121] C. Yu, W. Kandur, A. Kao, *et al.*, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2099-2106.
- [122] P. V. Bondarenko, D. Chelius, T. A. Shaler, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4741-4749.
- [123] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Luber, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 2513-2526.
- [124] S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 376-386.
- [125] S. E. Ong, M. Mann, *Nat Protoc* **2006**, *1*, 2650-2660.
- [126] Z. Li, R. M. Adams, K. Chourey, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 1582-1590.
- [127] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994-999.
- [128] M. Stadlmeier, J. Bogen, M. Wallner, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2958-2962.
- [129] A. Thompson, J. Schafer, K. Kuhn, *et al.*, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1895-1904.
- [130] L. Dayon, A. Hainard, V. Licker, *et al.*, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2921-2931.
- [131] G. C. McAlister, E. L. Huttlin, W. Haas, *et al.*, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7469-7478.
- [132] F. Xiang, H. Ye, R. Chen, *et al.*, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2817-2825.
- [133] P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 1154-1169.
- [134] C. R. Braun, G. H. Bird, M. Wuhr, *et al.*, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9855-9863.
- [135] S. Y. Ow, M. Salim, J. Noirel, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5347-5355.
- [136] N. A. Karp, W. Huber, P. G. Sadowski, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1885-1897.
- [137] C. D. Wenger, M. V. Lee, A. S. Hebert, *et al.*, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 933-935.
- [138] L. Ting, R. Rad, S. P. Gygi, *et al.*, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 937-940.
- [139] G. C. McAlister, D. P. Nusinow, M. P. Jedrychowski, *et al.*, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7150-7158.
- [140] M. Wuhr, W. Haas, G. C. McAlister, *et al.*, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9214-9221.
- [141] M. Sonnett, E. Yeung, M. Wuhr, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 5032-5039.
- [142] S. Virreira Winter, F. Meier, C. Wichmann, *et al.*, *Nat. Methods* **2018**, *15*, 527-530.
- [143] G. Wu, Q. Liu, Y. Shen, *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5831-5834.
- [144] Z. He, L. A. Henricksen, M. S. Wold, *et al.*, *Nature* **1995**, *374*, 566-569.
- [145] M. Grimm, T. Zimniak, A. Kahraman, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W362-369.
- [146] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, *et al.*, *Science* **2011**, *333*, 1300-1303.
- [147] Y. Zhang, *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 40.
- [148] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, *Nat Protoc* **2010**, *5*, 725-738.
- [149] J. Yang, R. Yan, A. Roy, *et al.*, *Nat. Methods* **2014**, *12*, 7.
- [150] L. Hu, Z. Li, J. Cheng, *et al.*, *Cell* **2013**, *155*, 1545-1555.

- [151] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *106*, 1-5.
- [152] T. Hara, Y. J. Xu, H. Sasaki, *et al.*, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2000**, *43*, 1005-1011.
- [153] M. J. Calverley, *Synth. Commun.* **2006**, *13*, 601-609.
- [154] G. E. Reid, K. D. Roberts, E. A. Kapp, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 751-759.
- [155] B. ElAmin, G. M. Anantharamaiah, G. P. Royer, *et al.*, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3442-3444.
- [156] J. Griss, F. Reisinger, H. Hermjakob, *et al.*, *Proteomics* **2012**, *12*, 795-798.
- [157] J. Meija, B. Coplen Tyler, M. Berglund, *et al.*, in *Pure Appl. Chem., Vol. 88*, **2016**, p. 265.
- [158] M. Wühr, T. Guttler, L. Peshkin, *et al.*, *Curr. Biol.* **2015**, *25*, 2663-2671.
- [159] N. A. Kulak, G. Pichler, I. Paron, *et al.*, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 319-324.
- [160] M. J. Sippl, M. Wiederstein, *Structure* **2012**, *20*, 718-728.
- [161] A. Kahraman, L. Malmstrom, R. Aebersold, *Bioinformatics* **2011**, *27*, 2163-2164.

9 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
4-DMAP	4-(Dimethylamono)-pyridin
A	Adenin
AA	engl. <i>amino acid</i> , Aminosäure
AGC	engl. <i>automatic gain control</i> , automatische Verstärkungsregelung
AQUA	engl. <i>absolute quantification</i>
Arg	Arginin
Azid-A-DSBSO	Azid-markiertes, säurespaltbares Disuccinimidyl-bissulfoxid
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i> , bovines Serumsalbumin
Bst Pol1	DNA-Polymerase 1 aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
BuTuGPG-Linker	Edman-Linker
C	Cytosin
caC	5-Carboxycytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CID	engl. <i>collision induced dissociation</i> , kollisionsinduzierte Fragmentierung
CMT	engl. <i>combinatorial isobaric mass tag</i>
CRISPR	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
CSM	engl. <i>crosslink spectral match</i> , XL-Spektrumszuordnung
C-Trap	engl. <i>curved linear trap</i> , gekrümmte lineare Ionenfalle
CuAAC	kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholiniumchlorid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSBH	engl. <i>double stranded β-helices</i> , Doppelstrang β -Helices
DSSO	Disuccinimidyl Sulfoxid
DTT	Dithiothreitol

E	Energie
EASI-Tag	engl. <i>easily abstractable sulfoxide-based isobaric-tag</i>
ECD	engl. <i>electron capture dissociation</i> , Elektroneneinfangdissoziation
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
eGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i> , verbessertes grün fluoreszierende Protein
EI	Elektronenstoßionisation
engl.	englisch
EPSP	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinepropansulfonsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETD	Elektronentransferdissoziation
eV	Elektronenvolt
FA	engl. <i>formic acid</i> , Ameisensäure
fC	5-Formylcytosin
FDR	engl. <i>false discovery rate</i> , Falscherkennungsrate
FT-ICR-MS	Fourier-Transformations Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer
FT-MS	Fourier-Transformations Massenspektrometer
G	Guanin
GLUD	Glutamat-Dehydrogenase 1
GuaCl	Guanidiniumchlorid
hAPOBEC2	humanes wahrscheinlich C zu U deaminierendes Enzym
hCA2	humane Carboanhydrase 2
HCD	engl. <i>higher-energy C-Trap dissociation</i>
HEK	engl. <i>human embryonic kidney</i> , humane embrionale Niere[nzellen]
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hmC	5-Hydroxymethylcytosin
HNRNPU	engl. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Iodacetamid
ICAT	engl. <i>isotope-coded affinity tags</i>
ICR	engl. <i>ion cyclotron resonance</i> , Ionenzyklotronresonanz
ID	Identifikation
IR	Infrarot

I-TASSER	engl. <i>iterative threading assembly refinement</i>
iTRAQ	engl. <i>isobaric tags for relative and absolute quantification</i>
LC	engl. <i>liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
LFQ	engl. <i>label-free quantification</i> , markierungsfreie Quantifizierung
LMCO	engl. <i>low-mass cut-off</i>
IsSOT	<i>less-steric</i> SOT
IsST	<i>less-steric sulfide tag</i>
LTQ	engl. <i>linear trap quadrupole</i> , lineare Ionenfalle
Lys	Lysin
m/z	Masse-zu-Ladung
MALDI	engl. <i>matrix-assisted laser-desorption/ionisation</i> , Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mC	5-Methylcytosin
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS ¹	Full Scan
MS ²	MS/MS-Scan
MS ³	MS/MS/MS-Scan
MWCO	engl. <i>molecular weight cut-off</i> , Größenausschluss
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NHS-TFA	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid-Trifluoroacetat
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
OT-MS	Oribtrap-Massenspektrometer
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PIR	Proteininteraktionsreporter
PSM	engl. <i>peptide spectral match</i> , Peptid-Spektrumszuordnung
PyBop	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
Reag.	Reagenz
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A
rp-HPLC	engl. <i>reversed phase HPLC</i> , Umkehrphasenhochleistungsflüssigkeitschromatographie

RT	Raumtemperatur
SCX	engl. <i>strong cation exchange chromatography</i> , starke Kationenaustauschchromatographie
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	engl. <i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
SILAC	engl. <i>stable isotope labelling by amino acids in cell culture</i>
SOT	Sulfoxid-Tag
SPS	engl. <i>synchronous precursor selection</i> , Synchrone Vorläuferionenisolierung
ssDNA	engl. <i>single-stranded DNA</i> , Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
SuDP-Reagenz	Succinamyl-Aspartyl-Prolyl-Reagenz
T	Thymin
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe
TBDMSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TET	<i>ten-eleven translocation</i> -Protein
TET3cd	katalische Domäne des TET3-Proteins
TFA	engl. <i>trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
Th	Thompson
THPTA	Tris((1-hydroxy-propyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amin
TMT	engl. <i>tandem mass tags</i>
TOF	engl. <i>time of flight</i> , Flugzeit
tRPA	trimerer RPA-Komplex
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
UV/Vis	Ultraviolett/sichtbares Licht
XL	Crosslink
XPA	engl. <i>DNA repair protein complementing XP-A-cells</i>