VIP Proteinstruktur Very Important Paper

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201510983
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201510983

Ladungsinduziertes Entwinden isolierter Proteine zu einer definierten Sekundärstruktur

*Ana Isabel González Flórez, Eike Mucha, Doo-Sik Ahn, Sandy Gewinner, Wieland Schöllkopf, Kevin Pagel und Gert von Helden**

Abstract: *In einer kombinierten experimentellen und theoretischen Studie untersuchen wir die Sekundärstruktur isolierter Proteine in Abhängigkeit ihrer Ladung. In den Infrarotspektren der Proteine Ubiquitin und Cytochrom c treten Amid-I-Banden (C=O-Streckschwingung) und Amid-II-Banden (N-H-Biegeschwingung) an Positionen auf, die typisch für Proteine in der kondensierten Phase sind. Bei hohen Ladungszuständen tritt eine neue Bande auf, die eine wesentliche Rotverschiebung zur Amid-II-Bande niedrigerer Ladungszustände aufweist. Diese Beobachtungen lassen sich als Coulomb-induzierter Übergang aus einer hauptsächlich helikalen in eine gestreckte Sekundärstruktur interpretieren, welche durch C_5-Wasserstoffbrücken gekennzeichnet ist. Gestützt wird diese Deutung durch ein simples elektrostatisches Modell sowie durch quantenchemische Berechnungen an Modellpeptiden. Dieser Übergang der Sekundärstruktur ist aller Voraussicht nach für isolierte Proteine – wie sie in der Massenspektrometrie auftreten – allgemeingültig.*

Die Struktur und Dynamik von Proteinen wird durch ein sensibles Zusammenspiel von verschiedenen attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen bestimmt. Dabei wird die Potentialhyperfläche neben kovalenten Bindungen auch durch mehrere nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Pauli-Repulsion, dispersive Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken sowie Coulomb-Potentiale geformt, aus denen die strukturellen und dynamischen Eigenschaften hervorgehen. In der kondensierten Phase spielen Wechselwirkungen mit der Umgebung eine entscheidende Rolle. Werden jedoch, für analytische Zwecke, oder um intrinsische Eigenschaften zu untersuchen, Experimente in der Gasphase durchgeführt, sind diese Wechselwirkungen explizit abwesend. In diesem Fall wird die Strukturbildung maßgeblich durch das Zusammenspiel zwischen Wasserstoffbrücken und Coulomb-Abstoßung beeinflusst. Der aus der Coulomb-Abstoßung resultierende Übergang von gefalteten, kompakten Formen zu ausgedehnteren Konformationen konnte in bahnbrechenden Ionenmobilitätsspektrometrie-Experimenten beobachtet werden.[1] Mit diesem experimentellen Ansatz lässt sich die Größe (genauer der Kollisionsquerschnitt) von Ionen mittels ihrer Gasphasenmobilität bestimmen. Hierdurch konnte für die beiden Proteine Cytochrom c[1,2] und Ubiquitin[2b,3] gezeigt werden, dass in Abhängigkeit ihrer Ladung eine Vielzahl unterschiedlicher Strukturen existiert. Ein allmählich größer werdender Kollisionsquerschnitt für hohe Ladungszustände deutet hierbei auf ein mögliches Entfalten von vermutlich helikalen Strukturen hin.[1b,2b] Mithilfe der Ionenmobilitätsspektrometrie lassen sich zwar Aussagen über die allgemeine Größe und Form von Proteinen treffen, jedoch ist diese Methode nicht unmittelbar gegenüber strukturellen Details, wie z. B. die Sekundärstruktur, empfindlich. Diese Lücke wird durch die Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) geschlossen, da die spektrale Lage und das Profil von Absorptionsbanden genutzt werden können, um Informationen über die Sekundärstruktur zu erlangen. Insbesondere die C=O-Streckschwingung (Amid I) und die N-H-Biegeschwingung (Amid II) sind von großer Bedeutung, da ihre IR-Signaturen durch das lokale Wasserstoffbrücken-Netzwerk beeinflusst werden. Aus diesem Grund wird die Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen in der kondensierten Phase routinemäßig durch IR-Spektroskopie untersucht.[4] In dieser Studie verwenden wir IR-Strahlung, um eine ladungsabhängige Veränderung der Sekundärstruktur der beiden Proteine Ubiquitin und Cytochrom c in der ultrakalten Umgebung von suprafluiden Heliumtröpfchen zu untersuchen. Unsere Ergebnisse deuten auf einen nahtlosen Übergang von helikalen zu ausgedehnteren Strukturen hin, welcher durch individuelle Banden innerhalb der Amid-II-Region verfolgt werden kann.

Der experimentelle Aufbau ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt und besteht aus einer neu aufgebauten Apparatur, die die gleiche Funktionsweise wie ein bereits zuvor beschriebener Aufbau[5] aufweist. Mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) werden Ionen in die Gasphase gebracht und anschließend durch einen Quadrupol-Massenfilter nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis selektiert. Die ausgewählten Ionen werden dann für einige Sekunden in eine Hexapol-Ionenfalle eingespeist. Sobald die Falle gefüllt ist, können die Ionen von einem gepulsten Strahl Heliumtröpfchen aufgenommen werden, welche die Falle durchqueren. Die in dieser Arbeit verwendeten Heliumtröpfchen bestehen im Durchschnitt aus etwa 10^6 Heliumatomen. Die eingebet-

[*] A. I. González Flórez, E. Mucha, Dr. D.-S. Ahn, S. Gewinner, Dr. W. Schöllkopf, Prof. Dr. K. Pagel, Dr. G. von Helden
Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft
Faradayweg 4–6, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: helden@fhi-berlin.mpg.de
Prof. Dr. K. Pagel
Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
ORCIDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter http://dx.doi.org/10.1002/ange.201510983 zu finden.

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

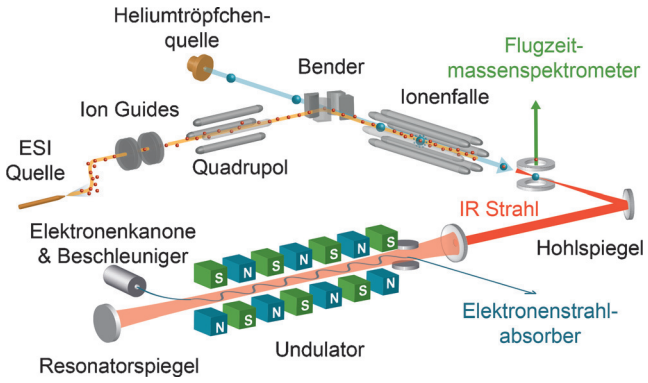

Abbildung 1. Experimenteller Aufbau. Ionen werden in die Gasphase transferiert, nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis selektiert und in der Ionenfalle gesammelt. Heliumtröpfchen können diese Ionen aufnehmen, um anschließend als dotierte Tröpfchen mit dem Freie-Elektronen-Laser untersucht zu werden.

teten Ionen werden auf die Gleichgewichtstemperatur des Tröpfchens von 0.37 K abgekühlt, und die beladenen Tröpfchen können die Falle verlassen, da ihre kinetische Energie weitaus größer ist als das longitudinale Potential der Falle. Anschließend wurden die mit Ionen dotierten Heliumtröpfchen mit dem IR-Freie-Elektronen-Laser des Fritz-Haber-Instituts (FHI FEL)[6] untersucht. Die Absorption von (multiplen) Photonen kann nun dazu führen, dass das Ion aus dem Heliumtröpfchen ausgeworfen wird.[5b,7] Wenngleich dieser Prozess noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kann er als Nachweis für die Absorption von Photonen genutzt werden. Die Auftragung der gemessenen Intensität der ausgeworfenen Ionen als Funktion der IR-Frequenz ergibt das IR-Spektrum.[7b,8]

In Abbildung 2a und 2b sind ausgewählte IR-Spektren der beiden Proteine Ubiquitin und Cytochrom c im Wellenzahlbereich von 1400 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} dargestellt. Die Spektren sind hierbei für jedes Protein nach dem Ladungszustand der Ionen eingestuft: niedrig (N), mittel (M) und hoch (H). Mit der Ausnahme von Cytochrom c 24+ zeigen alle Spektren eine Bande um 1650 cm^{-1}. Eine dominante Bande an dieser Stelle im IR-Spektrum ist für Proteine üblich und resultiert aus C=O-Streckschwingungen (Amid I) im Proteingerüst. Bei den Spektren in Abbildung 2 lässt sich mit steigendem Ladungszustand eine leichte Blauverschiebung dieser Bande mit einer einhergehenden Abnahme ihrer Intensität feststellen. Bei niedrigeren Wellenzahlen sind zwei weitere Banden zu finden. Sie treten in einem Bereich auf, in dem die charakteristische Bande der N-H-Biegeschwingung (Amid II) des Proteingerüsts erwartet wird. Hier hingegen lassen sich zwei Banden beobachten: eine als Amid-IIa gekennzeichnete Bande um 1480 cm^{-1} und eine weitere bei etwa 1550 cm^{-1}, die als Amid-IIb gekennzeichnet ist. Die Amid-IIb-Bande lässt sich nur bei niedrigen und mittleren Ladungszuständen beobachten. Während diese Bande mit steigender Ladungszahl an Intensität verliert und schließlich verschwindet, taucht die Amid-IIa-Bande erst bei mittleren Ladungszuständen auf. Neben den Spektren in Abbildung 2a und 2b wurden auch Spektren für weitere, dazwischenliegende Ladungszustände gemessen, die demselben Trend folgen. Die relativen Intensitäten der Amid-IIa- und Amid-IIb-Banden sind in Abbildung 2c für beide Proteine als Funktion des Ladungszustands aufgetragen. Beide Kurvenpaare zeigen ein sehr ähnliches Verhalten und unterscheiden sich lediglich darin, dass der Übergang von der Amid-IIa- zur Amid-IIb-Bande für Ubiquitin beim Ladungszustand 11+ und für das größere Protein Cytochrom c bei 14+ liegt.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die erhaltenen Spektren aus der Absorption mehrerer Photonen resultieren. Obwohl die Intensität der Banden nichtlinear vom Wirkungsquerschnitt und der Energie der Laserpulse abhängt,

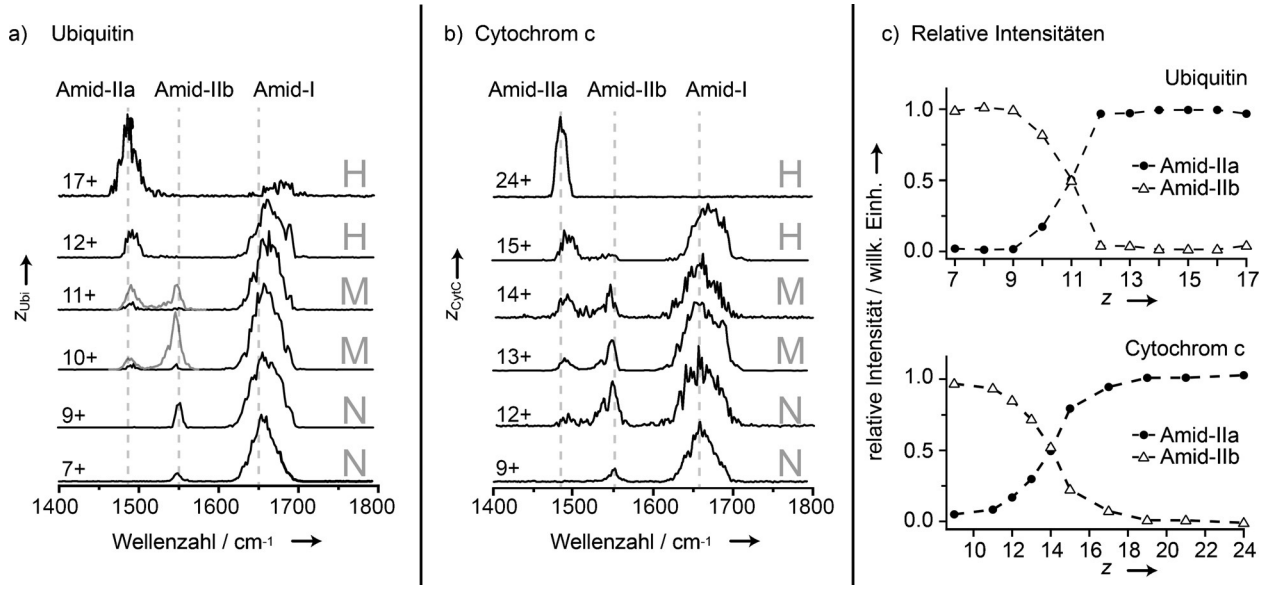

Abbildung 2. IR-Spektren von a) Ubiquitin und b) Cytochrom c für verschiedene Ladungszustände. Graue Liniensegmente für Ubiquitin 10+ und 11+ kennzeichnen eine höhere Photonendichte. Es treten drei verschiedene Banden auf, die als Amid-IIa, Amid-IIb sowie Amid-I gekennzeichnet sind. c) Relative Intensitäten der Amid-IIa- und Amid-IIb-Banden in Abhängigkeit der Ladung.

 © 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

wird hier als Korrektur in erster Näherung die Signalintensität durch die Energie der Laserpulse geteilt. Aus diesem Grund sollten relative Intensitäten in diesem Experiment nur zur allgemeinen Orientierung genutzt werden. Eine Verschiebung der Bandenpositionen durch den Mehrphotonenprozess ist hingegen nicht zu erwarten. Durch die Zeitstruktur der IR-Strahlung finden aufeinanderfolgende Absorptionen über einen Zeitraum von bis zu mehreren Mikrosekunden statt. Da sich das Ion jedoch im Heliumtröpfchen befindet, ist es sehr wahrscheinlich, dass es zwischen den einzelnen Absorptionen abgekühlt wird, sodass jede Absorption aus dem Schwingungsgrundzustand des Ions stattfindet. Daher kann hier, im Gegensatz zu IR-Multiple-Photonen-Dissoziations-Experimenten (IRMPD),[9] der Einfluss von Anharmonizitäten ausgeschlossen werden. Diese Annahme konnte durch neueste IR-Spektren von Peptiden in Heliumtröpfchen bestätigt werden.[7b]

In der kondensierten Phase weisen Amid-I-Banden bei stärkeren Wasserstoffbrücken üblicherweise eine Rotverschiebung auf und liegen im Bereich von 1654 cm^{-1} für hauptsächlich helikale oder Random-Coil-Strukturen bis 1633 cm^{-1} für Spezies mit hohem β-Faltblatt-Anteil.[4] Die hier beobachtete Amid-I-Bande (um 1650 cm^{-1}) liegt in diesem Wellenzahlbereich und ihre Position könnte ein Indikator für vorwiegend helikale Strukturen sein. Die Amid-II-Bande tritt normalerweise bei 1550 cm^{-1} auf, wobei die genaue Position in geringerem Maße von der Sekundärstruktur abhängt.[4] Die hier als Amid-IIb gekennzeichnete Bande um 1550 cm^{-1} weist daher eine gute Übereinstimmung mit der typischen Position der Amid-II-Bande von Proteinen in der kondensierten Phase auf. Was ist jedoch der Ursprung der zur Amid-IIb rotverschobenen Bande – der Amid-IIa-Bande?

IR-Spektren von Cytochrom c wurden zuvor über einen kleineren Bereich von Ladungszuständen bei Raumtemperatur mittels IRMPD-Technik gemessen.[11] Hierbei wurden qualitativ ähnliche, aber weitaus breitere Spektren gefunden. Dieser Vergleich bestätigt, dass die (unbekannte) Dynamik des Auswurfprozesses oder Schwingungsanharmonizitäten keinen signifikanten Einfluss auf die hier gezeigten Spektren haben. Interessanterweise wurde auch in diesen Spektren eine zusätzliche Bande bei 1483 cm^{-1} beobachtet, welche jedoch zu dieser Zeit nicht sinnvoll zugeordnet werden konnte.[11] In der Ionenmobilitätsspektrometrie konnte eindeutig gezeigt werden, dass Proteine von kompakten, möglicherweise nativ-ähnlichen Strukturen zu ausgedehnteren, helikalen Strukturen übergehen, wenn sich die Ladung des Ions erhöht.[1b] Dieser Übergang zeigt sich als starker Anstieg des Kollisionsquerschnitts, der für Cytochrom c bei den Ladungszuständen 7+ und 8+[1b] und für Ubiquitin bei den Ladungszuständen 6+ und 7+ auftritt.[3a] Wird die Ladung des Proteins weiterhin erhöht, kommt es zu einem allmählichen Anstieg des Kollisionsquerschnitts. Der größtmögliche Kollisionsquerschnitt für eine vollständig ausgedehnte, fast fadenförmige Struktur wird allerdings nicht erreicht. Modellberechnungen sagen diese Struktur allenfalls für sehr hohe Ladungszustände voraus.[1b]

Der Übergang der Amid-IIb- zur Amid-IIa-Bande könnte auf eine drastische Strukturänderung, die über einen kleinen Bereich von Ladungszuständen auftritt, hindeuten. Helikale Strukturen weisen ein Netzwerk von starken Wasserstoffbrücken auf und können die auftretenden Ladungen gleichzeitig über eine relativ große Distanz voneinander trennen und so die Coulomb-Abstoßung minimieren. Es wurde bereits zuvor erkannt, dass eine steigende Zahl an Ladungen – und somit Coulomb-Abstoßung – ab einem bestimmten Punkt zum Entfalten der Helix führt, sodass die Ladungen über eine noch größere Distanz verteilt werden können.[1b,2b] Eine solche vollständig entfaltete Struktur ist einem β-Faltblatt-Einzelstrang ähnlich und wird durch C_5-Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten C=O- und N-H-Gruppen stabilisiert.

Um die Energiedifferenz zwischen einer helikalen und einer vollständig entfalteten Struktur abzuschätzen, kann die entsprechende Coulomb-Energie E_C von N Ladungen, die über eine Distanz r_{ij} voneinander getrennt sind, als:

$$E_C = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r}\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=i+1}^{N}\frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

berechnet werden, wobei ε_0 die Vakuumpermittivität und ε_r die relative Permittivität darstellt. Unter der Annahme, dass N gleichartige Ladungen äquidistant über eine Länge L verteilt werden, kann die oben gezeigte Gleichung ausgedrückt werden als:

$$E_C = \frac{1}{L}\,\frac{q^2(N-1)}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r}\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=i+1}^{N}\frac{1}{j-i}$$

Die berechnete Differenz der Coulomb-Energie pro Aminosäurerest (ΔE_C) einer entfalteten und einer helikalen Struktur ist in Abbildung 3a dargestellt. Die Länge einer α-Helix wurde hierbei als $L_{Helix} = 1.5\ n_A$ (Å) und die einer entfalteten Struktur als $L_{entfaltet} = 3.5\ n_A$ (Å) festgelegt, wobei n_A die Anzahl der Aminosäurereste ist. Ferner gilt $\varepsilon_r = 1$.

Die schwarzen Linien in Abbildung 3a stellen die so berechneten Werte von ΔE_C für eine äquidistante Ladungsverteilung dar. Für ein realistischeres Modell muss die Basizität der einzelnen Aminosäuren und die Coulomb-Energie berücksichtigt werden, um die molekulare Ladungsverteilung zu bestimmen. Um eine Ladungsverteilung nach diesem Ansatz zu berechnen, nutzen wir ein Monte-Carlo-Verfahren kombiniert mit simulierter Abkühlung (simulated-annealing), welches Ähnlichkeiten mit einem Ansatz von Schnier et al.[12] aufweist. In diesem Modell werden die bekannten Aminosäuresequenzen der beiden Proteine Ubiquitin und Cytochrom c (die Häm-Gruppe wird vernachlässigt) genutzt. Sowohl helikale als auch entfaltete Konformationen werden als lineare Ketten der Längen $L_{Helix} = 1.5\ n_A$ (Å) und $L_{entfaltet} = 3.5\ n_A$ (Å) angenähert, wobei ein äquidistanter Abstand der einzelnen Aminosäuren angenommen wird. Die Ladungsverteilung wird zunächst mithilfe von Zufallszahlen zugewiesen und die annealing-Parameter werden so gewählt, dass für mehrfache Berechnungen die gleiche Ladungsverteilung mit niedrigster Energie verlässlich gefunden wird. Die hieraus resultierenden Werte für ΔE_C sind in Abbildung 3a als rote Kreise und Quadrate dargestellt und sind in guter Überein-

 © 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

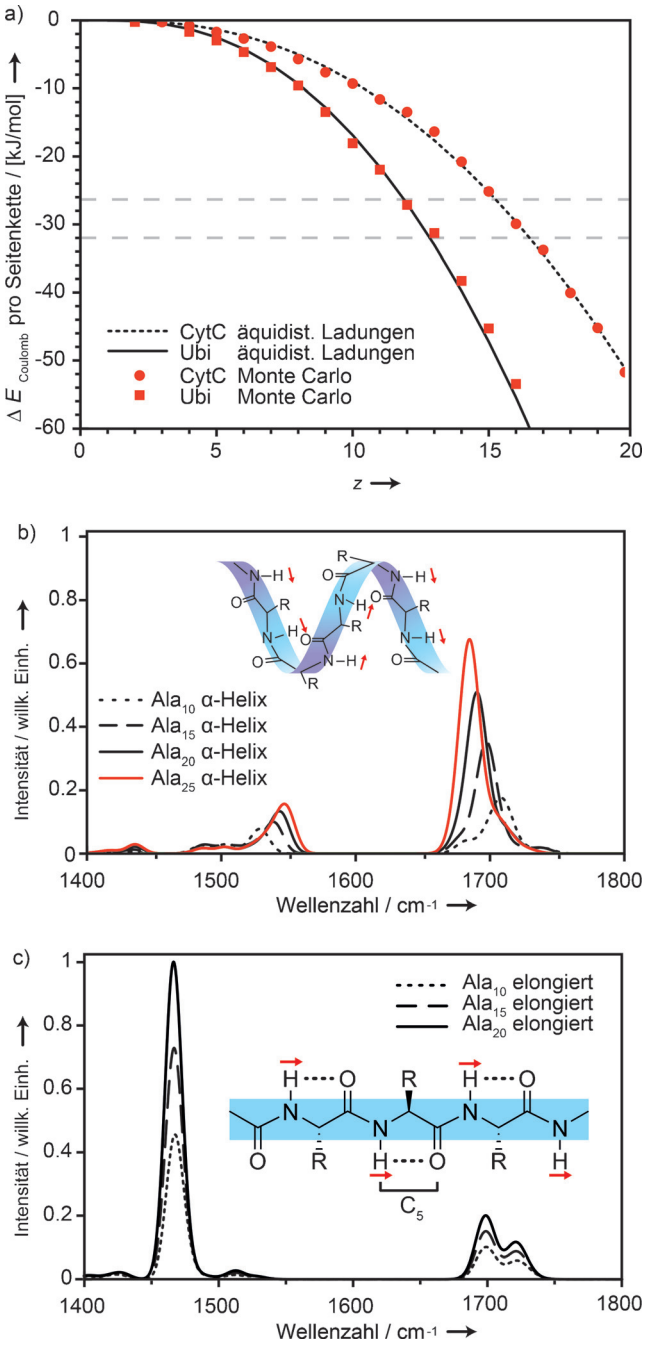

Abbildung 3. a) Differenz der Coulomb-Energie (ΔE_C) pro Aminosäurerest zwischen helikalen und elongierten Konformationen von Ubiquitin und Cytochrom c. Die gestrichelten, horizontalen Linien kennzeichnen die Helixstabilisierungsenergie, die aus quantenchemischen Rechnungen hervorgeht.[10] b) und c) Berechnete IR-Spektren für neutrale Polyalanin-Peptide als α-Helix (b) und ausgedehnte Konformation (c). Rote Pfeile zeigen die Richtung des Übergangsdipolmoments der Amid-II-Schwingung an. C_5-Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.

stimmung mit den Werten der äquidistanten Ladungsverteilung.

Die Energie, die – im Vergleich zu einer vollständig entfalteten Struktur – zur Stabilisierung einer Helix beiträgt, lässt sich durch quantenmechanische Berechnungen ermitteln und liegt je nach gewählter Methode bei $-26.4\ kJ\,mol^{-1}$[10a] und $-32.6\ kJ\,mol^{-1}$[10b] pro Aminosäurerest. Diese Werte sind als graue, gestrichelte Linien in Abbildung 3a dargestellt. Steigt die Ladung des Moleküls, so wird die vollständig entfaltete Struktur stabiler, sobald die Differenz der Coulomb-Energie ΔE_C die Helixstabilisierungsenergie unterschreitet. Das Modell sagt somit voraus, dass eine vollständig entfaltete Struktur für Ubiquitin ab Ladungszustand 12+ oder 13+, und für Cytochrom c ab Ladungszustand 15+ oder 16+ begünstigt ist. Dies deckt sich ungefähr mit den Ladungsbereichen, bei denen der experimentelle Übergang der Amid-IIb- zur Amid-IIa-Bande auftritt. Aus diesem Grund ist das Entfalten der helikalen Struktur zu einer C_5-artigen Struktur von einem energetischen Standpunkt plausibel.

Um zu untersuchen, ob diese Änderung der Sekundärstruktur auch durch die erhaltenen Spektren erklärt werden kann, wurden IR-Spektren von neutralen, Polyalanin-basierten Peptiden für helikale und C_5-artige Strukturen berechnet. Für die DFT-Berechnungen in Gaussian 09[13] wurde das B3LYP-Funktional mit dem def2-SVP-Basissatz und einer Dispersionskorrektur nach Grimme D3[14] verwendet, wobei alle erhaltenen Schwingungsfrequenzen um den Faktor 0.965 skaliert wurden. In Abbildung 3b sind die berechneten Spektren für Ala_{10} bis Ala_{25} in helikaler Konformation dargestellt. Durch stärkere Wasserstoffbrücken und ein größeres Makro-Dipolmoment verschiebt sich die Amid-I-Bande von 1708 cm^{-1} für die Ala_{10}-α-Helix zu 1685 cm^{-1} für die Ala_{25}-α-Helix; aus demselben Grund verschiebt sich die Amid-II-Bande von 1528 cm^{-1} zu 1547 cm^{-1}. Abbildung 3c zeigt die Spektren der entfalteten C_5-Konformation, wobei hier die Position der Amid-I- und Amid-II-Signatur nur unwesentlich von der Größe abhängt. Die Spektren zeigen eine geteilte Amid-I-Bande bei 1721 cm^{-1} und 1698 cm^{-1} sowie eine Amid-II-Bande bei 1466 cm^{-1}. Interessanterweise zeigen die berechneten Spektren der C_5-Konformation im Gegensatz zu denen der Helix eine Amid-II-Bande, die viel intensiver als die Amid-I-Bande ist. Dieser Effekt lässt sich durch die Richtung der einzelnen C=O- und N-H-Übergangsdipolmomente erklären. Das Übergangsdipolmoment der C=O-Streckschwingung verläuft parallel entlang der C=O-Bindung und kann sich in helikalen Strukturen konstruktiv aufsummieren. Andererseits verläuft das Übergangsdipolmoment der N-H-Biegeschwingung orthogonal zur N-H-Bindung und parallel zur Peptidkette. In helikalen Strukturen können sich die einzelnen Übergangsdipolmomente daher nicht aufsummieren und ergeben ein reduziertes Gesamt-Übergangsdipolmoment. In der elongierten C_5-Struktur hingegen sind die einzelnen Übergangsdipolmomente der N-H-Bindung wieder parallel ausgerichtet.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen eine Rotverschiebung der Amid-IIa- gegenüber der Amid-IIb-Bande von etwa 70 cm^{-1}. In den Berechnungen liegt die Rotverschiebung durch den Übergang von helikalen zu C_5-Strukturen bei ungefähr 80 cm^{-1}. Es sollte allerdings beachtet werden, dass die Berechnungen von einer idealen, ausschließlich aus Alanin bestehenden Struktur ausgeht, die keine Ladungen enthält. Unter diesem Gesichtspunkt ist die gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Theorie bemerkenswert, und die berechneten Spektren stützen somit die Deutung, dass die

 © 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Änderung der Bandenpositionen durch das Entfalten helikaler Strukturen verursacht wird. Wie theoretisch vorhergesagt, nimmt außerdem die Intensität der Amid-IIa-Bande im Experiment mit steigendem Ladungszustand zu, bis sie schließlich das Spektrum dominiert.

Abschließend lassen sich die experimentellen, ladungsabhängigen IR-Spektren der beiden verschiedenen Proteine als ein Entfalten von helikalen Strukturen zu einer stabilen Sekundärstruktur, die durch C_5-Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, interpretieren. Diese Erklärung wird durch ein einfaches elektrostatisches Modell sowie durch Simulationen von IR-Spektren, welche die beobachteten Änderungen der Bandenposition und Intensität vorhersagen, gestützt. Ionenmobilitätsstudien legen einen derartigen Übergang ebenfalls nahe, der sich allerdings eher als allmähliches Wachsen des Kollisionsquerschnitts offenbart, wobei die errechnete Grenze einer vollständig linearen Struktur nicht erreicht wird.[1b,2,3e] Auch in dieser Studie ist nicht zweifelsfrei geklärt, ob die gesamte Struktur linear ist, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Wechselwirkungen der geladenen Seitenketten mit dem Proteingerüst möglicherweise zu Biegungen oder Knicken führen. Die hier gezeigten spektroskopischen Ergebnisse belegen jedoch, dass die untersuchten Proteine bei hohen Ladungszuständen zumindest lokal gestreckt und linear vorliegen und keine helikalen Segmente enthalten. In dieser ausgedehnten Konformation wird die Struktur durch Coulomb-Abstoßung dominiert und weist lediglich schwache C_5-Wasserstoffbrücken auf. Während diese einem β-Faltblatt-Einzelstrang ähnliche Struktur in der kondensierten Phase nur geringe Relevanz hat, so ist sie dennoch sehr wahrscheinlich eine universelle Sekundärstruktur hochgeladener Proteinionen in der Gasphase. Somit sind die hier präsentierten Ergebnisse von fundamentaler Bedeutung für massenspektrometrische Experimente, in denen hochgeladene Proteine untersucht werden, wie z. B. bei der Proteinsequenzierung.

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

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3295 – 3299
Angew. Chem. **2016**, *128*, 3356 – 3360

[1] a) D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10141 – 10142; b) K. B. Shelimov, D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2240 – 2248.

[2] a) S. J. Valentine, D. E. Clemmer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 506 – 517; b) C. C. Going, E. R. Williams, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3973 – 3980.

[3] a) S. J. Valentine, A. E. Counterman, D. E. Clemmer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 954 – 961; b) S. L. Koeniger, S. I. Merenbloom, D. E. Clemmer, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7017 – 7021; c) S. L. Koeniger, S. I. Merenbloom, S. Sevugarajan, D. E. Clemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11713 – 11719; d) S. L. Koeniger, D. E. Clemmer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 322 – 331; e) T. Wyttenbach, M. T. Bowers, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12266 – 12275.

[4] A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073 – 1101.

[5] a) F. Bierau, P. Kupser, G. Meijer, G. von Helden, *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *105*, 133402; b) F. Filsinger, D. S. Ahn, G. Meijer, G. von Helden, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 13370 – 13377.

[6] W. Schöllkopf, S. Gewinner, H. Junkes, A. Paarmann, G. von Helden, H. Bluem, A. M. M. Todd, in *Advances in X-Ray Free-Electron Lasers Instrumentation III*, *Proceedings of SPIE*, *Bd. 9512* (Hrsg.: S. G. Biedron), **2015**, S. 95121L.

[7] a) S. Smolarek, N. B. Brauer, W. J. Buma, M. Drabbels, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14086 – 14091; b) A. I. González Flórez, D. S. Ahn, S. Gewinner, W. Schöllkopf, G. von Helden, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 21902 – 21911.

[8] X. Zhang, N. B. Brauer, G. Berden, A. M. Rijs, M. Drabbels, *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 044305.

[9] J. Oomens, B. G. Sartakov, G. Meijer, G. von Helden, *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *254*, 1 – 19.

[10] a) A. Tkatchenko, M. Rossi, V. Blum, J. Ireta, M. Scheffler, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *106*, 118102; b) S. Hua, L. Xu, W. Li, S. Li, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 11462 – 11469.

[11] J. Oomens, N. Polfer, D. T. Moore, L. van der Meer, A. G. Marshall, J. R. Eyler, G. Meijer, G. von Helden, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 1345.

[12] P. D. Schnier, D. S. Gross, E. R. Williams, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 1086 – 1097.

[13] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, **2009**.

[14] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.

Eingegangen am 26. November 2015
Online veröffentlicht am 5. Februar 2016

 © 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim