

Konformerenaufgelöste  
Photoelektronenspektroskopie an mehrfach  
geladenen Biomolekülanionen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl. Chem. Matthias Vonderach

aus

Waldshut

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Manfred M. Kappes

Korreferent: PD Dr. Andreas-Neil Unterreiner

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2012



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>4</b>
2.1	Ionenmobilität	4
2.1.1	Ankunftszeitverteilung und Stoßquerschnitt	4
2.1.2	Projektionsnäherung	5
2.2	Photoelektronenspektroskopie	6
2.2.1	Repulsive Coulombbarriere in mehrfach geladenen Anionen	8
2.3	Molekulardynamik	9
2.3.1	Simulated Annealing	11
2.4	Hartree-Fock-Methode	12
2.4.1	Koopmans-Theorem	13
2.5	Semiempirische Methoden	13
<b>3</b>	<b>Experimenteller Aufbau</b>	<b>15</b>
3.1	Elektrospray-Ionisierung	16
3.2	Driftzelle mit Ionentrichtern	17
3.3	Führungsquadrupol und Umlenker	20
3.4	Quadrupolmassenfilter	21
3.5	Photoelektronenspektrometer	23
3.6	Ionen und Elektronendetektor	25
3.7	Orbitrap	26
<b>4</b>	<b>Durchführung</b>	<b>27</b>
4.1	Zeitlicher Verlauf und Steuerung des Experiments	27
4.2	Messung von Ionenmobilitäten / Stoßquerschnitten	28
4.3	Stoßinduzierte Aktivierung im Eingangstrichter	28
4.4	Aufnahme von Photoelektronenspektren	29
4.5	Kalibrierung des Photoelektronenspektrometers	30
<b>5</b>	<b>Oligonukleotide und DNA</b>	<b>32</b>
5.1	Oligonukleotide	32
5.1.1	Tetranukleotide	33
5.1.2	Interpretation der Photoelektronenspektren	35
5.1.3	Modifizierte Nukleinsäuren	36
5.1.4	Pentanukleotide und Hexanukleotide	39
5.1.5	Abhängigkeit von der Detachmentwellenlänge	41
5.1.6	Zusammenfassung und Diskussion	42
5.1.7	Sequenzabhängigkeit der Oligonukleotidanionen $A_4T$ , $AT_4$ und $GT_4$	44
5.1.8	Vergleich mit theoretischen Rechnungen	48

5.1.9	Photodetachment Mechanismus	52
5.1.10	Abschließende Diskussion	56
5.2	Telomere Sequenz und Quadruplexe	58
5.2.1	Hexanukleotide	59
5.2.2	Ikosanukleotide	62
5.2.3	Quadruplexe	62
5.2.4	Abschließendes Fazit	66
5.3	DNA	67
5.3.1	Experimentelle Befunde	68
5.3.2	Vergleich mit Strukturkandidaten	69
5.3.3	Vergleich experimenteller Daten von Monomeren und Duplexen	71
5.3.4	Experimenteller Vergleich verwandter Sequenzen	72
5.3.5	Abschließende Diskussion	74
<b>6</b>	<b>Peptide und Proteine</b>	<b>76</b>
6.1	Peptide	77
6.1.1	Photoelektronenspektren der Peptidtrianionen	78
6.1.2	Vergleich mit theoretischen Abschätzungen	79
6.1.3	Photodetachmentmessungen der Peptidtrianionen	82
6.1.4	Abschließende Diskussion	83
6.2	Cytochrom C	84
6.2.1	Ankunftszeitverteilungen und Stoßquerschnitte der Cytochrom C Anionen	85
6.2.2	Photoelektronenspektren der Cytochrom C Anionen	87
6.2.3	Vergleich mit elektrostatischen Abschätzungen	90
6.3	$\alpha$ -Lactalbumin	93
6.3.1	Ankunftszeitverteilungen und Stoßquerschnitte der $\alpha$ -Lactalbuminanionen	94
6.3.2	Photoelektronenspektren der $\alpha$ -Lactalbuminanionen	95
6.3.3	Vergleich mit theoretischen Abschätzungen (native Form)	97
6.3.4	Vergleich mit verwandten Strukturen	100
6.3.5	Strukturvorschläge des teilweise denaturierten Typs	101
6.4	Denaturiertes (reduziertes) $\alpha$ -Lactalbumin	102
6.4.1	Ankunftszeiten und Stoßquerschnitte des denaturierten $\alpha$ -Lactalbumins	102
6.4.2	Photoelektronenspektren des denaturierten $\alpha$ -Lactalbumins	103
6.4.3	Vergleich mit elektrostatischen Abschätzungen anhand einer Helix	107
6.5	Myoglobin	111
6.5.1	Ankunftszeiten und Photoelektronenspektren von Myoglobin	111
6.5.2	Vergleich mit elektrostatischen Abschätzungen anhand einer Helix	113

6.6	Insulin .....	114
6.6.1	Ankunftszeiten und Stoßquerschnitte der Insulinanionen .....	115
6.6.2	Photoelektronenspektren der Insulinanionen .....	119
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>126</b>
8.1	Anhang A .....	126
8.2	Anhang B .....	127
8.3	Anhang C .....	129
8.4	Anhang D .....	130
8.5	Anhang E .....	131
8.6	Anhang F .....	131
	<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>132</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>133</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>134</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>135</b>



## 1 Einleitung

Mit der Entwicklung der Elektrospray-Ionization (ESI) [1] wurde ein Ionisationsverfahren geschaffen, das neben der MALDI-Ionisierungsmethode (matrix assisted laser desorption ionization) [2] ein unbeschadetes Überführen von biologischen Systemen wie beispielsweise Proteinen oder Oligonukleotiden in die Gasphase gestattet. Dies brachte Anwendungen wie die Sequenzierung solcher Systeme nach dem Entfernen des Lösungsmittels mithilfe von auf Tandem-Massenspektrometrie (MS) basierenden Verfahren wie CID (collision induced dissociation) oder ECD (electron capture dissociation) im Bereich der Analytik hervor [3,4,5,6,7], die heutzutage unverzichtbar sind.

Grundlegende strukturelle und elektronische Eigenschaften dieser Systeme rückten zunehmend in den Fokus aktueller Forschungsgebiete. Dank der Entwicklung der Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) gelangen erstmals die Charakterisierung und Bestimmung von Gasphasenstrukturen einiger Proteine wie Cytochrom C oder Ubiquitin [8,9]. Hierbei werden Ionen entlang einem elektrischen Feld durch eine Gasatmosphäre in einer Driftzelle gezogen: aus der bestimmten Driftzeit können dann elementare Strukturinformationen abgeleitet werden. Im Gegensatz zu gestreckten denaturierten Gasphasenkonformationen werden native Konformationen, die mit der Struktur in der kondensierten Phase annähernd übereinstimmen oder ihr gar gleichwertig sind, merklich weniger Zeit zum Durchlaufen der Driftstrecke beanspruchen.

Für die katalytische Aktivität eines Proteins sind neben dem Aufbau seine dielektrischen Eigenschaften außerordentlich entscheidend. Aufschlussreiche Messungen hierzu wurden beispielsweise in der Arbeitsgruppe von Evan R. Williams durchgeführt [10]. Die aus der Umsetzung von Kationen des Cytochroms C mit einer Base resultierenden Gasphasenbasizitäten konnten durch ein extra dafür geschaffenes theoretisches Modell begründet werden. Die experimentellen Resultate ließen sich mit diesem Modell nur dann in Einklang bringen, wenn entweder eine lineare Proteinkette mit einer Dielektrizitätskonstante von zwei angenommen oder eine  $\alpha$ -Helix postuliert wurde, deren Dielektrizitätskonstante 4,2 beträgt. Zumindest Ersteres kommt in Bezug auf die kürzere Zeit später publizierten Mobilitätsdaten [8] keinesfalls in Betracht.

Infolgedessen wären Strukturinformationen zur Beurteilung essentieller elektronischer oder dielektrischer Eigenschaften unumgänglich. Da insbesondere biologische Systeme in der Gasphase abermals aus unzähligen Konformationen zusammengesetzt sind, die nicht auf der Zeitskala des Experiments interkonvertieren, wäre eine der spektroskopischen Untersuchung

vorausgehende Selektion dieser Konformationen erstrebenswert. Erste isomerenaufgelöste Messungen wurden an laserverdampften Kohlenstoffclusterkationen durchgeführt. Hierbei fand zunächst eine zeitliche Trennung von  $C_9^+$ -Isomeren in einer Driftzelle statt. Die anschließende Fragmentierung mit einem Laser und die massenspektrometrische Detektion der Fragmente erbrachten isomerenaufgelöste Photodissoziationsspektren [11]. Infolge der geringen Transmission dieses Aufbaus blieb diese Vorgehensweise jedoch auf wenige Systeme limitiert. Der Durchbruch gelang mit der Entwicklung und Vorstellung des Ionentrichters, der nun ein besonders effizientes Instrument zur Überbrückung von Ionen in bestimmte differentiell gepumpte Areale typischer Gasphasenspektrometer darstellt. Dies ermöglichte 2005 die Verwirklichung einer Driftzelle, die eine Transmission von annähernd 100 % besitzt. Diese enorme Effizienz wird durch Ionentrichter an deren Ein- und Ausgang realisiert [12]. Dank dieser Konstruktion waren mit IMS gekoppelte Massenspektrometer nun erstmals in der Lage, nach der zeitlichen Trennung der einzelnen Isomere oder Konformere und anschließender Massenseparation Ionendichten bereitzustellen, die eine folgende spektroskopische Untersuchung Realität werden lassen.

Bezüglich der elektronischen und dielektrischen Beschaffenheiten ausgewählter Systeme stellt die Photoelektronenspektroskopie (PES) eine zur Messung von Gasphasenbasizitäten analoge sensitive Messmethode dar. Aus dem Herauslösen von Elektronen (= Photodetachment) mit Licht und der Bestimmung der kinetischen Energie resultiert die elektronische Struktur eines Ions und kann ein tieferes Verständnis von elektronischen Besonderheiten wie Ladungslokalisierung oder -delokalisierung liefern. Ansonsten werden Kenntnisse über innere Solvatisierung sowie die Wechselwirkung der Überschussladungen untereinander in von ESI-Quellen erzeugten multianionischen Systemen zugänglich.

Das Ziel dieser Arbeit bestand nun zunächst in der Kopplung eines Flugzeitphotoelektronenspektrometers und eines bereits entwickelten und charakterisierten Aufbaus zur massenselektierten Strukturbestimmung elektrosprühter Ionen, bestehend aus einer ES-Ionisationsquelle, einer hochtransmittierenden Driftzelle und einem Quadrupolmassenfilter [13]. Unter Anwendung dieses Aufbaus, der zum ersten Mal die photoelektronenspektroskopische Untersuchung massen- und konformeren- oder isomerenselektierter Anionen verwirklicht, sollten anschließend erste Messungen an biologischen Systemen ausgeführt werden.

Erste Photoelektronenspektren kleinerer Oligonukleotidanionen  $dN_x$  mit  $n \leq 5$  erbrachten Hinweise, dass die Basenabfolge in beträchtlichem Umfang die elektronische Struktur im üblicherweise von den Überschussladungen dominierten niederenergetischen Bereich



beherrscht [14,15]. Insbesondere bei der Gegenwart einer Guaninbase konnte eine hervorstechende niederenergetische Bande beobachtet werden. Ausgehend von finalen Strukturen der Mononukleotidmonoanionen vorausgegangener Gasphasenexperimente mittels IMS [16] konnten Dichtefunktionalrechnungen (DFT) als Hintergrund dieser Bande die Lokalisierung des HOMO (highest occupied molecular orbital) auf einer neutralen Guaninbase darlegen. Gasphasenaziditäten (GPA) der Nukleinbasen weisen weiterhin darauf hin, dass neben den eigentlichen Phosphaten die Überschussladungen eines per ESI ionisierten Gasphasenanions auch auf den Nukleinbasen bestehen können [17]. Diese liegen nur minimal oberhalb der GPA von HCl oder dem Phosphorsäuredimethylester, einem der DNA verwandten Molekül [18,19]. Ausdrücklich im Bereich der multianionischen Systeme könnte dieser Aspekt enorm an Bedeutung gewinnen. Daher sollten erste konformerenaufgelöste PES-Messungen an kurzen Oligonukleotidsträngen der allgemeinen Form  $\text{dN}_x^{x-1}$  stattfinden. Anschließend werden aus biologischer Betrachtungsweise relevantere Systeme diskutiert, wozu unter anderem die telomere Sequenz zählt, die an den Enden jedes Chromosoms von Eukaryoten existent ist. Dieser wurden anhand von PES-Untersuchungen auf Oberflächen beachtliche Fähigkeiten zugeordnet, langsame potentiell erbgutschädigende Elektronen effizienter als Referenzsequenzen zu binden [20]. Ob ähnliche Phänomene nach dem Herauslösen von Elektronen aus dem  $\pi$ -System der Nukleinbasen wahrgenommen werden können, kann anhand von deren Photoelektronenspektren beurteilt werden. Im Anschluss daran sollen photoelektronenspektroskopische Messungen kürzerer Duplexe erste Einblicke gewähren, inwiefern die in der kondensierten Phase zum Vorschein kommenden elektronischen Besonderheiten auch nach der Überführung in die Gasphase gegeben sind.

Schließlich findet ein Wechsel zu Peptiden und Proteinen statt. Während Gasphasenstrukturen kleinerer Peptide hinreichend gut analysiert wurden [21,22,23,24,25], sind insbesondere Photoelektronenspektren multianionischer Systeme relativ rar [26]. Zunächst sollten daher fundamentale Kenntnisse über die dominanten Detachmentprozesse einiger ausgewählter Peptidanionen erarbeitet werden. Nachfolgend werden die Photoelektronenspektren der Proteine Cytochrom C,  $\alpha$ -Lactalbumin, Myoglobin und Insulin in Abhängigkeit von ihrer Gasphasenkonformation und ihrem Ladungszustand vorgestellt. Der Schwerpunkt hierbei wurde konsequent auf elektronische Besonderheiten wie innere Solvatisierung von Überschussladungen oder allgemeine Fähigkeiten wie die generelle dielektrische Abschirmung von Ladungen gelegt, die in einer Polarisierung der dazwischen ansässigen funktionellen Gruppen begründet liegt.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Ionenmobilität

Die Ionenmobilität beschreibt die Bewegung eines Ions innerhalb eines sog. Puffergases in einem elektrischen Feld. Zwar bewirkt das elektrische Feld eine konstante Beschleunigung entlang der Feldlinien, dennoch verursachen Stöße mit dem Puffergas einen permanenten Verlust an kinetischer Energie des Ions. Dies führt im Grenzfall kleiner Felder zu einer konstanten Driftgeschwindigkeit, sodass das Verhältnis von Geschwindigkeit des Ions  $v_d$  und elektrischem Feld  $E$  eine Konstante, die sog. Ionenmobilität  $K$  ergibt [27]:

$$K = \frac{v_d}{E} \quad (2.1)$$

Weiterhin besteht eine lineare Abhängigkeit von Druck und Temperatur. Demzufolge wird zu Vergleichszwecken üblicherweise die normierte Ionenmobilität  $K_0$  verwendet, die in guter Näherung von Druck und Temperatur unabhängig ist:

$$K_0 = \frac{|p(\text{bar})|}{1,013} \frac{273,15}{|T(\text{K})|} K \quad (2.2)$$

#### 2.1.1 Ankunftszeitverteilung und Stoßquerschnitt

Die Mobilität eines Ions lässt sich über eine kinetische Ableitung mit seinem Stoßquerschnitt verknüpfen [27]. Der in einer Driftzelle herrschende Teilchenfluss  $J$  einer bestimmten Ionensorte enthält außer der Bewegung des Ions entlang des elektrischen Feldes einen vom Feld unabhängigen Term. Dieser liegt in der Diffusionsbewegung der Teilchen / Ionen entgegen eines Konzentrationsgradienten begründet und lässt sich mit dem 1. Fickschen Gesetz beschreiben, sodass sich der Gesamtfluss ergibt als:

$$J = nKE - D\nabla n \quad (2.3)$$

Hier bezeichnet  $n$  die Teilchendichte, während  $D$  den Diffusionskoeffizienten darstellt. Diese zusätzliche Diffusionsbewegung veranlasst, dass beispielsweise eine  $\delta$ -förmige Ionenverteilung nach dem Durchlaufen einer Driftstrecke  $L$  in ein gaußförmiges Linienprofil der allgemeinen Form

$$n(x, t) = \frac{I}{2(\pi Dt)^{1/2}} \exp\left[\frac{-(x - x_0)^2}{4Dt}\right] \quad (2.4)$$

überführt wird [28]. Dabei beschreibt  $I$  die Anzahl der Ionen innerhalb eines Elements  $dx$ ,  $x_0$  entspricht dem Maximum der Verteilung. Als Konsequenz ergibt sich eine durch die Diffusion der Ionen limitierte Auflösung des Ionenmobilitätsexperiments. Unter

Vernachlässigung von Raumladungseffekten, Feldinhomogenitäten sowie Strömungseffekten des Puffergases beträgt die Auflösung R:

$$R = \frac{t}{\Delta t} = \sqrt{\frac{LEq}{16k_B T \ln 2}} \quad (2.5)$$

Demnach lässt sich mithilfe einer die Diffusion minimierenden möglichst kurzen Driftzeit die Auflösung maximieren, indem beispielsweise die Ziehspannung LE erhöht, die Temperatur T erniedrigt oder Ionen mit größerer Ladung betrachtet werden. Dennoch wird bei zu hoher Feldstärke die Mobilität feldabhängig, bei sehr tiefer Temperatur wird das Wechselwirkungspotential durch die attraktive Wechselwirkung zwischen der Ladung des Ions und dem polarisierbaren Puffergas beeinflusst (Langevin-Limit). Strukturinformationen erhält man, wenn die repulsive (Pauli)- Wechselwirkung zwischen Ionen und Puffergas überwiegt. Dann stellt die Ionenmobilität eine struktursensitive Größe dar. Die theoretische Berechnung der Ionenmobilität einer vorgegebenen Geometrie zum Zwecke der Strukturbestimmung erfolgt in der Regel indirekt über die Berechnung des Stoßquerschnitts  $\Omega$ . Es gilt folgender Zusammenhang im Grenzfall kleiner Felder:

$$K_0 = \frac{3}{16} \frac{q}{N_0} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_B T}} \frac{1}{\Omega} \quad (2.6)$$

$N_0$  bezeichnet die Teilchendichte,  $q$  die Ladung,  $\mu$  die reduzierte Masse zwischen Ion und Puffergas,  $T$  stellt die Temperatur dar. Werden die Atome als harte Kugeln betrachtet, so gleicht der Stoßquerschnitt vereinfacht einer gemittelten Querschnittsprojektion, die von dem jeweiligen Stoßgas abhängt. Zur Berechnung bestehen verschiedene Methoden.

### **2.1.2 Projektionsnäherung**

Die einfachste und am wenigsten rechenintensive Methode zur Berechnung von Stoßquerschnitten stellt die Projektionsnäherung dar. Im einfachsten Fall werden alle beteiligten Atome als harte Kugeln betrachtet, ihre Wechselwirkung ist von lediglich repulsiver Natur. Somit besitzt jedes Flächenelement auf der Oberfläche des Ions die gleiche Stoßwahrscheinlichkeit. Für eine bestimmte vorgegebene Struktur kann der gemittelte Stoßquerschnitt verschiedener Projektionen / Orientierungen (relativ zu einer Fläche) berechnet werden. Dieser setzt sich aus dem Querschnitt des Ions und des Puffergases zusammen. Dient zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Puffergas und dem Ion ein Wechselwirkungspotential, das zusätzlich attraktive Potentialterme beinhaltet, so kann eine höhere Genauigkeit erzielt werden.

Das in dieser Arbeit verwendete Modell zur Querschnittsberechnung „*Sigma*“ wurde in der Arbeitsgruppe von Michael T. Bowers entwickelt [29]. Der wesentliche Unterschied zur herkömmlichen Projektionsnäherung besteht in der Verwendung modifizierter Ion-Puffergas-Abstände anhand eines Lennard-Jones-Wechselwirkungspotentials:

$$V = 4\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2.7)$$

Dieses Potential setzt sich aus einem die Paulirepulsion einschließenden  $1/r^{12}$  abhängigen Term sowie einem die Dispersionswechselwirkung beinhaltenden  $1/r^6$  abhängigen Anteil zusammen. Nach der Berechnung der neuen Stoßabstände (Puffergas und Ion) wird eine zufällige Projektion des Ions in eine Ebene gelegt und ein Kreis unter Berücksichtigung der berechneten Stoßabstände um jedes Atom hinzugefügt. Durch willkürlich ausgewählte Punkte in der Ebene lässt sich der Stoßquerschnitt dieser Projektion berechnen. Dieser entspricht dem Produkt aus Flächeninhalt der Ebene und dem Verhältnis aus der Anzahl an Punkten innerhalb der Projektion und der Gesamtanzahl an Punkten. Diese Prozedur wird anhand verschiedener Projektionen so lange wiederholt, bis das Konvergenzkriterium (typischerweise 1-2 % Abweichung vom Mittelwert) erfüllt ist.

Für sphärische Teilchen stellt die Projektionsnäherung beispielsweise eine sehr genaue Methode zur Querschnittsberechnung dar. An Oberflächen mit konvexen Bereichen, die potentiell in Mehrfachstreuprozesse involviert sind, führt der Gebrauch dieser Näherung jedoch zu einer Unterschätzung des Stoßquerschnitts. Abhilfe schafft hier beispielsweise das EHSS (exact hard sphere scattering)-Modell [30].

## 2.2 Photoelektronenspektroskopie

Die Photoelektronenspektroskopie basiert auf dem von Albert Einstein erstmals korrekt beschriebenen photoelektrischen Effekt [31]. Werden Moleküle mit Licht bestimmter Wellenlänge bestrahlt, so kann es, sobald die Energie eines Photons die Bindungsenergie BE eines Elektrons übersteigt, zur Emission von Photoelektronen kommen. Es gilt folgende Gleichung:

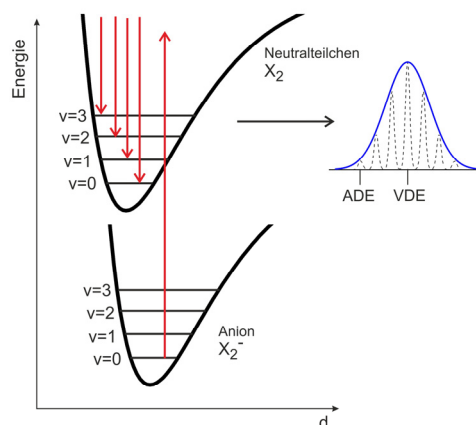
$$E_{\text{kin}} = h\nu - BE \quad (2.8)$$

Demnach wird gemäß der Energieerhaltung die Energie des eingestrahnten Photons  $h\nu$  zum Herauslösen der Elektronen aufgebracht, wobei die überschüssige Energie in kinetische Energie der Elektronen überführt wird. Infolgedessen dient die Photoelektronenspektroskopie zur Bestimmung der elektronischen Struktur eines Molekülsystems.

Getreu der Born-Oppenheimer-Näherung verläuft die Bewegung der Elektronen auf einer schnelleren Zeitskala als die Bewegung der Kerne. Daher können diese als unabhängig voneinander betrachtet bzw. separiert werden. Als Konsequenz findet der elektronische Übergang während des Detachmentprozesses in einer quasi festen Geometrie der Kerne statt. Ein elektronischer Übergang kann im Allgemeinen mithilfe des aus Fermis Goldener Regel abgeleiteten Franck-Condon-Prinzips beschrieben werden. Dieses besagt, dass die Übergangswahrscheinlichkeit  $P$  vom Quadrat des Überlappungsintegrals der Schwingungswellenfunktionen aus Anfangs- und Endzustand abhängt.

$$P \sim \langle \Psi_{v'} / \Psi_v \rangle^2 \quad (2.9)$$

In der Regel differieren diese beiden Zustände hinsichtlich ihrer Geometrie. Während bei neutralen Molekülen der Detachmentprozess meist mit einer Zunahme der mittleren Bindungslänge  $d$  einhergeht, zeigen Anionen typischerweise eine Abnahme der mittleren Atomabstände, was in Abbildung 1 anhand eines zweiatomigen Moleküls schematisch abgebildet ist. Findet die elektronische Anregung aus dem Schwingungsgrundzustand statt, bestehen daher gemäß dem Franck-Condon-Prinzip mit großer Wahrscheinlichkeit schwingungsangeregte Endzustände. Hierbei wird der intensivste Übergang als vertikal bezeichnet, seine zugehörige Energie als vertikale Detachmentenergie (VDE). Hingegen bleibt die Schwingungsquantenzahl bei einem adiabatischen Übergang konstant. Die erforderliche Energie wird adiabatische Detachmentenergie (ADE) genannt. Eine Auflösung der Schwingungsstruktur kann mit dem in dieser Arbeit verwendeten Photoelektronenspektrometer jedoch nicht realisiert werden. Daher wird die adiabatische Detachmentenergie durch Extrapolation einer Geraden an der ansteigenden Flanke der Einhüllenden des Spektrums bestimmt.

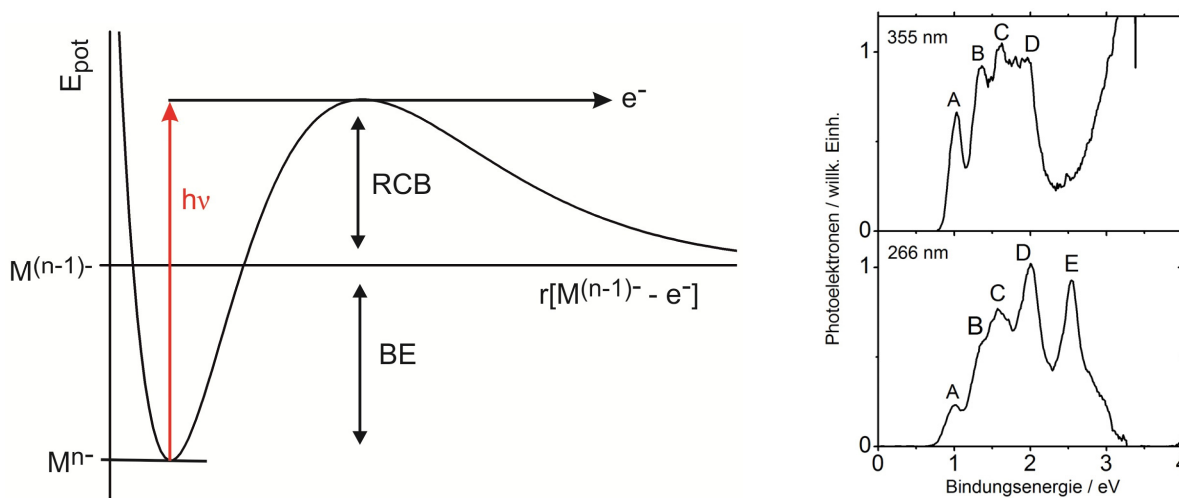


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Franck-Condon-Übergänge beim Photodetachmentprozess eines zweiatomigen Moleküls

Findet das Elektronendetachment aus einem angeregten Schwingungszustand statt, so können im PES Übergänge bei geringerer Energie als der adiabatischen erscheinen, wenn der Übergang simultan eine Abnahme der Schwingungsquantenzahl zur Folge hat. Solche Banden werden als „hot bands“ bezeichnet.

### 2.2.1 Repulsive Coulombbarriere in mehrfach geladenen Anionen

Der Photodetachmentprozess eines Monoanions führt zur Bildung eines Elektrons und eines Neutralteilchens. Zwischen diesen beiden Produkten existiert eine lediglich attraktive Wechselwirkung. Hingegen bewirkt der Detachmentprozess eines mehrfach geladenen Anions neben dem Austritt eines Elektrons die Bildung eines weiteren Anions. Zusätzlich dominiert nun eine langreichweitige repulsive Wechselwirkung, die als „repulsive Coulombbarriere“ (=RCB) bekannt ist und für das Photodetachmentexperiment weitgehende Konsequenzen mit sich bringt [32,33]. Zum Nachweis der Photoelektronen muss generell diese Barriere überwunden, d.h. diese Energie muss grundsätzlich additiv zur BE der Elektronen aufgebracht werden (siehe Abbildung 2). Tunnelemission durch diese Barriere kann ebenfalls beobachtet werden [34].

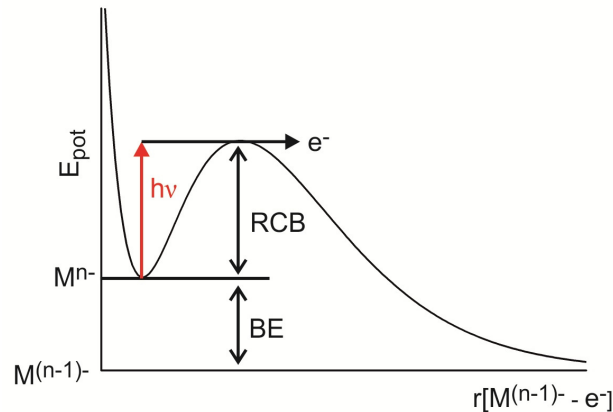


**Abbildung 2:** RCB schematisch (links), PES (rechts) von  $\text{IrBr}_6^{2-}$  bei 355 und 266 nm. Durch Betrachten der Übergänge bei größten Bindungsenergien lässt sich ein Minimal- bzw. Maximalwert der RCB abschätzen. Das Signal bei 3,3 eV im 355 nm-Spektrum entspricht einem Zweiphotonenübergang [35].

Zur Abschätzung dieser Barriere werden üblicherweise PES bei unterschiedlichen Detachmentwellenlängen betrachtet (siehe Abbildung 2), woraus direkt ein Maximal- bzw. Minimalwert abgelesen werden kann. Dies wird im Folgenden anhand des Dianions  $\text{IrBr}_6^{2-}$  erläutert. Unter Verwendung einer Detachmentwellenlänge von 266 nm (= 4,66 eV) werden fünf Übergänge A - E beobachtet. Bei 355 nm (=3,49 eV) fehlt der Übergang E (2,55 eV), obwohl die Photonenenergie immer noch fast 1 eV oberhalb liegt, also fast 1 eV über der BE der entsprechenden Elektronen. Folglich kann ein Minimalwert der RCB von 0,94 eV (=3,49

– 2,55) abgeschätzt werden. Andererseits kann aus der Präsenz von Peak D bei 1,95 V auf einen Maximalwert der RCB von 1,54 eV ( $=3,49 - 1,95$ ) geschlossen werden.

Eine weitere Konsequenz dieser Barriere besteht in der Gegenwart von Anionen mit metastabil gebundenen Elektronen, d.h. negativer Bindungsenergie. Energetisch betrachtet liegen sie höher als der vertikale Endzustand nach dem Detachmentprozess. Die so im Ion gespeicherte Energie wird während des Ablösens frei, sodass das erzeugte Elektron eine größere kinetische Energie besitzt als das eingestrahelte Photon [36] (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Potentialkurve eines metastabilen Multianions, der Endzustand  $M^{(n-1)-}$  liegt energetisch tiefer als das Ion  $M^n$ .

### 2.3 Molekulardynamik

Vor allem die Ionenmobilitätsspektrometrie stellt eine Methode dar, deren Informationsgehalt durch einen Vergleich experimenteller und theoretisch berechneter Stoßquerschnitte enorm gesteigert werden kann. Zur Berechnung dieser Stoßquerschnitte werden jedoch bereits die optimierten Koordinaten einer geeigneten Struktur benötigt. Zumal etablierte quantenmechanische Methoden wie beispielsweise die Dichtefunktionaltheorie zu Zeit- und Speicherplatz intensiv sind, außerdem eine einzelne Geometrieoptimierung zum Auffinden des globalen Minimums nicht genügt, findet die Beschreibung größerer Moleküle wie Proteinen bzw. die Suche nach dem globalen Minimum quasiklassisch mithilfe von Kraftfeldern statt. Eine weitere Problematik besteht in der typischerweise aus vielen lokalen Minima aufgebauten komplexen Potentialhyperfläche. Die Suche nach dem globalen Minimum stellt daher eine große Herausforderung dar und geschieht in der Regel durch die Simulation der Molekulardynamik.

Die Bewegungsgleichung für ein Atom  $i$  lautet:

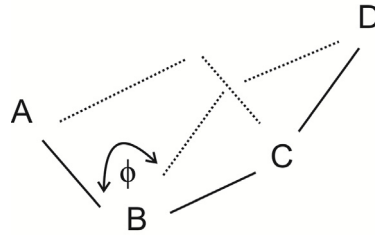
$$F_i = ma_i = m \frac{d^2 r_i}{dt^2} = - \frac{dV(r_i)}{dr_i} = -\nabla V \quad (2.10)$$

$V$  ist die potentielle Energie des Systems als Funktion aller Koordinaten und ergibt sich aus der jeweiligen verwendeten Kraftfeldmethode. Das in dieser Arbeit relevante Kraftfeld *ff99*, das im Programm *Amber 7* [37] implementiert ist, hat im Allgemeinen die folgende Form:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{\text{Bindungen}} k_r^r (r_i - r_{i0})^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{Winkel}} k_r^\theta (\theta - \theta_{i0})^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{Dihedralwinkel}} k_\phi (1 + \cos(n\phi - \delta))$$

$$+ \sum_i^n \sum_{j,j>i}^n 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_i^n \sum_{j,j>i}^n \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$
(2.11)

Hier beschreiben die drei ersten Terme die Auslenkung der Atome aus ihrer Gleichgewichtslage.  $\Phi$  beschreibt den Dihedralwinkel, der als Winkel zwischen den Ebenen ABC und BCD einer Anordnung vier nacheinander folgender Atome ABCD definiert ist (siehe Abbildung 4).  $n$  gleicht der Anzahl an lokalen Minima bei einer Rotation der Molekülbindung BC um  $360^\circ$ . Involviert werden außerdem van der Waals- sowie Coulombwechselwirkung.



**Abbildung 4:** Dihedralwinkel  $\Phi$  zur Beschreibung der Torsion einer Molekülbindung BC

Durch Integration der Bewegungsgleichung können die Koordinaten des Systems zu jedem Zeitpunkt berechnet werden, wozu unter anderem der *Verlet*-Algorithmus dienen kann [38]. Die Position  $r_i(t+\Delta t)$  des Atoms  $i$  zum Zeitpunkt  $(t+\Delta t)$  lässt sich mithilfe einer Taylorentwicklung schreiben als:

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \frac{dr_i}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 r_i}{dt^2} (\Delta t)^2 + \frac{1}{6} \frac{d^3 r_i}{dt^3} (\Delta t)^3 + O(\Delta t)^4$$
(2.12)

Andererseits ergibt sich der Ort  $r_i(t-\Delta t)$  zum Zeitpunkt  $(t-\Delta t)$  zu:

$$r_i(t - \Delta t) = r_i(t) - \frac{dr_i}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 r_i}{dt^2} (\Delta t)^2 - \frac{1}{6} \frac{d^3 r_i}{dt^3} (\Delta t)^3 + O(\Delta t)^4$$
(2.13)

Addition beider Gleichungen führt zu:

$$r_i(t + \Delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{d^2 r_i}{dt^2} (\Delta t)^2 + O(\Delta t)^4$$
(2.14)

Nach Kombination mit Gleichung (2.10) erhält man ohne Berücksichtigung des Terms 4. Ordnung, der zur Abschätzung des Fehlers herangezogen werden kann, folgenden Ausdruck:



$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) - \frac{\nabla V(\mathbf{r})}{m}(\Delta t)^2 \quad (2.15)$$

Infolgedessen lässt sich nach dem Verlet-Algorithmus aus dem Potentialgradienten sowie den momentanen bzw. den ursprünglichen Koordinaten das System zum Zeitpunkt  $(t + \Delta t)$  entwickeln. Eine Problematik besteht in der fehlenden Berechnung der Geschwindigkeiten, die zur Ermittlung der kinetischen Energie zum Zeitpunkt  $t$  unerlässlich sind. Abhilfe schafft der *leap frog*-Algorithmus, mit dessen Hilfe aus der Berechnung der Geschwindigkeiten  $\mathbf{v}_i$  zum Zeitpunkt  $(t + \frac{1}{2}\Delta t)$  die Koordinaten zur Zeit  $(t + \Delta t)$  entwickelt werden. Mit der Beschleunigung  $\mathbf{a}_i(t)$  gilt:

$$\mathbf{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \mathbf{v}_i\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \mathbf{a}_i(t)\Delta t \quad (2.16)$$

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right)\Delta t \quad (2.17)$$

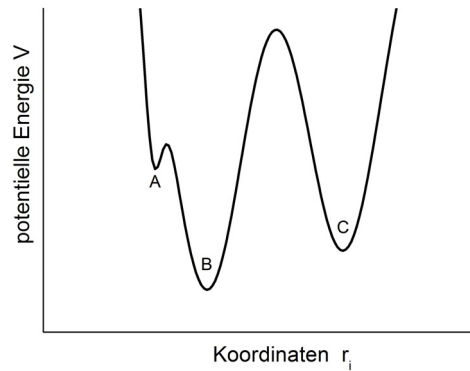
Die Berechnung der kinetischen Energie bzw. die Geschwindigkeitskontrolle erfolgt dann aus dem Mittelwert von  $(\mathbf{v}_i + \frac{1}{2}\Delta t)$  bzw.  $(\mathbf{v}_i - \frac{1}{2}\Delta t)$  über:

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{1}{2}\left[\mathbf{v}_i\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \mathbf{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right)\right] \quad (2.18)$$

Der *leap frog*-Algorithmus erzielt eine ähnliche Genauigkeit wie der Verlet-Algorithmus und ist unter anderem im *sander*-Modul von Amber 7.0 implementiert.

### 2.3.1 Simulated Annealing

Soll mithilfe einer Molekulardynamiksimulation eine bestimmte Verteilung an Konformationen bei einer bestimmten Temperatur  $T$  berechnet werden, so kann je nach Beschaffenheit der Potentialfläche eine lange und damit rechenzeitintensive Simulation von Nöten sein. Zur Demonstration dient Abbildung 5, in der eine hypothetische Potentialfläche eines Systems als Funktion seiner Koordinaten gegeben ist. Ein generelles Problem stellt die große Potentialbarriere zwischen den fast energiegleichen Zuständen B und C dar. Zur Erfassung aller Zustände hätte eine Simulation bei Raumtemperatur eine dementsprechend lange Rechenzeit zur Folge. Eine genaue Kenntnis der Molekulardynamik ist zur Vorhersage bestimmter Konformationen bei einer gegebenen Temperatur jedoch nicht zwingend notwendig. Aus diesem Grund wird oftmals eine abwechselnde Prozedur aus Heizen und Abkühlen des Zielmoleküls vorgenommen. Hierbei bewirkt das Heizen eine Überbrückung der Potentialbarrieren, während andererseits Kühlen bzw. sukzessive Entnahme an kinetischer Energie im Anschluss der Suche eines lokalen Minimums dient. Daher können unter anderem energetisch höher liegende Zustände wie beispielsweise C erfasst werden.



**Abbildung 5:** Hypothetische Potentialfläche eines Systems als Funktion aller Koordinaten  $r_i$

## 2.4 Hartree-Fock-Methode

Sollen aus den mithilfe einer Molekulardynamiksimulation erzeugten geometrieoptimierten Strukturen Informationen über ihre elektronische Zustandsdichte erhalten werden, die zur Interpretation der aufgenommenen PES dient, so sind hierzu quantenchemische Rechnungen notwendig.

Der Hamiltonoperator eines Atoms aus  $N$  Elektronen lautet:

$$H = -\sum_{i=1}^N \frac{\hbar^2}{2m} \Delta_i - \sum_{i=1}^N \frac{Ze^2}{r_i} + \sum_{i=1}^N \sum_{\substack{j=1 \\ j>i}}^N \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (2.19)$$

Er besteht aus der kinetischen Energie der Elektronen, Kern-Elektron-Anziehung sowie Elektron-Elektron-Abstoßung. Die Wellenfunktion kann unter Beachtung des Pauliprinzips mithilfe einer Slaterdeterminante ausgedrückt werden.

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \psi_1(1) & \psi_1(2) & \dots & \psi_1(N) \\ \psi_2(1) & \psi_2(2) & \dots & \psi_2(N) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \psi_N(1) & \psi_N(2) & \dots & \psi_N(N) \end{vmatrix} \quad (2.20)$$

Die Spinorbitale  $\psi$  stellen dabei ein Produkt aus einer Ortsfunktion und einer Spinfunktion dar. Die Durchführung einer Variationsrechnung liefert zum Erhalten einer bestmöglichen Grundzustandsenergie die Hartree-Fock-Gleichung:

$$\left[ h(i) + \sum_{l=1}^N (J_l(i) - K_l(i)) \right] \psi_k(i) = \epsilon_k \psi_k(i) \quad (2.21)$$

$h(i)$  erfüllt einen Eielektronenoperator, der sich aus kinetischer Energie und potentieller Energie im Kernfeld zusammensetzt.  $J_l(i)$  und  $K_l(i)$  stellen die Coulomb- bzw. Austauschoperatoren dar und schließen unter anderem bereits die Spinorbitale ein, die sich als Lösungen der Fockgleichung ergeben. Demzufolge geschieht die Lösung der Gleichung

iterativ, d.h. die Spinorbitale werden so lange variiert, bis die Energie konvergiert bzw. die Spinorbitale selbst konvergieren [39].

### 2.4.1 Koopmans-Theorem

Unter Berücksichtigung des Hartree-Fock-Formalismus erhält man für die Gesamtenergie  $E$  des Systems, wobei  $\varepsilon_k$  den Orbitalenergien entspricht:

$$E = \sum_{k=1}^N \varepsilon_k - \frac{1}{2} \sum_{k=1}^N \sum_{\substack{l=1 \\ l \neq k}}^N (J_{kl} - K_{kl}) \quad (2.22)$$

Entfernt man aus einem Spinorbital ein Elektron und betrachtet die Differenz aus  $N$ -Elektronensystem und dem gebildeten Ion, so erhält man einen vor allem für die Photoelektronenspektroskopie einflussreichen Zusammenhang zwischen Ionisationspotential (=IP) und Orbitalenergie, der als Koopmans' Theorem [40] bekannt ist.

$$E_{\text{Ion}} - E = -\varepsilon_n \quad (2.23)$$

Demnach entspricht die Ionisierungsenergie der negativen Orbitalenergie. Die Reorganisierung der Elektronen auf der Zeitskala des Photodetachmentprozesses wird nicht erfasst. Daher werden die Ionisationspotentiale stets zu niedrig abgeschätzt. Eine weitere Fehlerquelle besteht in der unberücksichtigten Elektronenkorrelation.

## 2.5 Semiempirische Methoden

Für den Wechsel von Atomen zu Molekülen stellt der LCAO (linear combination of atomic orbitals)-Ansatz eine erfolgreiche Methode zur Bildung von Molekülorbitalen  $\Phi$  (MO) mittels Linearkombinationen von Atomorbitalen  $\chi$  dar:

$$\phi_n(i) = \sum_{\mu=1}^M c_{n\mu} \chi_{\mu}(i) \quad (2.24)$$

Unter Verwendung dieses Ansatzes erhält man die Roothan-Hall-Gleichungen in der Matrixschreibweise:

$$FC = SC\varepsilon \quad (2.25)$$

$S$  und  $C$  sind Matrizen, die Überlappungsintegrale bzw. die Koeffizienten  $c$  enthalten.  $F$  entspricht der Fockmatrix und enthält unter anderem Zweielektronenintegrale, die aus bis zu vier verschiedenen Basisfunktionen gebildet werden. Bei einem  $N$ -Elektronensystem entwickelt sich daher der Rechenaufwand mit  $N^4$  und nimmt demzufolge schon für vergleichsweise kleine Systeme große Werte an. Bestimmte Integralnäherungen unter Anwendung von *semiempirischen Methoden* können den Rechenaufwand entscheidend minimieren.

Im Falle der *ZDO* (*zero differential overlap*)-Näherung werden Überlappungsintegrale aus unterschiedlichen Atomorbitalen vernachlässigt, sodass die Drei- und Vierzentrenintegrale der Fockmatrix verschwinden. Als weniger schwerwiegend können die im Rahmen des NDDO (*neglect of diatomic differential overlap*)-Verfahrens vorgenommenen Änderungen begriffen werden, bei welchem lediglich unterschiedliche Atomorbitale bezogen auf ungleiche Zentren von der Rechnung ausgeschlossen werden. Fehler werden durch die Anpassung an experimentelle Größen wie beispielsweise die Elektronenaffinität kompensiert. Für biologisch relevante Systeme haben sich vor allem auf der NDDO-Näherung basierende modifizierte Methoden wie beispielsweise AM1 [41] oder das in dieser Arbeit verwendete PM6 [42] bewährt.

### 3 Experimenteller Aufbau

Die Aufnahme isomeren- bzw. konformerenaufgelöster Photoelektronenspektren massenselektierter Multianionen benötigt im Wesentlichen die folgenden Komponenten: Eine Ionenquelle, eine Driftzelle zur Selektion nach dem Stoßquerschnitt (der Ionen), ein Massenspektrometer zur Auftrennung nach dem Masse zu Ladungsverhältnis sowie ein Photoelektronenspektrometer. Der exakte Aufbau ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt [13,43].

Als Ionenquelle dient eine Elektrosprayquelle. Die dabei gebildeten Ionen gelangen durch eine Metallkapillare in einen von einer Drehschieberpumpe ( $65 \text{ m}^3/\text{h}$ , Leybold) evakuierten Raum (1 mbar), wo sie mithilfe eines Uhrglasionentrichters fokussiert und gespeichert werden. Die Akkumulation und anschließende Injektion in die Driftzelle (2-4 mbar) wird über eine als Netz aufgebaute Elektrode gesteuert („*Ion Gate*“). Nach der zeitlichen Trennung der Ionen gemäß ihrem Stoßquerschnitt gewährleistet ein Endtrichter den Transfer der Ionen in die darauf folgende differentielle Pumpstufe. Hierbei wird der folgende Bereich mit einer Wälzkolbenpumpe ( $505 \text{ m}^3/\text{h}$ , Leybold) abgepumpt ( $10^{-2}$  mbar). Nach dem Passieren eines Führungsquadrupols vollzieht sich die Trennung vom Neutralstrahl in einem von einer Diffusionspumpe (3000 l/s, Leybold) evakuierten Umlenker ( $10^{-4}$  mbar). Zur Separierung der Ionen nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis kommt ein Quadrupolmassenfilter (Extrel) zum Einsatz. Ein Linsensystem zur Refokussierung der Ionen arrangiert eine ausdrücklich größere räumliche Überlappung der Ionen mit dem typischerweise 3 mm breiten Strahlprofil eines Nd:YAG-Lasers in der folgenden Detachmentkammer eines Flugzeitphotoelektronenspektrometers. Die Detektion der Ionen geschieht mit einem Channeltron, während zum Nachweis der erzeugten Photoelektronen *multi channel plates* (MCP) verwendet werden. Der für die Photoelektronenspektroskopie benötigte Druck von weniger als  $10^{-6}$  mbar wird von einer Turbomolekularpumpe (230 l/s, Leybold) aufrecht erhalten und von einer Ionisationsmessröhre kontrolliert. Zur Messung des Drucks innerhalb der Driftzelle dient ein Baratron, das eine Genauigkeit von 0,15 % besitzt. Die Einspeisung der benötigten Spannungen erfolgt über eine 24polige Hochspannungsversorgung. Mit einem Gaseinlassventil am Ende der Zelle lässt sich die Zelle mit dem zur Separation essentiellen Inertgas (typischerweise Helium oder Stickstoff) füllen.

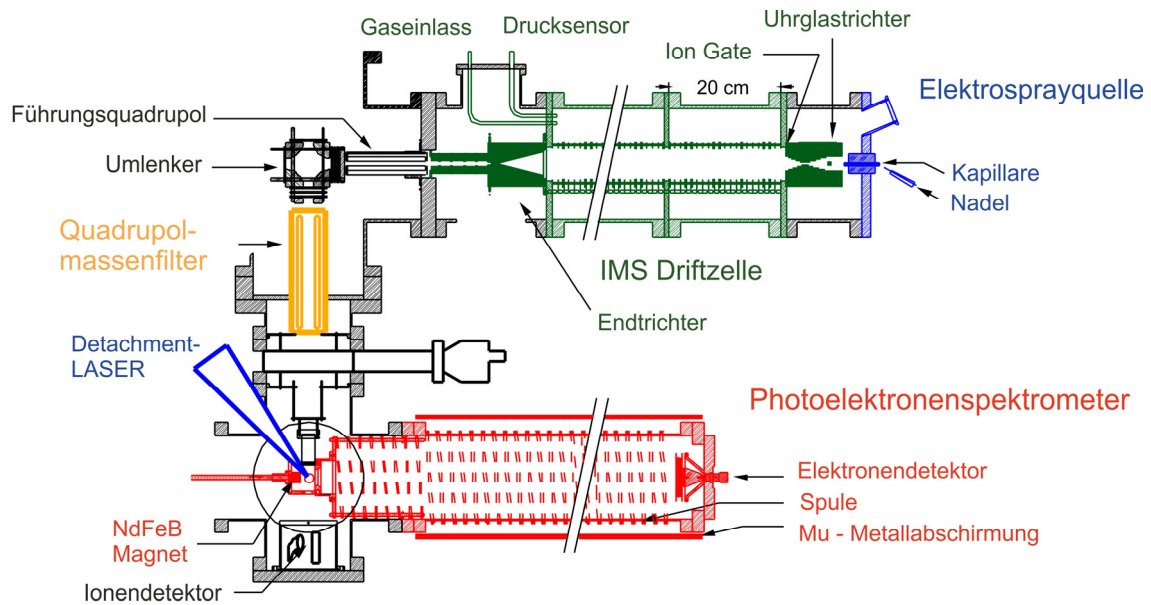


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Anlage

### 3.1 Elektrospray-Ionisierung

Die Elektrospray-Ionisierung stellt eine besonders schonende Methode dar, Ionen aus einer Flüssigkeit in die Gasphase zu überführen. Für die Entwicklung dieser Ionisationsmethode wurde der Erfinder John B. Fenn 2002 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [1]. Sie findet in besonderem Maße Anwendung für biologische Systeme, wie beispielsweise Proteine und Oligonukleotide / DNA [44].

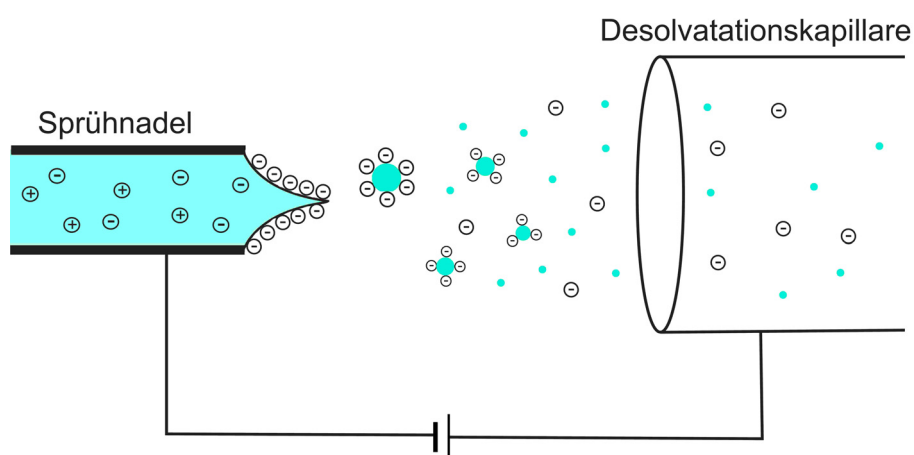
Die Elektrosprayionisierung beruht auf der Desolvatation gelöster Analytmoleküle. Hierzu wird die Analytlösung durch eine enge Kapillare gepumpt und eine elektrische Spannung von einigen Kilovolt zwischen der Kapillare und einer gegenüberliegenden Elektrode im Abstand von typischerweise einigen Millimetern angelegt (sodass elektrische Felder im Bereich von einigen  $10^3$  V/cm entstehen). Die enormen elektrischen Felder bewirken eine Anreicherung von Ionen an der Flüssigkeitsoberfläche. Dies führt zu der Ausbildung eines konisch geformten Meniskus, dem sog. Taylorkonus. Erreicht die elektrische Feldstärke einen kritischen Wert, so treten geladene Flüssigkeitströpfchen aus dem Taylorkonus aus.

Durch Verdampfen des Lösungsmittels auf dem Weg zur Gegenelektrode kommt es zu einer stetigen Zunahme der Oberflächenladungsdichte der Flüssigkeitströpfchen. Ab einer kritischen Ladung kann die Oberflächenspannung des Tröpfchens die Coulombabstoßung der involvierten Ionen nicht mehr kompensieren. Es kommt zur sog. Coulombexplosion, bei der die hochgeladenen Tröpfchen in kleinere, weniger geladene Tröpfchen zerfallen. Dies ist als Rayleighlimit bekannt und erfüllt, sobald:

$$q = \sqrt{8\pi^2 \epsilon_0 \gamma d^3} \quad (3.1)$$

$q$  bezeichnet die Ladung,  $\epsilon_0$  die Permittivität des Vakuums,  $d$  und  $\gamma$  entsprechen dem Durchmesser bzw. der Oberflächenspannung des Tröpfchens.

Die finale Bildung der Ionen aus den Flüssigkeitströpfchen kann anhand zwei verschiedener Modelle geschildert werden. Im Falle des *charge residue model* (CRM) hält der Zerfall der Tröpfchen solange an, bis alle Lösungsmittelmoleküle verdampft sind und nur noch das desolvatisierte Ion vorliegt [45]. Dieser Mechanismus wird üblicherweise zur Beschreibung des Sprühprozesses von Proteinen postuliert, bei welchen die Bildung von Oligomeren angesichts der Anwesenheit mehrerer Proteinmoleküle im finalen Tröpfchen beobachtet werden kann [46]. Hingegen verläuft das Verdampfen von einzelnen Ionen aus Salzlösungen vermutlich nach einem konkurrierenden Prozess. Werden hinreichend große elektrische Felder von etwa  $10^9$  V/cm während des Verdampfens erzielt, kann eine Emission der Ionen direkt von der Oberfläche der Tröpfchen stattfinden (*ion evaporation*). Dies tritt typischerweise bei einer Größe von 10 nm auf [47].



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Elektrosprayionisierung

Die während dieser Arbeit verwendete Elektrosprayquelle besteht aus einer Edelnadel mit einem Innendurchmesser von 0,1 mm und einer beheizbaren, 70 mm langen Edelnadelkapillare (Innendurchmesser: 0,1 mm) im Abstand von etwa einem Zentimeter und einem Winkel von  $120^\circ$  zueinander. Zur Verdampfung der Ionen wird die Analytlösung mithilfe einer Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 0,05 – 0,10 mL pro Stunde durch die Nadel gepumpt und zwischen Nadel und Kapillare eine Spannung von 2,5 bis 3,0 kV angelegt. Gelegentlich konnte die Signalstabilität durch zusätzliches Zerstäuben der Analytlösung mit dem Inertgas Stickstoff verbessert werden.

### 3.2 Driftzelle mit Ionentrichtern

Eine Driftzelle gestattet die Separation der Ionen nach ihrem Stoßquerschnitt. Zur Erzeugung von großen Ionenströmen, die eine weitere spektroskopische Untersuchung der massen- und

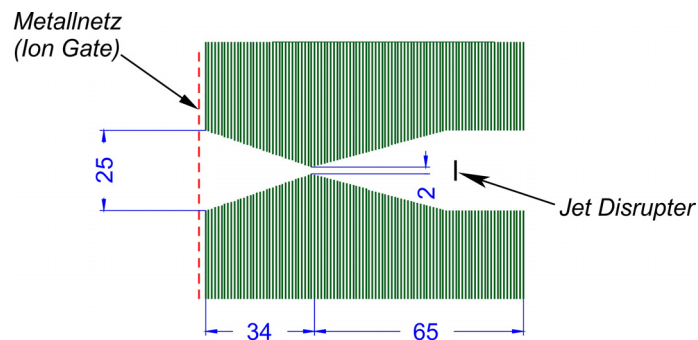
konformerenselektierten Ionen verwirklichen, sind Ionentrichter am Ein- sowie am Ausgang der Driftzelle von entscheidender Relevanz. Die hier verwendete Driftzelle erfüllt generell einen Nachbau der von der Arbeitsgruppe D. Smith entwickelten Zelle mit einem Uhrglastrichter am Eingang sowie einem Endtrichter an deren Ausgang [12].

Die Einführung des Ionentrichters 1997 ersetzte in vielen Fällen den Einsatz eines Skimmers zur Überführung von Ionen in die verschiedenen differentiellen Pumpstufen konventioneller Geräte im Druckbereich von einigen Millibar. Üblicherweise besteht er aus einer Anordnung zylindrischer Elektroden, deren Innenradien nacheinander konvergieren [48]. Eine Gleichspannung entlang dessen Hauptachse bewirkt den Transfer in die angrenzende Pumpstufe. Zusätzlich führt eine um  $180^\circ$  phasenverschobene, zwischen benachbarten Elektroden alternierende Radiofrequenzwechselspannung zur Erzeugung eines sog. Pseudopotentials, das die Ionen effektiv auf die Hauptachse des Trichters zwingt und somit den Transfer mit einer Effizienz von nahezu 100 % in die nächste Pumpstufe garantiert. Der Vergleich experimenteller Befunde der Arbeitsgruppe Smith mit berechneten Trajektorien unter Anwendung des Programms Simion geschah erstmals 2000 [49].

Der in dieser Arbeit eingesetzte Ionentrichter am Eingang der Driftzelle (siehe Abbildung 8) lässt sich in zwei verschiedene Bereiche gliedern. Der erste Teil besteht aus 16 0,5 mm dicken Elektroden gleich bleibenden Innendurchmessers, gefolgt von 47 Elektroden, deren Innendurchmesser sukzessive auf finale 2 mm konvergieren. Ein Plättchen mit einem Durchmesser von 6 mm („*Jet Disrupter*“), das am vorderen Teil des Trichters auf dessen Hauptachse bzw. direkt einige Millimeter hinter der Desolvationskapillare der Elektrosprayquelle angebracht ist, hat eine zusätzliche Zerstäubung des neutralen Gasstroms zur Folge und verringert dessen Transfer in die benachbarte Pumpstufe. Das separat eingespeiste DC-Potential hingegen wird so eingestellt, dass die Ionen um den Jet Disrupter herum gelenkt werden. Im Gegensatz zu einem Aufbau ohne Jet Disrupter ist von Sensitivitätszunahmen berichtet worden [50,51]. Der zweite Bereich des Uhrglastrichters besteht aus 35 Elektroden, deren Innendurchmesser auf 20 mm ansteigen. In dieser Zone erfolgt die Akkumulation der Ionen vor der Injektion in die direkt anschließende Driftzelle. Zur Überführung der Ionen in die Driftzelle wird ein hochtransmittierendes Nickelnetz („*Ion Gate*“) am Ausgang des Trichters verwendet. Zur Speicherung der Ionen wird dieses Netz mit einem relativ zur allerletzten Trichterelektrode großen Potential („*Ion Gate High*“) versorgt. Der zur Injektion eingesetzte Spannungspuls von  $50 \mu\text{s}$  bei einer Frequenz von 15 Hz sorgt für eine Reduktion dieses Potentials („*Ion Gate Low*“), sodass die Ionen in die Richtung des Driftzelleneingangs beschleunigt werden. Wird „*Ion Gate High*“ auf einem zur Speicherung

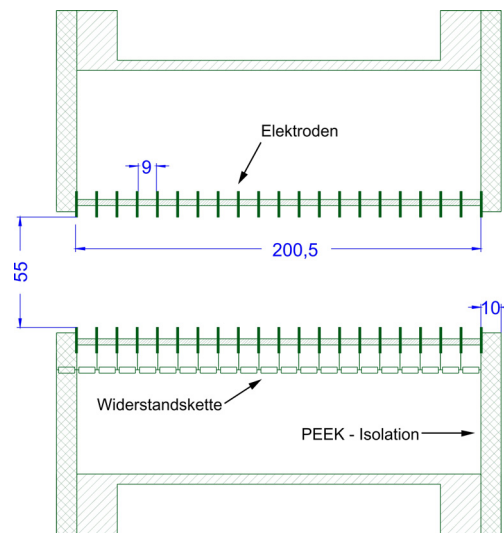


der Ionen zu geringen Potential betrieben, so kann aus dem Vergleich des kontinuierlichen Ionenstroms mit dem gepulsten Paket eine Effizienz zur Speicherung bzw. Injektion der Ionen ermittelt werden. Sie beträgt in etwa 45 %.



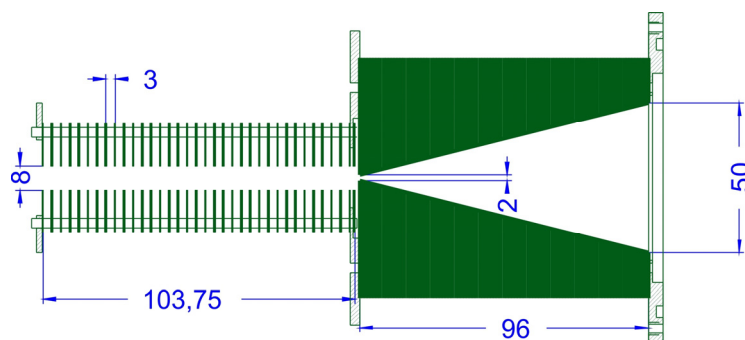
**Abbildung 8:** Uhrglastrichter, Maßeinheiten sind in mm

Die diesem Ionentrichter angrenzende Driftzelle (Abbildung 9) ist aus maximal 6 20 cm langen Einheiten aufgebaut. Diese werden von 1 cm dicken PEEK-Scheiben (Polyetheretherketon) voneinander isoliert. Jede Einheit besteht wiederum aus 21 1 mm dicken, vernickelten Messingelektroden mit einem Innendurchmesser von 55 mm. Der Abstand zwischen den Elektroden beträgt 9 mm. Eine Widerstandskette von jeweils 1 M $\Omega$  zwischen benachbarten Elektroden erzeugt ein möglichst lineares homogenes elektrisches Feld. Übergriffe elektrischer Felder der benachbarten Ionentrichter lassen sich mit Nickelnetzen abwenden. Wird Helium als Puffergas genutzt, ist die maximal nutzbare Feldstärke durch dessen Spannungsfestigkeit limitiert. Zur zeitlichen Auftrennung der Ionen nach ihrem Stoßquerschnitt werden dann typischerweise elektrische Felder im Bereich von 10 V/cm bei einem Druck von 2 - 3 mbar erzeugt. Wird lediglich die von der Desolvationskapillare einströmende Luft oder über ein Gasventil zusätzlich zugeführter Stickstoff zur zeitlichen Trennung verwendet, kommen üblicherweise Felder von 30 V/cm oder mehr zum Einsatz. Mithilfe einer Simionsimulation konnte belegt werden, dass sogar bei einer Driftstrecke von 120 cm mit einer wie in dieser Arbeit verwendeten Eintrittsöffnung von 20 cm der Verlust an Ionen vernachlässigbar klein ist, sodass die Transmission nahezu 100 % beträgt [13]. Es kommt lediglich zu einem minimalen Auseinanderlaufen senkrecht zur Hauptachse, was eine erneute Fokussierung der Ionen unumgänglich macht.



**Abbildung 9:** Aufbau einer Einheit der Driftzelle, Maßeinheiten sind in mm

Der zu diesem Zweck eingesetzte Endtrichter (Abbildung 10) lässt sich in zwei verschiedene Bereiche unterteilen. Der erste Teil umfasst 97 0,5 mm dicke Elektroden, deren Innendurchmesser sich kontinuierlich von 50 auf 2 mm verkleinern. 0,5 mm dicke Teflonscheiben gewährleisten deren elektrische Isolation. Ferner lassen sich die zwei allerletzten Elektroden des vorderen Bereichs mit separaten DC-Spannungen versorgen. Somit bedingt das im Vergleich zum Rest normalerweise leicht vergrößerte DC-Potential, das die Ionen in die nächste differentielle Pumpstufe führt, eine Einschränkung von Speichereffekten im Bereich kleiner Elektrodendurchmesser. Dies trägt entscheidend zum Auflösungsvermögen der Anlage bei. Der zweite Teil des Trichters besteht aus 70 1 mm dicken Elektroden (Innendurchmesser: 8 mm), die von 0,5 mm dicken Teflonringen voneinander isoliert sind. Mithilfe dieses offenen Aufbaus kann bereits ein Großteil der aus der Driftzelle anfallenden Gaslast abgepumpt werden.



**Abbildung 10:** Aufbau des Endtrichters, Maßeinheiten sind in mm

### 3.3 Führungsquadrupol und Umlenker

Unter Verwendung eines Führungsquadrupols im Druckbereich von  $10^{-2}$  mbar geschieht der Transfer der Ionen vom Endtrichter in die nächste differentielle Pumpstufe. Er transmittiert

ein breites Spektrum verschiedener Masse zu Ladungsverhältnissen. Die Beschreibung der Funktionsweise eines Quadrupols im Allgemeinen erfolgt in Kapitel 3.4. Fokussierende Edelstahlinsen an dessen Ein- bzw. Ausgang unterstützen seine hohe Transmission. Die Separation der Ionen vom restlichen neutralen Gasstrom aus der Driftzelle erfolgt im angrenzenden Umlenker. Vier hyperbolisch geformte Elektroden aus Edelstahl erzeugen ein perfektes Quadrupolfeld. Je nach kinetischer Energie des ankommenden Ions wird dessen Flugbahn um einen bestimmten Winkel geändert. Hierbei werden dessen Potentiale so variiert, dass dieser exakt 90° beträgt [52]. Ein spezielles in der Arbeitsgruppe entwickeltes Linsensystem sowie Ablenker in x- bzw. y- Richtung sorgen zudem für einen besonders effizienten Übergang in den Quadrupolmassenfilter.

### 3.4 Quadrupolmassenfilter

Im Quadrupolmassenfilter vollzieht sich die Separation der Ionen nach ihrem jeweiligen Masse zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ). Er besteht aus 4 zylindrischen Elektroden, die quadratisch angeordnet sind. Auf gegenüberliegende Elektroden wird dasselbe Potential eingestellt, das aus einer Gleichspannung  $U$  und einer Wechselspannung  $V$  mit der Frequenz  $\omega$  zusammengesetzt ist. Benachbarte Elektroden liegen auf entgegengesetztem Potential (siehe Abbildung 11).

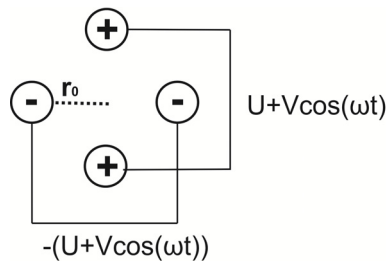


Abbildung 11 Schaltung eines Quadrupolmassenfilters

Somit ergeben sich die folgenden Bewegungsgleichungen:

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{ze}{mr_0^2}(U + V \cos \omega t)x = 0 \quad (3.2)$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} - \frac{ze}{mr_0^2}(U + V \cos \omega t)y = 0 \quad (3.3)$$

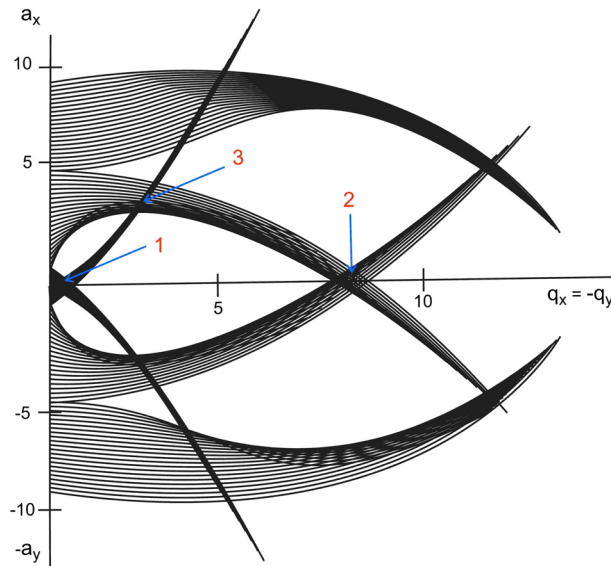
Nach Einführen der Parameter  $a$  und  $q$  erhält man die dimensionslosen Bewegungsgleichungen (Mathieugleichungen):

$$\frac{d^2x}{d\tau^2} + (a_x + 2q_x \cos 2\tau)x = 0 \quad (3.4)$$

$$\frac{d^2y}{d\tau^2} + (a_y + 2q_y \cos 2\tau)y = 0 \quad (3.5)$$

wobei:  $a_x = -a_y = \frac{4zeU}{mr_0^2\omega^2}$ ,  $q_x = -q_y = \frac{2zeV}{mr_0^2\omega^2}$ ,  $\tau = \frac{\omega t}{2}$

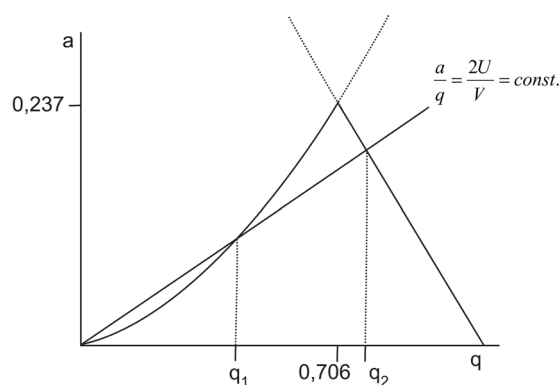
Für bestimmte Werte von U, V und  $\omega$  ergeben sich für ein Ion mit bestimmtem Masse zu Ladungsverhältnis m/z Trajektorien, bei denen die maximale Abweichung von der Zentralachse innerhalb des Quadrupols weniger als  $r_0$  beträgt, woraus sich eine stabile Flugbahn ergibt. Infolgedessen werden diese Ionen transmittiert. Andererseits treffen Ionen mit wesentlich unterschiedlichem m/z auf die Elektroden und werden entladen. Trägt man die Parameter a und q in einem Diagramm gegeneinander auf, so erhält man das Stabilitätsdiagramm des Quadrupolmassenfilters [53,54].



**Abbildung 12:** Stabilitätsdiagramm eines Quadrupolmassenfilters

Hierbei entspricht jeder Punkt einer stabilen Trajektorie in entweder x- oder y- Richtung. Zudem existieren Bereiche (1-3), die einer stabilen Flugbahn der Ionen sowohl in x- also auch in y- Richtung genügen. Der generell bedeutungsvollste Bereich des Massenfilters stellt Ausschnitt 1 dar. Er ist in Abbildung 13 vergrößert dargestellt. Wird eine Gerade mit der Steigung  $a/q$  durch diesen Stabilitätsbereich gelegt, dann kann die Verteilung (m/z-Bereich) der Ionen erfasst werden, die stabile Bahnen innerhalb des Quadrupols besitzen. Die maximale Auflösung des Filters kann erzielt werden, wenn Gleich- und Wechselspannung sowie Frequenz des Wechselfelds so gewählt werden, dass a und q Beträge von 0,237 bzw. 0,706 erfüllen (siehe Abbildung 13). Wird die Gleichspannung gleich null gewählt, so ergibt sich eine breite Verteilung an verschiedenen Masse zu Ladungsverhältnissen, die transmittiert

werden, sodass der Quadrupol im Allgemeinen nur noch zur effizienten Überführung verschiedener  $m/z$ -Verhältnisse dienen kann (siehe Kapitel 3.3).

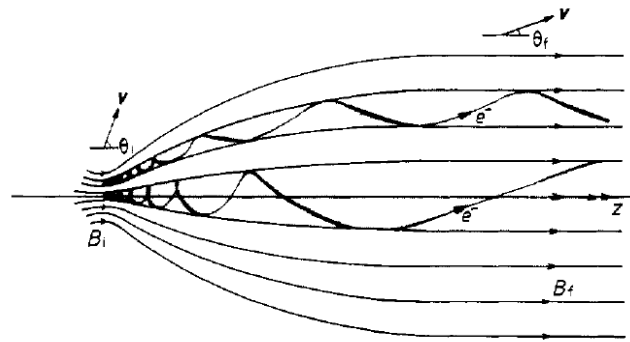


**Abbildung 13:** Vergrößerter Bereich I des Stabilitätsdiagramms, siehe Abbildung 12

In der Regel arbeiten Quadrupolmassenfilter bei konstanter Frequenz der Wechselspannung und variabler Gleich- und Wechselspannungsamplitude. Demnach wird zur Aufnahme von Massenspektren die Gleich- bzw. Wechselspannung kontinuierlich verändert und das Signal als deren Funktion erfasst. Die Anwendung als reiner Massenfilter erfolgt je nach erwünschter Auflösung bzw. Transmission bei konstanter Gleich- bzw. Wechselspannung. Die Frequenz des hier verwendeten Quadrupols (Extrel, Modell 150-QC) beträgt 0,88 MHz. Es kann ein maximales Masse zu Ladungsverhältnis von 4000 amu/C erzielt werden.

### 3.5 Photoelektronenspektrometer

Das in dieser Arbeit verwendete Photoelektronenspektrometer entspricht einem Flugzeitphotoelektronenspektrometer des Typs „magnetische Flasche“ und wurde erstmals von Kruit und Read vorgestellt [55]. Es basiert auf der Bestimmung der Flugzeit eines Elektrons mit bestimmter kinetischer Energie innerhalb einer gewissen Wegstrecke  $L$ . Je weiter der Detektor von der Detachmentregion entfernt ist, umso weniger Elektronen werden nachgewiesen. Aus diesem Grund wird ein inhomogenes Magnetfeld verwendet, das die Form einer magnetischen Flasche (Abbildung 14) besitzt. Findet nun das Ablösen der Elektronen nahe eines Punktes maximaler Feldstärke statt, so werden nahezu alle Elektronen entlang der magnetischen Feldlinien in den Bereich abnehmender Feldstärke in Richtung Detektor überführt. Hierbei bewirkt die Lorentzkraft beim Übergang von starkem zu schwachem Feld eine Zunahme der parallelen Geschwindigkeitskomponenten. Da nach der Impulserhaltung die Gesamtgeschwindigkeit konstant bleiben muss, kommt es gleichzeitig zu einer Abnahme der senkrechten Geschwindigkeitskomponenten. Diese Entspiralisierung bzw. Parallelisierung (Abbildung 14) der Flugbahn führt allerdings zu einer zeitlichen Unschärfe und daher zu einer Verminderung der Auflösung.



**Abbildung 14:** Trajektorie der Photoelektronen beim Übergang von starkem zu schwachem Magnetfeld, entnommen aus [55]

Ein weiterer (die Auflösung) limitierender Faktor stellt die Dopplerverbreiterung dar. Die abgelösten Elektronen besitzen eine Geschwindigkeitsunschärfe, die genau der Geschwindigkeit des Ions entspricht. Damit erfüllt die Energieunschärfe  $\Delta E$  nach der Dopplerverbreiterung:

$$\Delta E = 4 \sqrt{\frac{m_e}{m_{\text{Ion}}} E_e E_{\text{Ion}}} \quad (3.6)$$

Hier sind  $m_e / m_{\text{Ion}}$  die Massen des Elektrons und Ions, von dem das Elektron abgelöst wird,  $E_e / E_{\text{Ion}}$  sind die kinetischen Energien des Elektrons und Ions [56]. Anhand einer Annahme der kinetischen Energie von 50 eV pro Ladung<sup>1</sup> kann die Dopplerverbreiterung typischer hier untersuchter Systeme auf  $\Delta E/E \sim 1\text{-}3\%$  geschätzt werden.

Das starke Magnetfeld in der Nähe der Detachmentregion des Spektrometers wird durch vier übereinander angeordnete zylindrische Neodym-Eisen-Bor-Magnete erzeugt (siehe Abbildung 15). Das überlagerte, schwächere Feld wird mithilfe einer Spule entlang des 160 mm langen Flugrohrs realisiert. Zur Abschirmung des Erdmagnetfelds bzw. anderer magnetischer Störfelder wird das Flugrohr von zwei zylindrischen Mu-Metallmänteln umgeben. Die magnetische Abschirmung der Detachmentregion geschieht mittels Helmholtzspulen. Ein aus fünf Elektroden bestehendes Linsensystem zwischen Quadrupolmassenfilter und Detachmentkammer kann zur Fokussierung der Ionen senkrecht zur Hauptachse genutzt werden, sodass die räumliche Ausdehnung (Durchmesser) des Ionenstrahls am Überlappungspunkt (mit dem Laser) auf wenige Zentimeter reduziert werden kann. Andererseits beträgt die Halbwertsbreite der durch die Driftzelle transmittierten konformer- und massenselektierten Ionenwolke entlang der Hauptachse etwa 25 – 50 cm. Hieraus ergibt sich mit dem Detachment-Laser eine räumliche Überlappung von schätzungsweise 1 %.

<sup>1</sup> 50 eV pro Ladung wurden gemäß dem Potential der allerletzten Elektrode des Endtrichters angenommen, also das allerletzte Elektrodenpotential eines Bereichs, in dem noch in nennenswertem Umfang Stöße mit Neutralteilchen stattfinden.

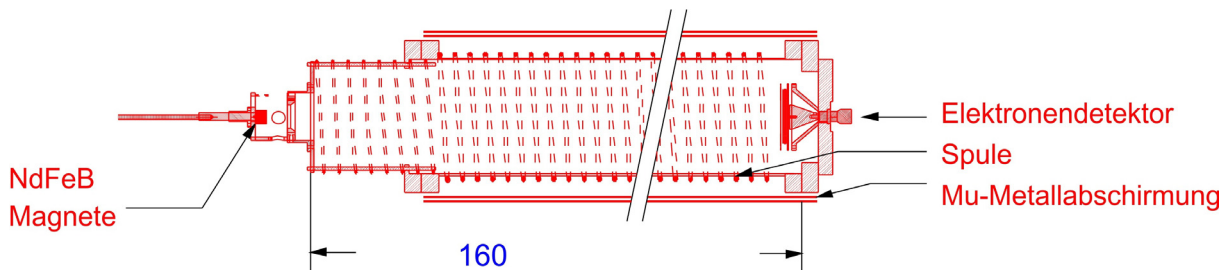
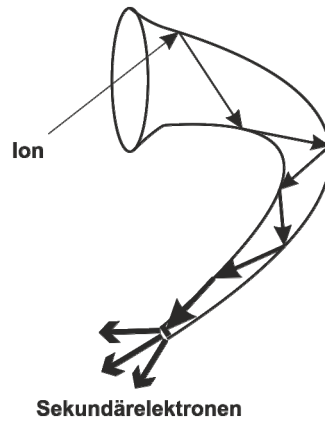


Abbildung 15: Photoelektronenspektrometer des Typs magnetische Flasche, Maßeinheiten sind in mm

### 3.6 Ionen und Elektronendetektor

Treffen hochenergetische Teilchen auf halbleitendes Material, so werden Elektronen aus dessen Oberfläche herausgeschlagen. Je größer die kinetische Energie bzw. je kleiner die Austrittsarbeit des Oberflächenmaterials ist, umso mehr solcher Sekundärelektronen werden erzeugt. Das Anlegen einer Hochspannung sowie die Verwendung einer Geometrie, die eine mehrfache Reflexion der bereits erzeugten Sekundärelektronen ermöglicht, garantiert eine Stromverstärkung um einen Faktor von  $10^8$ , sodass einzelne geladene Teilchen nachgewiesen werden. Detektionsmethoden für Ladungsträger bedienen sich typischerweise genau dieses Prinzips. Zur Detektion der vom Quadrupolmassenfilter transmittierten Ionen wird ein Channeltrondetektor verwendet, der aus halbleitendem Bleiglas besteht. Seine trompetenartige Geometrie führt zu einer mehrfachen Reflexion der produzierten Sekundärelektronen (siehe Abbildung 16). Da mit diesem Aufbau jedoch nur positive Ladungsträger nachgewiesen werden können, erfolgt der Nachweis von Anionen indirekt mithilfe einer Konversionsdynode. Infolge des eingespeisten Potentials im Kilovoltbereich führt das Auftreffen von Anionen auf der Elektrodenoberfläche zum Herausschlagen von positiven Ladungsträgern, die, wie beschrieben, im Channeltron eine Elektronenlawine auslösen. Der deshalb bis zu  $10^8$ fach verstärkte Strom wird zeitaufgelöst ohne einen zusätzlichen Verstärker auf einem Oszilloskop sichtbar gemacht. Neben seinem enormen Vervielfachungsfaktor kann seine Festigkeit im Allgemeinen als wesentlicher Vorteil betrachtet werden. Infolge seiner großen Eintrittsöffnung besitzt er jedoch nicht die zur Detektion der Photoelektronen erforderliche zeitliche Auflösung im Nanosekundenbereich, weshalb zur Detektion der Photoelektronen zwei hintereinander geschaltete MCP-Detektoren zum Einsatz kommen.



**Abbildung 16:** Channeltron (schematisch) zum Nachweis der Ionen

Diese bestehen aus schräg angeordneten Mikrokanälen aus Bleiglas, der Eintritt der Ionen besitzt somit einen wohl definierten Ort. Auch hier führen einschlagende Elektronen zu einer Elektronenkaskade. Diese wird mit einem 10fach-Verstärker (TA 1800, FAST Comtech) intensiviert und von einem Zweikanalzähler (P7888-2 Fast Comtech) erfasst.

### 3.7 Orbitrap

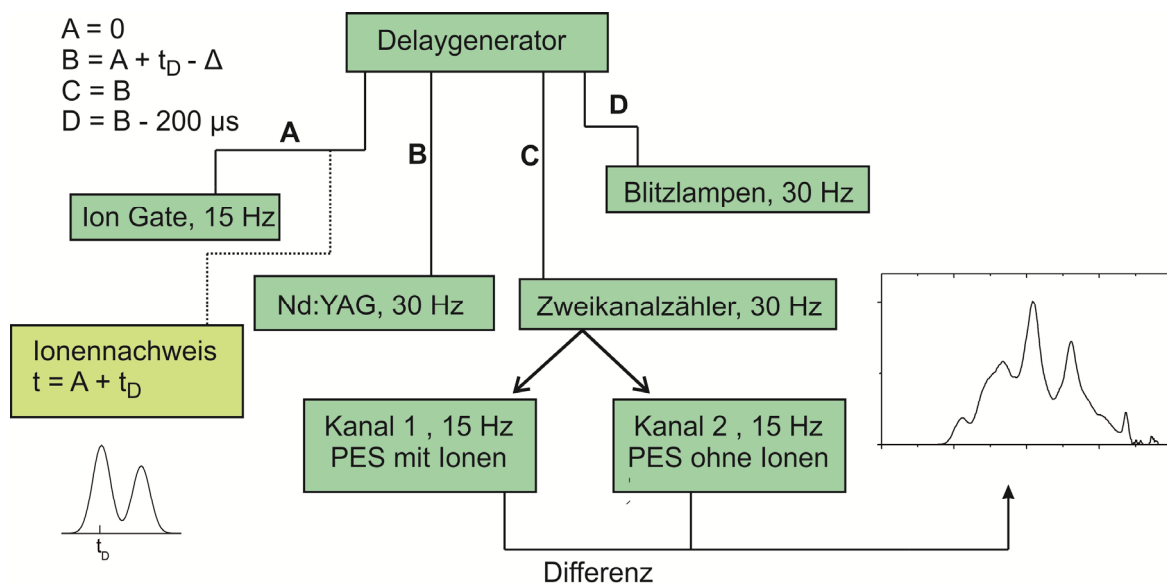
Üblicherweise ist die Auflösung von konventionellen Quadrupolmassenspektrometern je nach  $m/z$ -Bereich auf einige Hundert bis Tausend beschränkt, sodass zur Aufnahme besser aufgelöster Massenspektren eine Orbitrap (Typ LTQ XL ETD, Thermo Scientific) zum Einsatz kommt [57]. Prinzipiell handelt es sich um eine Ionenfalle, die im Gegensatz zu Pauli- bzw. Penningfallen ohne Radiofrequenzwechselfspannungen sowie magnetische Felder auskommt. Sie besteht aus einer Zentralelektrode, der sog. *Spindel* und einer äußeren Elektrode. Zur Injektion wird das Prinzip des elektrodynamischen Quetschens verwendet. Kontinuierliches Erhöhen des attraktiven Spindelpotentials während der Injektion bewirkt, dass die Ionen tangential abgelenkt werden. Ein repulsives Potential auf der äußeren Elektrode drückt die Ionen zum Zentrum der Falle. Dies verursacht, dass die Ionen stabile spiralförmige Bahnen einnehmen. Aufgrund dieses Injektionsvorgangs bewegen sich Ionen mit kleinerem  $m/z$  näher an der Spindel, während die Bewegung von Ionen mit größerem  $m/z$  weiter außen stattfindet. Dies hat zur Folge, dass eine vergleichsweise große Anzahl an Ionen ohne das Auftreten von Raumladungseffekten gleichzeitig gespeichert und nachgewiesen werden können. Die Oszillationsfrequenz der Ionen innerhalb der Ionenfalle entlang der axialen Komponente dient zur Bestimmung des  $m/z$ -Verhältnisses. Es wird aus einer Fouriertransformation eines auf der äußeren Elektrode von den Ionen verursachten Bildstroms ermittelt. Die maximal erzielbare Auflösung des Instruments beträgt 100000.



## 4 Durchführung

### 4.1 Zeitlicher Verlauf und Steuerung des Experiments

Zur zeitlichen Steuerung des Experiments sind eine Synchronisation des Lasers, der Beginn der Datenerfassung mithilfe des Zweikanalzählers sowie des Eingangspulses, der für die Injektion der im Eingangstrichter gespeicherten Ionen in die Driftzelle sorgt, notwendig. Hierzu kommt ein Delaygenerator (SRS DG535) zum Einsatz. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  erfolgt die Injektion der im Eingangstrichter gespeicherten Ionen in die Driftzelle (A, siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Zeitlicher Verlauf des PES-Experiments

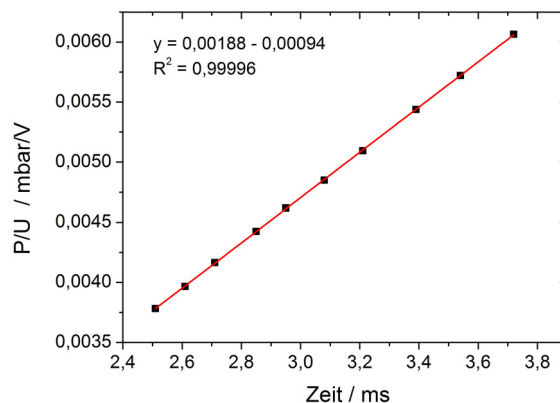
Der Nachweis am Detektor findet einige Millisekunden später zum Zeitpunkt  $t = t_D$  statt. Typischerweise beträgt die zeitliche Differenz eines Ions (je nach  $m/z$  und kinetischer Energie) zwischen seinem Nachweis und dem Durchqueren der Detachmentkammer ungefähr  $\Delta t \approx 20 - 50 \mu s$ , sodass das Licht des Detachmentlasers (B) bei  $t = t_D - \Delta t$  eingekoppelt wird. Der Start des Zweikanalzählers (C) ereignet sich zum selben Zeitpunkt. Maximale Lichtintensität wird generell erzielt, wenn die Blitzlampen des Lasers (D)  $200 \mu s$  früher ( $t = t_D - \Delta t - 200 \mu s$ ) gezündet werden. Treffen gestreute Photonen Oberflächen innerhalb der Detachmentkammer, dann werden die bei diesem Prozess emittierten Photoelektronen nachgewiesen. Aus diesem Grund wird der Detachmentlaser mit der doppelten Frequenz (30 Hz) des Mobilitätsexperiments betrieben, so dass zwischen den beiden Kanälen des Zweikanalzählers nach jedem Laserpuls gewechselt werden kann. Auf diese Weise werden Spektren mit bzw. ohne Ionen aufgenommen. Die Differenz liefert ein korrigiertes Spektrum (siehe Abbildung 17).

## 4.2 Messung von Ionenmobilitäten / Stoßquerschnitten

Aus der Definition der Mobilität  $K = v_d/E$  kann durch Umformen folgender Ausdruck hergeleitet werden:

$$K = \frac{L^2}{t_D U} \quad (4.1)$$

L stellt die Driftstrecke dar (die der Länge der Driftzelle entspricht), U entspricht der Driftspannung,  $t_D$  der zum Durchlaufen der Driftstrecke benötigte Zeit. Gerade im Endtrichter ist die Verweildauer der Ionen nicht vernachlässigbar klein, sodass die Ionenmobilität nicht aus einer einzigen Messung der Zeitdauer t zwischen Injektion und Detektion der Ionen ermittelt werden kann. Sie kann jedoch bestimmt werden, indem die Driftzeit als Funktion der Driftspannung gemessen und anschließend das Verhältnis von Druck (=P) und Driftspannung gegen die Gesamtzeit t aufgetragen wird. Aus der Steigung m der Geraden lässt sich die Ionenmobilität ermitteln (siehe Abbildung 18). Der x-Achsenabschnitt (=Zeitskala) entspricht ungefähr der Aufenthaltszeit der Ionen im konvergierenden Teil des Endtrichters.



**Abbildung 18:** Extrapolierte Ausgleichsgerade zur Bestimmung der Ionenmobilität aus mehreren Datenpunkten  
Nach dem Normieren (Gleichung (2.2)) und Anwenden von Gleichung (2.6) erhält man den Stoßquerschnitt. Der Fehler beträgt in etwa 1 – 2 %.

## 4.3 Stoßinduzierte Aktivierung im Eingangstrichter

Ein vielfach in der Literatur diskutierter Effekt besteht in einer thermischen Aktivierung der zu untersuchenden Ionen während der Injektion in die Driftzelle unter Verwendung großer Beschleunigungsspannungen [58,59]. Vor allem native Proteinkonformationen wie beispielsweise das Cytochrom C Heptaanion zeigen bei Vergrößerung der Injektionsspannung eine Konformationsänderung von einer nativen zu einer entfalteten Struktur in der Gasphase. Mit der hier verwendeten Anlage können vergleichbare Reaktionen induziert werden, wenn das Potential „Ion Gate Low“ am Ende des Eingangstrichters (siehe Kapitel 3.2) so geregelt

wird, dass die Potentialdifferenz zwischen der letzten Trichterelektrode und dem zur Injektion verwendeten Netz (=Injektionsenergie) möglichst groß wird. Herrscht außerdem ein verhältnismäßig niedriger Druck, dann kann die Effizienz dieses Prozesses infolge der vergrößerten freien Weglänge bzw. kinetischen Energie der Ionen gesteigert werden. Zu Illustrationszwecken sind die Ankunftszeiten des Oligonukleotidpentaanions  $dC_6^{5-}$  in Abbildung 19 als Funktion der Injektionsenergie bei konstantem Druck dargestellt. Hier führt eine Erhöhung der Injektionsenergie zu einer Zunahme der Ankunftszeit bzw. einem Übergang zu Konformationen, die einen größeren Stoßquerschnitt besitzen.

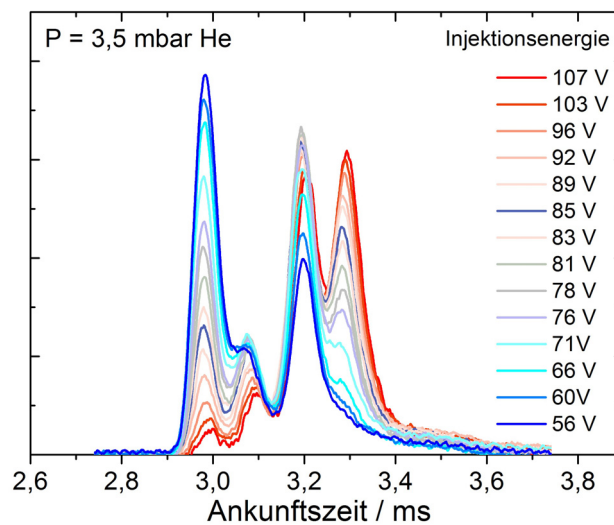


Abbildung 19: Ankunftszeiten von  $dC_6^{5-}$  bei verschiedenen Injektionsenergien

#### 4.4 Aufnahme von Photoelektronenspektren

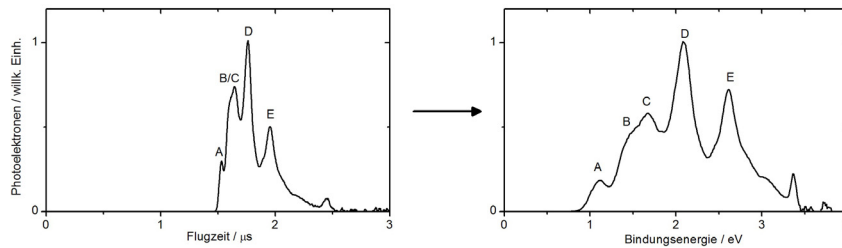
Der von den Photoelektronen erzeugte Sekundärelektronenstrom wird vom Zweikanalzähler als Funktion der Zeit bei einer Auflösung von 2 ns erfasst und im Messrechner in die Energiedomäne transformiert. Es gilt:

$$BE = h\nu - \frac{1}{2} \frac{m_e L^2}{t^2} \quad (4.1)$$

Angesichts des nichtlinearen Zusammenhangs zwischen Energie und Zeit ist eine Peakhöhenkorrektur unentbehrlich. Ansonsten werden Elektronen mit großer kinetischer Energie überschätzt, langsame hingegen werden unterschätzt. Die Jacobitransformation liefert die Korrektur:

$$I(t) \sim I(E)(t-t_0)^3 \quad (4.2)$$

Das Aufsummieren der Spektren über bis zu 500000 Laser-Pulse ergibt das finale Photoelektronenspektrum (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Flugzeitphotoelektronenspektrum (links) sowie das Spektrum in der Energiedomäne nach der Jacobitransformation

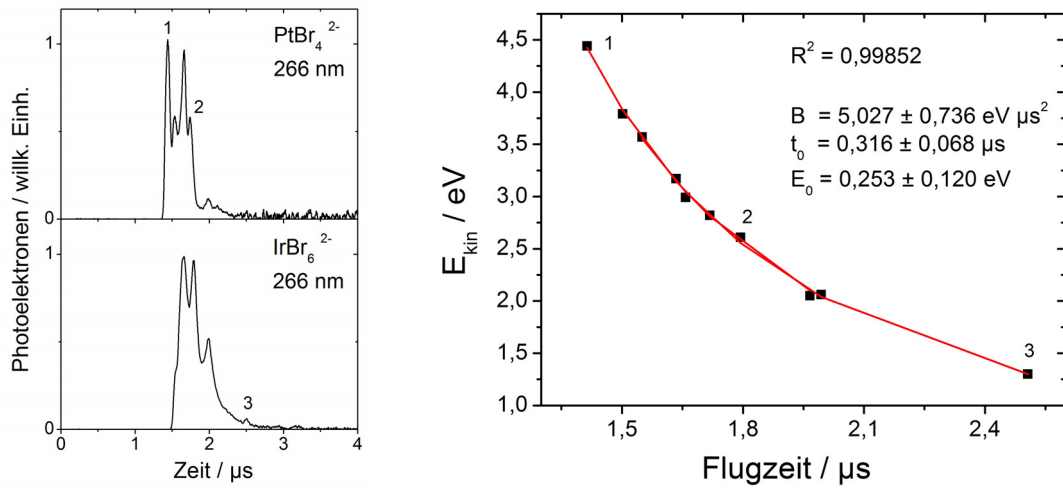
Bei besonders komplexen Konformerengemischen kann eine zweidimensionale Auftragung der Photoelektronenspektren als Funktion der Driftzeit die Interpretation entscheidend verbessern. Zur Aufnahme wird die Ankunftszeitverteilung je nach Breite typischerweise in 10 - 20 Segmente unterteilt und diese der Reihe nach jeweils 10 Sekunden spektroskopiert. Das Durchführen und Aufsummieren von mehr als 1000 solcher Zyklen liefert eine Matrix, die mit Origin 8 als Konturzeichnung bei einer Energieauflösung von 50 meV dargestellt wird (siehe Abbildung 32).

#### 4.5 Kalibrierung des Photoelektronenspektrometers

Der Zusammenhang zwischen Flugzeit- und Energiedomäne wird durch Gleichung (4.1) beschrieben. Typische während des Experiments auftretende Fehlerquellen werden mithilfe folgender Modifikation kompensiert:

$$E_{\text{kin}} = \frac{B}{(t - t_0)^2} + E_0 \quad (4.3)$$

$E_0$  erfüllt einen Korrekturterm, der mögliche Störfelder innerhalb des Flugrohrs sowie ein Nachbeschleunigen der Elektronen vor dem Detektor korrigiert. Anhand von  $t_0$  werden Fehler in der Synchronisation des Experiments wie beispielsweise eine zeitliche Verzögerung zwischen Start der Datenaufnahme mithilfe des Zweikanalzählers und dem eigentlichen Ablösen der Photoelektronen erfasst. Die Konstante B berücksichtigt Fehler bezüglich der Flugrohrlänge. Werden gemessene Spektren in der Flugzeitdomäne mit Spektren aus der Literatur verglichen, so wird durch eine Auftragung der Literaturwerte in der Energiedomäne als Funktion der experimentell bestimmten Flugzeit eine Kurve gemäß Gleichung (4.3) erzeugt. Eine entsprechende Anpassung einer Funktion liefert die Kalibrierkonstanten B,  $t_0$  und  $E_0$  (Abbildung 21). Zur Kalibrierung verwendet wurden 10 Übergänge von  $\text{IrBr}_6^{2-}$  [35] und  $\text{PtBr}_4^{2-}$  [60].

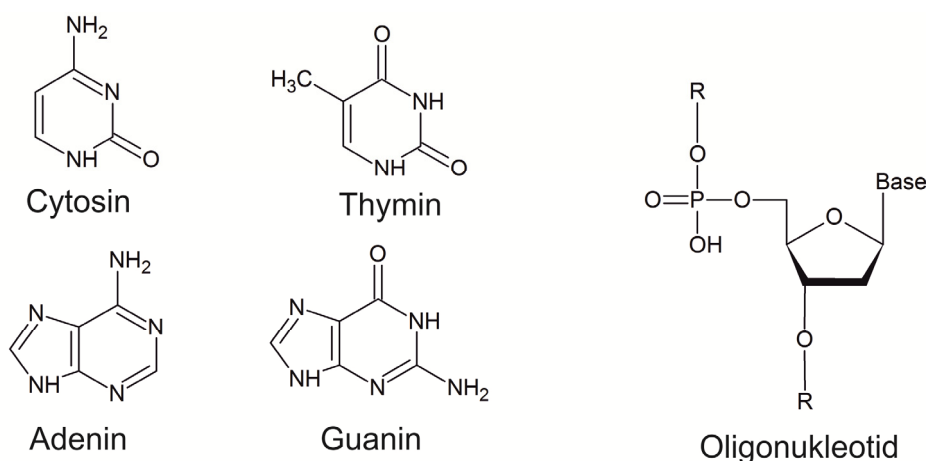


**Abbildung 21:** Photoelektronenspektren von  $\text{PtBr}_4^{2-}$  und  $\text{IrBr}_6^{2-}$  bei 266 nm in der Flugzeitdomäne (links), Kalibrierkurve des Photoelektronenspektrometers (rechts)

## 5 Oligonukleotide und DNA

### 5.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide sind langkettige Polymere, die aus einem Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat aufgebaut sind. An jeder Desoxyriboseeinheit besteht eine N-glykosidische Verknüpfung zu einer der vier Nukleinbasen Cytosin (C), Thymin (T), Adenin (A) oder Guanin (G) (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Aufbau von Oligonukleotiden

Alle in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen wurden von der Firma Jena Bioscience bezogen, in destilliertem Wasser gelöst und bei 5 °C aufbewahrt. Zum Elektrosprühen wurde jeweils eine 0,1 mM Lösung aus einem Wasser / Methanol- Gemisch im Verhältnis von 1:4 hergestellt und die Ionen bei einer Flussrate von 0,05 - 0,10 ml/h in die Gasphase überführt. Als Detachmentwellenlänge kam üblicherweise die 4. Harmonische des Nd:YAG zum Einsatz. Infolge unterschiedlicher Sensitivitäten der beiden Kanäle des Zweikanalzählers verlief die in Kapitel 4.1 beschriebene Reduktion des Photoelektronenuntergrundes nicht optimal, sodass im Folgenden alle PES bis zu einer Bindungsenergie von nur 3,0 eV dargestellt sind. Daher konnten auf diese Weise Anionen, die eine adiabatische Detachmentenergie von mehr als 3,0 eV besitzen, wie beispielsweise die Trinukleotiddianionen, nicht analysiert werden. Aus diesem Grund wurde die systematische Untersuchung dieser Moleküle erst ab einer Sequenzlänge von vier Basen vollzogen. Sind die Ladungen des Anions ausschließlich in Form deprotonierter Phosphate realisiert, existiert für Ionen des Typs  $dN[(x-1)H]_x^{(x-1)-}$  lediglich eine mögliche Ladungsverteilung. Deshalb beschränkt sich die Untersuchung zur Vereinfachung auf diese Sorten von Oligonukleotidanionen. Zeigen die Ankunftszeitverteilungen ferner mehrere getrennt voneinander aufgelöste Ionenpakete, dann werden diese i.d.R. als Konformere charakterisiert,

obwohl sie sich auch durchaus in ihrer Strukturformel voneinander differenzieren lassen und daher streng genommen als Isomere bezeichnet werden müssten. Ungewiss ist außerdem, inwieweit die Molekularbewegung bei Raumtemperatur eine schnelle Konversion verschiedener Konformationen verwirklicht. Anhand von IMS konnte bewiesen werden, dass Dinukleotidmonoanionen bei Raumtemperatur eine relativ zur Zeitskala des IMS-Experiments schnelle Interkonversion offener und *gestapelter* Strukturen aufweisen, die bei 80 K aufgrund der stark reduzierten Molekulardynamik unterbunden wird [61,62]. Inwiefern solche Prozesse bei längeren Oligonukleotidsträngen existent sind, ist weitestgehend unbekannt. Vereinzelt Interkonversionsprozesse können potentiell auch in den folgenden Experimenten agieren. Nebenbei konnten gelegentlich Ankunftszeitverteilungen beobachtet werden, die neben zeitlich separierten Ionenpaketen auch breite, wenig intensive Schultern bei großen Driftzeiten zeigen. Mithilfe von Simionsimulationen konnte dargelegt werden, dass unter dem Einsatz zu großer Wechsellspannungsamplituden hoch geladene Ionen am Ausgang von Ionentrichtern (im Bereich kleiner Elektrodenöffnungen) reflektiert bzw. kurzfristig gespeichert werden können [49]. Ähnliche Effekte wurden auch hier beobachtet, sodass bei der Präsenz dieser verbreiterten Schultern (bei großen Ankunftszeiten) eine verzögerte Transmission im Endtrichter postuliert und daher nicht näher diskutiert wird.

### 5.1.1 Tetranukleotide

Die Ankunftszeitverteilungen und PES (266 nm) der Tetranukleotidtrianionen  $dT_4^{3-}$ ,  $dA_4^{3-}$ ,  $dG_4^{3-}$  und  $dC_4^{3-}$  sind in Abbildung 23 abgebildet. Nummeriert wurde stets von kleinen zu großen Driftzeiten, sodass das erste PES dem Konformer mit kleinster Driftzeit (kleinstem Stoßquerschnitt) entspricht.

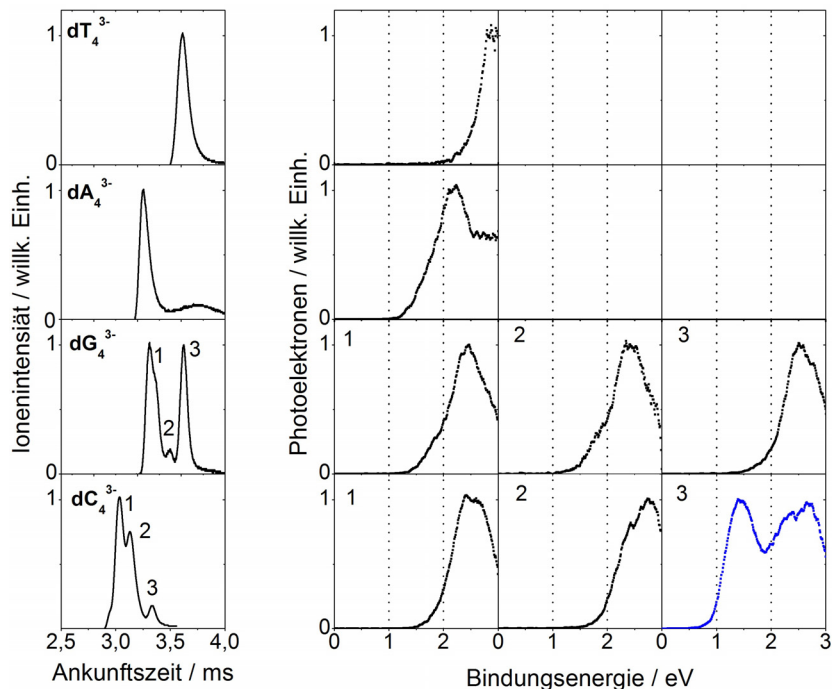
$dT_4^{3-}$  besitzt bei Raumtemperatur genau ein Konformer, dessen PES eine ansteigende Flanke bei etwa 2,5 eV zeigt. Die extrapolierte ADE beträgt 2,4 eV.

Desgleichen besteht  $dA_4^{3-}$  aus einem dominanten Konformer. Sein PES zeigt eine breite Bande, anhand derer eine ADE von 1,3 eV ermittelt werden kann. Ansonsten ist in der Ankunftszeitverteilung eine wenig intensive breite Schulter bei größeren Driftzeiten präsent, die dem bereits beschriebenen Effekt der verzögerten Transmission im Endtrichter entspricht.

$dG_4^{3-}$  zeigt drei zeitlich separierbare Konformere. Eine asymmetrische und verbreiterte Verteilung ist aus Struktur (1) sichtbar, sodass hier mindestens zwei Konformere involviert sind. Die PES von (1) und (2) besitzen jeweils eine breite Bande bei 2,4 eV sowie eine wenig intensive, zu kleineren Bindungsenergien verschobene Schulter. Die adiabatischen Detachmentenergien beziffern sich in beiden Fällen auf ungefähr 1,5 eV. Konformer (3)

beinhaltet eine ausgeprägte Bande bei 2,5 eV. Eine aus schwächer gebundenen Elektronen resultierende Bande kann nicht beobachtet werden, die Extrapolation der ansteigenden Flanke ergibt eine ADE von 2,0 eV. Angesichts des Auftretens einer Bande bei minimal niedrigeren Bindungsenergien bestehen zwischen Konformer (3) und (1) / (2) gewisse Differenzen. Ob es sich um Konformere handelt, denen unterschiedliche elektronische Strukturen zugrunde liegen, die aus einer ungleichen Ladungsverteilung resultieren, kann infolge der offensichtlichen Ähnlichkeit der Spektren (3) und (1) / (2) dennoch nicht mit Bestimmtheit gesagt werden.

Bei der in Abbildung 23 dargestellten Ankunftszeitverteilung von  $dC_4^{3-}$  sind ebenso drei verschiedene Konformere anwesend. (1) und (2) besitzen verwandte elektronische Strukturen, die eine breite Bande einschließen, anhand derer sich jeweils eine ADE von 1,8 eV extrapolieren lässt. Andererseits zeigt das PES des weniger intensiven Konformers (3) ein charakteristisches Merkmal bezüglich seiner elektronischen Struktur. Zwar existiert eine Bande bei 2,5 eV, jedoch kann auch eine zusätzliche Bande bei 1,4 eV beobachtet werden. Die Extrapolation zur Bestimmung der ADE führt zu einer um 1,0 eV niedrigeren Bindungsenergie (ADE) von 0,8 eV, relativ zu (1) und (2). Dieser ungewöhnliche Befund bedarf einer ausführlicheren Diskussion.



**Abbildung 23:** Ankunftszeitverteilungen (links) und PES (266 nm, rechts) der Tetranukleotidtrianionen. Nummeriert wurden die Konformere gemäß ihren Ankunftszeiten von links nach rechts (von kleinen zu großen Stoßquerschnitten). Spektren von Ionen mit besonders niedrigen Bindungsenergien sind in blau dargestellt.



### 5.1.2 Interpretation der Photoelektronenspektren

Eine sehr einfache Methode zur Abschätzung von Bindungsenergien besteht in einer semiklassischen Näherung. Unter Zuhilfenahme experimentell bestimmter Bindungsenergien kann die Differenz (=  $VDE^{n-}$ ) zwischen Anfangs- und Endzustand durch Betrachten aller klassischen Wechselwirkungen beider Zustände abgeschätzt werden. Wird lediglich die bei Multianionen dominierende Coulombwechselwirkung berücksichtigt, ergibt sich folgende Gleichung, die ein Ablösen der Elektronen von geladenen funktionellen Gruppen vorsieht [14,26,63]:

$$VDE^{n-} = VDE - \sum_{i=2}^n \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\sigma} \frac{1}{r_i} \quad (5.1)$$

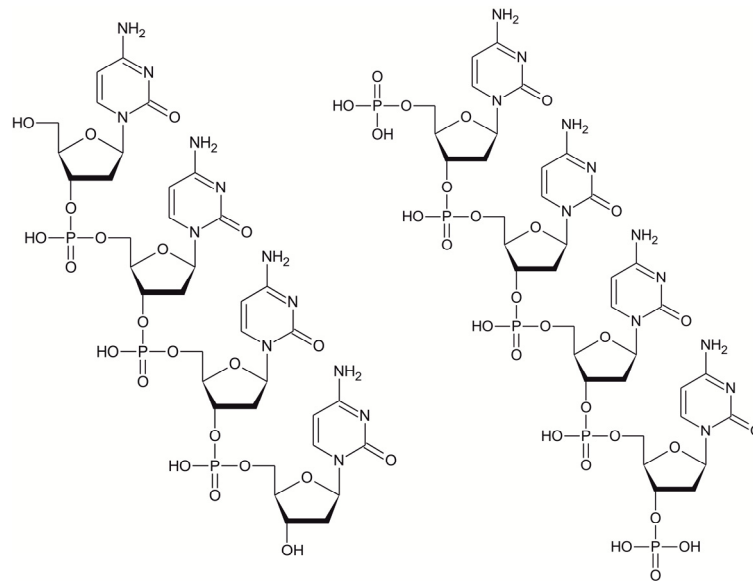
$VDE$  entspricht dem vertikalen Ablösen eines Elektrons aus der geladenen funktionellen Gruppe eines monoanionischen Systems, der diesen Term reduzierende Beitrag stellt die Wechselwirkung zwischen dem entfernten Elektron und den verbleibenden Überschussladungen im Abstand  $r_i$  dar.  $\sigma$  genügt einer dielektrischen Abschirmkonstante,  $n$  definiert die Anzahl an Überschussladungen.

Wird postuliert, dass die drei Überschussladungen des  $dC_4^{3-}$  als negativ geladene Phosphatgruppen auf dem Rückgrat realisiert sind, dann besteht hinsichtlich der elektronischen Struktur eine klare Diskrepanz. Vereinfacht betrachtet existiert zwischen dem Stoßquerschnitt und den gemittelten Abständen zweier Ladungen ein direkter Zusammenhang. So haben beispielsweise gefaltete (native) Konformere einen vergleichsweise kleinen Stoßquerschnitt. Im Gegensatz dazu besitzen entfaltete, lineare Konformere einen größeren Querschnitt, d.h. sie brauchen wesentlich länger zum Durchqueren der Driftstrecke. Hierbei bewirkt der Entfaltungsprozess beim Wechsel von kompakter zu linearer Struktur im Allgemeinen eine mittlere Zunahme der Abstände zweier bestimmter funktioneller Gruppen. Deshalb wird eine Zunahme des Stoßquerschnitts mit einem Anwachsen der mittleren Abstände zweier benachbarter Phosphatgruppen einhergehen. Bezogen auf das hier betrachtete System  $dC_4^{3-}$  besagt dieser Umstand, dass Konformer (3) bei Anwesenheit von drei negativ geladenen Phosphaten über eine ADE von mindestens 1,8 eV verfügen müsste, demzufolge eine ADE oberhalb von (1) und (2). Unter der Hypothese, dass (1) / (2) bzw. (3) die gleiche Ladungsverteilung aufweisen, kann unter Verwendung von Gleichung (5.1) eine Abnahme der Bindungsenergie nur dann zu Stande kommen, wenn entweder die Abstände der Überschussladungen reduziert werden oder die Abschirmkonstante  $\sigma$  von (3) kleinere Werte einnimmt. Ersteres wurde bereits diskutiert und kann ausgeschlossen werden. Insbesondere bei der Anwesenheit vieler intramolekularer Bindungstypen, wie z.B.

Wasserstoffbrückenbindungen, die in kompakteren Strukturen (bei kleinem Stoßquerschnitt) von essentieller Relevanz sind, kann üblicherweise eine Abschirmkonstante von größer als eins erfasst werden. Größere Stoßquerschnitte (offene, lineare entfaltete Systeme) hingegen begünstigen vielmehr einen gegen eins strebenden Wert. Aller Wahrscheinlichkeit nach verfügen die drei Konformere des  $dC_4^{3-}$  über ähnliche Polarisierbarkeiten. Deshalb ist fraglich, ob eine minimale strukturelle Änderung, wie sie (3) anhand der geringfügig größeren Ankunftszeit zeigt, Veränderungen der dielektrischen Abschirmung in diesem Ausmaße hervorruft, sodass sich eine Abnahme der ADE um 1,0 eV ergibt. Als sehr viel wahrscheinlicher erscheint hier eher eine Umverteilung der Ladung zugunsten einer Abnahme der repulsiven Coulombenergie im Allgemeinen. Mögliche, generell neben den Phosphorsäureeinheiten deprotonierbare funktionelle Gruppen stellen die Hydroxylgruppen an den Enden der Oligonukleotidsequenz sowie die Aminogruppen der Cytosinbasen dar, wo das  $\pi$ -System zu einer Delokalisierung der Ladung führt. In beiden Fällen würde eine kleinere Bindungsenergie erwartet werden [17,64,65]. Deshalb kann postuliert werden, dass die Konformere (1) und (2) von  $dC_4^{3-}$  vermutlich Strukturen darstellen, in denen die Überschussladungen als drei negativ geladene Phosphatgruppen verwirklicht sind, während (3) anstatt einer Phosphatgruppe eine deprotonierte Hydroxylgruppe oder Cytosinbase besitzt. Unter Umständen entspräche diese zusätzliche Bande (um 1,4 eV) einem Ablösen von Elektronen der schwach gebundenen Überschussladungen der negativ geladenen Hydroxylgruppen oder Cytosinbasen.

### **5.1.3 Modifizierte Nukleinsäuren**

Gezielte Substitution funktioneller Gruppen kann dazu beitragen, diese Umverteilung der Ladungen / Protonen in der Gasphase zu erfassen. Besteht die Ursache der schwach gebundenen Bande des Strukturtyps (3) von  $dC_4^{3-}$  in einer negativ geladenen Hydroxylgruppe, so ließen sich nach dem Auswechseln dieser Gruppen durch Phosphateinheiten (siehe Abbildung 24) keine Ionen des Typs (3) mehr beobachten. Keine Auswirkungen würde man beim Auftreten negativ geladener Basen erwarten.

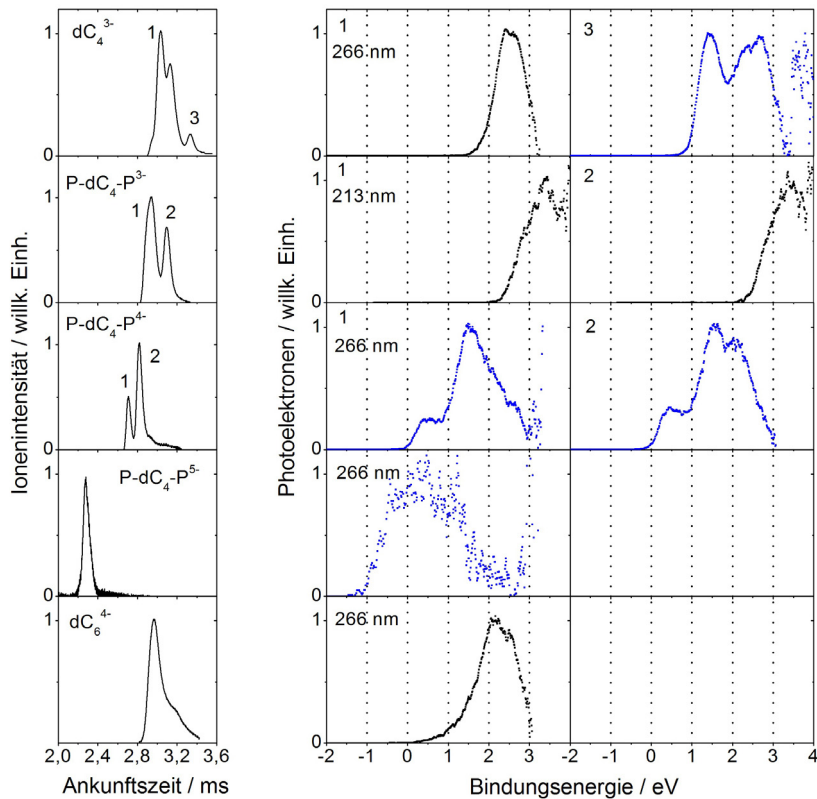


**Abbildung 24:**  $dC_4$  (links),  $P-dC_4-P$  (rechts), Hydroxylgruppen sind durch Phosphatgruppen ersetzt.

In Abbildung 25 sind die Driftzeiten und PES dieses modifizierten Moleküls  $P-dC_4-P$  als Tri-, Tetra- und Pentaanion dargestellt. Das Trianion zeigt zwei verschiedene Konformere. Bei Gebrauch einer Detachmentwellenlänge von 266 nm konnte zur Aufnahme der PES keine ausreichende Signalintensität erfasst werden. Deshalb kam die fünfte Harmonische des Nd:YAG (=213 nm) zum Einsatz. Mittels Extrapolation der ansteigenden Flanken können adiabatische Detachmentenergien von 2,3 (1) bzw. 2,4 eV (2) ermittelt werden, die im Vergleich zu den beiden Konformeren (1) und (2) von  $dC_4^{3-}$  um 0,5 eV zu größeren Bindungsenergien verschoben sind. Die Ähnlichkeit beider Spektren [ $P-dC_4-P^{3-}$  (1) und (2)] lässt auf verwandte elektronische Strukturen schließen. Bei einer Ladungsverteilung bestehend aus drei negativ geladenen Phosphaten stehen im Vergleich zu  $dC_4$  fünf anstatt drei verschiedene Positionen zur Verfügung (die Ladungen zu verteilen). Eine minimale Coulombabstoßung der drei Überschussladungen lässt sich erzielen, indem die erste, dritte und fünfte Phosphorsäureeinheit deprotoniert werden. Aus der damit verbundenen Vergrößerung der mittleren Abstände benachbarter Überschussladungen lässt sich nach Gleichung (5.1), relativ zu  $dC_4^{3-}$  (1) / (2), ein Zuwachs der ADE ableiten.

Das Tetraanion dieser modifizierten  $dC_4$ -Variante besitzt gleichermaßen zwei zeitlich separierte Konformere. Seine PES verfügen über jeweils mindestens zwei verschiedene Banden bei Bindungsenergien von 0,4 und 1,4 eV. Ferner zeigt (2) eine Bande bei 2,1 eV. Da diese im Schwellbereich der RCB auftritt, liegt sie sehr wahrscheinlich in einer relativ zu (1) minimal geringeren RCB begründet, so dass diese Bande in (1) eine wesentlich geringere Übergangswahrscheinlichkeit aufweist. Die Aufnahme der Spektren bei kleineren Detachmentwellenlängen könnte zu einem tieferen Verständnis beitragen. Dies ist aber

ohnehin irrelevant, da hier insbesondere der Bereich schwach gebundener Elektronen von Bedeutung ist. Die Extrapolation der ansteigenden Flanken der Tetraanionen ergeben im Vergleich zum Trianion [(1) und (2)] um etwa 2,5 eV verringerte adiabatische Detachmentenergien von jeweils 0 eV.



**Abbildung 25:** Ankunftszeitverteilungen (links) und PES (rechts) von  $dC_4^{3-}$ , der modifizierten Variante als Tri-, Tetra- und Pentaanion sowie  $dC_6^{4-}$ . Auf die Darstellung von  $dC_4^{3-}$  (2) wurde verzichtet. Spektren von Ionen mit besonders niedrigen Bindungsenergien sind in blau dargestellt.

Für Oligonukleotide mit einer Kettenlänge von  $n = 5-8$  konnte bereits belegt werden, dass die ADE bei Erhöhung der Ladungszahl um ca. 1,0 eV abfällt, wenn die Ladungszahl um eins für dieselbe oder um eine Einheit verlängerte Sequenz erhöht wird (vorausgesetzt dass vergleichbare elektronische Strukturen zugrunde liegen, z.B. in Form ausschließlich deprotonierter Phosphatgruppen) [66]. Demzufolge sollten die Tetraanionen adiabatische Detachmentenergien von schätzungsweise 1,5 eV besitzen, vorausgesetzt dass beiden Ladungszuständen eine verwandte elektronische Struktur (bestehend aus drei bzw. vier negativ geladenen Phosphaten) zugrunde liegt. Andererseits kann bezüglich der niederenergetischen Schulter der Tetraanionen und des  $dC_4^{3-}$  (3) eine Ähnlichkeit der Spektren abgeleitet werden.

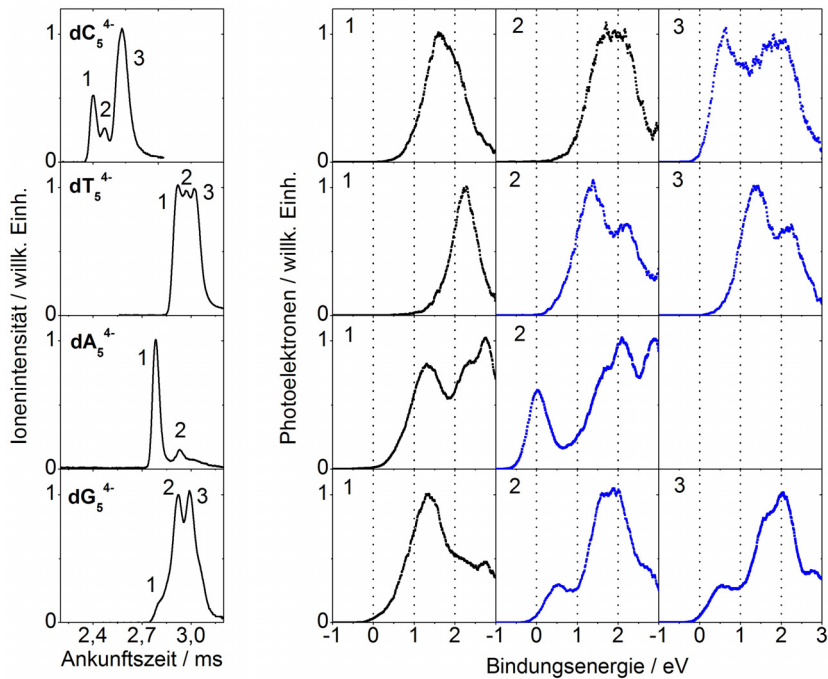
Fügt man dem Tetraanion der modifizierten Variante des  $dC_4$  an dessen endständigen Phosphaten jeweils eine Desoxycytidineinheit hinzu, ergibt sich eine Sequenz (=  $dC_6^{4-}$ ), deren PES in Abbildung 25 gezeigt ist. Die ADE des nahezu identischen Anions beträgt 1,2 eV und

liegt damit 1,2 eV oberhalb der Tetraanionen von  $P\text{-dC}_4\text{-P}^{4-}$ . Hinsichtlich der elektronischen Struktur besteht zwischen den Ionen  $P\text{-dC}_4\text{-P}^{3-}$  bzw.  $dC_4^{3-}$  (1) und (2) eine gewisse Analogie. Daher werden diese Anionen aller Wahrscheinlichkeit nach Strukturen aus deprotonierten Phosphaten beinhalten, während andererseits  $P\text{-dC}_4\text{-P}^{4-}$  und  $dC_4^{3-}$  (3) eine andere Isomerenklasse repräsentieren. Wird nun in die Überlegungen mit einbezogen, dass angesichts der Substitution von Hydroxylgruppen durch Phosphateinheiten keine Hydroxylate mehr gebildet werden können, muss zumindest das Tetraanion der modifizierten  $dC_4$ -Variante über deprotonierte Cytosinbasen verfügen. Da zuvor eine Einteilung der Ionen in eine gemäß ihrer elektronischen Struktur verwandte Sorte stattfand, sollte im Umkehrschluss das Ion  $dC_4^{3-}$  (3) negative Cytosinbasen einschließen.

Intensivieren lässt sich diese Schlussfolgerung bei der Betrachtung der elektronischen Struktur des Pentaanions von  $P\text{-dC}_4\text{-P}$  (Abbildung 25). Seine ADE beträgt -1,1 eV, während oben erwähnte Faustregel bei der Präsenz von fünf Phosphaten eine ADE von 0 eV postuliert. Ob die nun dokumentierte Außergewöhnlichkeit des Konformers  $dC_4^{3-}$  (3) auf längere Systeme übertragbar ist, wird im nächsten Abschnitt anhand der Pentanukleotidtetraanionen sowie der Hexanukleotidpentaanionen behandelt.

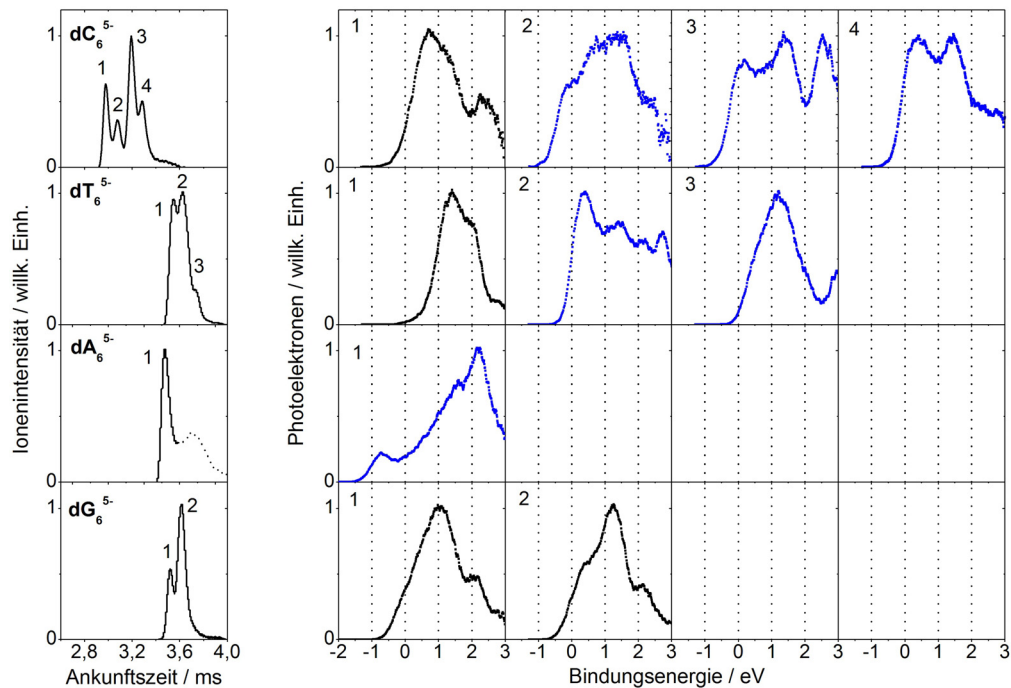
#### **5.1.4 Pentanukleotide und Hexanukleotide**

Die Driftzeitverteilungen und PES (266 nm) der Pentanukleotidtetraanionen sind in Abbildung 26 abgebildet. Während die Ionen  $dC_5^{4-}$ ,  $dT_5^{4-}$  und  $dG_5^{4-}$  drei Konformere zeigen, besteht die Ankunftszeitverteilung von  $dA_5^{4-}$  aus lediglich zwei zeitlich separierten Ionenpaketen. Konformer (3) des  $dC_5^{4-}$  besitzt eine verbreiterte Driftzeit, folglich schließt Peak 3 mindestens zwei Konformere ein. Die PES der Tetraanionen zeigen generell jeweils zwei Klassen von elektronischen Strukturen. Grundsätzlich besitzen die Ionen, die zum Passieren der Driftstrecke mehr Zeit in Anspruch nehmen, jeweils eine charakteristische niederenergetische Bande. Diese kann bei keinem der schnellsten Ionen einer Sorte angetroffen werden. Die ADE von  $dA_5^{4-}$  (2) beträgt -0,4 eV und ist damit in guter Korrespondenz mit [14,66].



**Abbildung 26:** Ankunftszeitverteilungen (links) und PES (266nm, rechts) der Pentanukleotidtetraanionen, Spektren von Ionen mit besonders niedrigen Bindungsenergien sind in blau dargestellt.

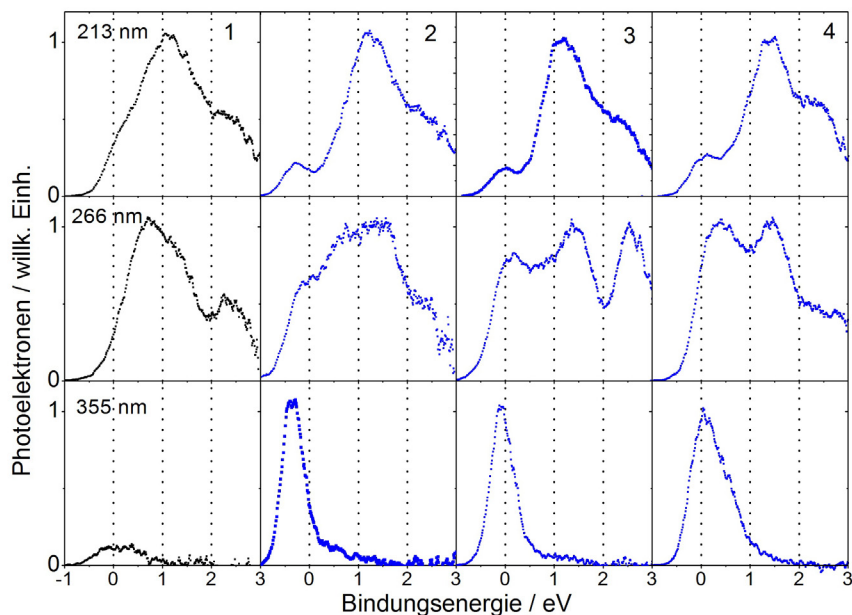
Alle Ionenmobilitätsdaten bzw. PES der Hexanukleotidpentaanionen sind in Abbildung 27 zusammengefasst. Wieder können, mit Ausnahme von  $dA_6^{5-}$ , mehrere auf der Zeitskala des Experiments nicht interkonvertierende Konformere beobachtet werden.  $dC_6^{5-}$  und  $dT_6^{5-}$  zeigen zwei Klassen an PES, die sich hinsichtlich der bereits mehrfach beobachteten niederenergetischen Bande unterscheiden. Das Pentaanion des  $dA_6$  besitzt eine ADE von -1,3 eV. Von  $dG_6^{5-}$  koexistieren hingegen zwei Konformere ähnlicher elektronischer Struktur. Ob eine ausgeprägte Abhängigkeit der beobachteten Banden von der jeweiligen genutzten Anregungswellenlänge besteht, soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.



**Abbildung 27:** Ankunftszeiten (links) und PES (266nm, rechts) der Hexanukleotidpentaanionen, Spektren von Ionen mit besonders niedrigen Bindungsenergien sind in blau dargestellt, die gepunktete Linie der Driftzeitverteilung von  $dA_6^{5-}$  entspricht einer verzögerten Emission im Endtrichter.

### 5.1.5 Abhängigkeit von der Detachmentwellenlänge

Die UV-Absorptionsmaxima der Nukleinbasen liegen im Bereich von 260 nm und werden demzufolge bei einer Detachmentwellenlänge von 266 nm erfasst. Bestimmte Relaxationskanäle können zu einer Überlagerung der direkten Emission von Photoelektronen führen. Ein allgemeiner Schutzmechanismus der DNA stellt beispielsweise die schnelle innere Konversion nach elektronischer Anregung in den Grundzustand dar. In kondensierter Phase wird die bei diesem Prozess erzeugte Schwingungsenergie schnell mit der Umgebung ausgetauscht [67,68]. Ein möglicher Relaxationsprozess in der Gasphase bestünde in der Emission von Elektronen [69,70,71,72]. Ein anderer Relaxationskanal stellt eine Emission der Elektronen durch Tunneln der RCB nach resonanter elektronischer Anregung (=Autodetachment) [26,73,74,75] dar. Detachmentwellenlängen außerhalb des Absorptionsbereichs mindern generell die Wahrscheinlichkeit solcher der direkten Emission von Photoelektronen konkurrierender Prozesse. Läge beispielsweise die mehrfach beobachtete niederenergetische Bande in einem solchen Relaxationskanal begründet, erschiene sie bei Verwendung anderer Wellenlängen entweder mit wesentlich veränderter Intensität oder bei anderer Bindungsenergie (z.B. bei Prozessen, die zu einer verzögerten Emission von Elektronen gleicher kinetischer Energie führen [26]). Infolgedessen erfolgt nun eine wellenlängenabhängige Betrachtung der PES des  $dC_6^{5-}$ . Diese sind in Abbildung 28 gezeigt.



**Abbildung 28:** PES von  $dC_6^{5-}$  bei unterschiedlichen Detachmentwellenlängen, Spektren von Ionen mit besonders niedrigen Bindungsenergien sind in blau dargestellt.

(2), (3) und (4) besitzen bei 213 nm die typische niederenergetische Bande. Die bei 266 nm in allen vier Konformeren existente Bande an der RCB-Detachmentschwelle um 1,0 - 1,5 eV erscheint infolge der größeren Übergangswahrscheinlichkeiten in den 213 nm Spektren deutlich intensiver. (1) lässt bei 355 nm kein Elektronendetachment erfassen. Die wenigen Photoelektronen lassen sich auf eine partielle Überlappung der Driftzeiten von (1) und (2) zurückführen. (2), (3) und (4) zeigen hier eine Bande, die im Wesentlichen dem vielfach beobachteten niederenergetischen Ablösen von Photoelektronen bei einer Wellenlänge von 266 nm entspricht. Die anderen Übergänge sind angesichts der RCB abgetrennt. Die Tatsache, dass die vielfach beschriebene schwach gebundene Bande der Konformere (2), (3) und (4) bei allen Anregungswellenlängen bei gleicher Bindungsenergie ähnlicher Intensität erscheint, lässt die Folgerung zu, dass diese Signatur aller Wahrscheinlichkeit nach keinem Konkurrenzprozess der direkten Emission zugrunde liegt.

### 5.1.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die Analyse der PES der Tetranukleotidtrianionen, Pentanukleotidtetraanionen sowie der Hexanukleotidpentaanionen ergibt zusammenfassend folgendes Ergebnis: Konformere des  $dC_4^{3-}$  können nachgewiesen werden, die sich bezüglich ihrer elektronischen Struktur unterscheiden. Aus Vergleichsmessungen einer modifizierten Variante lässt sich als plausible Interpretation eine Struktur ableiten, die eine Ladungsverteilung bestehend aus mindestens einer negativ geladenen Cytosinbase einbezieht. Anhand  $dG_4^{3-}$  kann keine eindeutige Beurteilung erfolgen,  $dA_4^{3-}$  und  $dT_4^{3-}$  weisen lediglich ein Konformer auf. Die



Hexanukleotidpentaanionen zeigen eine im Wesentlichen andere Verhaltensweise:  $dT_6^{5-}$ ,  $dC_6^{5-}$  sowie  $dG_6^{5-}$  besitzen verschiedene Konformere. Mit Ausnahme von  $dG_6^{5-}$  können elektronische Strukturen dargelegt werden, die sich durch die Präsenz einer niederenergetischen Bande von Ionen gleicher Sorte abheben.  $dA_6^{5-}$  zeigt lediglich ein Konformer. Dieses ist eher der Klasse zugehörig, die diese schwach gebundene Bande mit einbezieht. Zwei verschiedene Typen Pentanukleotidtetraanionen können beobachtet werden, die sich bezüglich ihrer elektronischen Struktur unterscheiden. Diese Gegebenheit rechtfertigt (die bereits als schwarz bzw. blau) getätigte Einteilung der Konformere in bestimmte Typen A und B (Tabelle 1). Typ A repräsentiert die schwarzen, Typ B genügt den blauen Spektren. Zur Einteilung werden lediglich Spektren einer Ionensorte einander gegenübergestellt. Das entscheidende Kriterium zur Gliederung in Typ B besteht in der Anwesenheit einer niederenergetischen Bande. Ein Vergleich unterschiedlicher Ionensorten erweist sich hinsichtlich der Ionisierungsenergien der neutralen Nukleinbasen (siehe Abschnitt 5.1.9) als außerordentlich kompliziert. Daher findet beispielsweise eine Einteilung der nahezu identischen Spektren  $dT_5^{4-}$  (1) und  $dG_5^{4-}$  (2) / (3) in verschiedene Fraktionen statt. Falls keine konkrete Aussage getroffen werden kann, werden die Konformere zu Typ A zugeordnet (z.B.  $dG_4^{3-}$ ).

Stoßquerschnitt [ $\text{\AA}^2$ ] / ADE [eV]				
Typ A			Typ B	
<i>Tetranukleotidtrianionen</i>				
$dT_4^{3-}$	263 / 2,4			
$dA_4^{3-}$	231 / 1,3			
$dG_4^{3-}$	251 / 1,5	264 / 1,5	276 / 2	
$dC_4^{3-}$	220 / 1,8	224 / 1,8		240 / 0,8
<i>Pentanukleotidtetraanionen</i>				
$dC_5^{4-}$	279 / 0,9	290 / 0,9		301 / 0,1
$dT_5^{4-}$	336 / 1,5			346 / 0,55
$dA_5^{4-}$	322 / 0,5			355 / 0,6
$dG_5^{4-}$	328 / 0,4			338 / -0,4
				338 / -0,1
				347 / -0,1
<i>Hexanukleotidpentaanionen</i>				
$dC_6^{5-}$	338 / -0,3			351 / -0,7
$dT_6^{5-}$	411 / 0,6			364 / -0,5
$dA_6^{5-}$				377 / -0,4
$dG_6^{5-}$	418 / -0,6	440 / -0,4		
				420 / -0,2
				431 / -0,1
				385 / -1,3

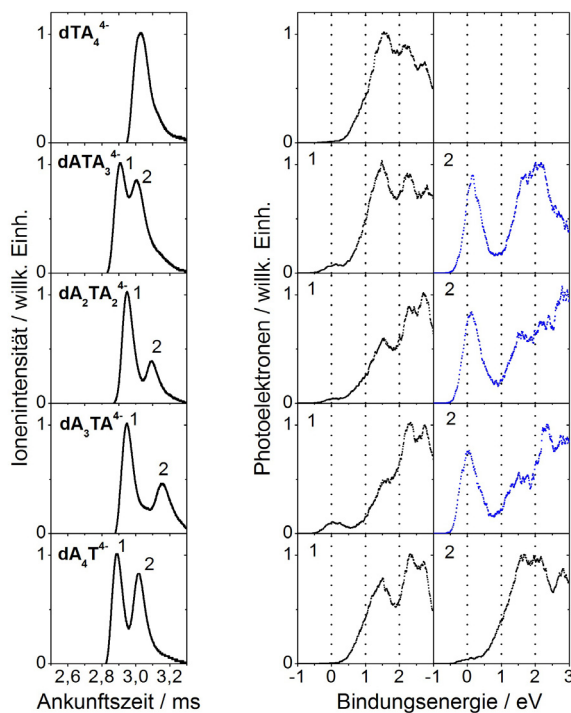
**Tabelle 1:** Experimentell bestimmte Stoßquerschnitte und adiabatische Detachmentenergien der untersuchten Oligonukleotidanionen

Analog zu  $dC_4^{3-}$  liegt die Ursache für das Erscheinen dieser unterschiedlichen elektronischen Strukturen gleicher Ionensorte vermutlich in der Ladungsverteilung der untersuchten Moleküle begründet, beispielsweise aufgrund deprotonierter Nukleinbasen. Ist ferner eine gewisse Position innerhalb der Sequenz bevorzugt, kann die Substitution der einzelnen

Nukleinbasen innerhalb heterogener Sequenzen entscheidende Anhaltspunkte liefern. Thyminhaltige Sequenzen besitzen im Allgemeinen im Vergleich zu guanin- und adeninreichen Sequenzen größere adiabatische Detachmentenergien von ungefähr 1,0 eV. Kann außerdem die vielfach beobachtete niederenergetische Bande als Signatur negativ geladener Basen typisiert werden, sollten bei der Präsenz negativ geladener Adenin- oder Guaninbasen innerhalb einer ansonsten thyminreichen Sequenz diese charakteristischen Übergänge der Pentanukleotidtetraanionen im Bereich von 0,1 bzw. 0,3 eV erscheinen. Diese Konformere werden vereinfacht als Typ A<sup>-</sup> bzw. Typ G<sup>-</sup> bezeichnet. Hypothetische negative Thyminbasen könnten zwar am Rande bestehen, werden aber wegen der vergleichsweise großen ADE möglicherweise nicht identifiziert (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26). Im folgenden Abschnitt werden die konformerenaufgelösten PES speziell ausgesuchter Sequenzen vorgestellt.

### 5.1.7 Sequenzabhängigkeit der Oligonukleotidanionen A<sub>4</sub>T, AT<sub>4</sub> und GT<sub>4</sub>

Abbildung 29 enthält die Ankunftszeiten und PES (266 nm) der Tetraanionen dTA<sub>4</sub><sup>4-</sup>, dATA<sub>3</sub><sup>4-</sup>, dA<sub>2</sub>TA<sub>2</sub><sup>4-</sup>, dA<sub>3</sub>TA<sup>4-</sup> und dA<sub>4</sub>T<sup>4-</sup>.

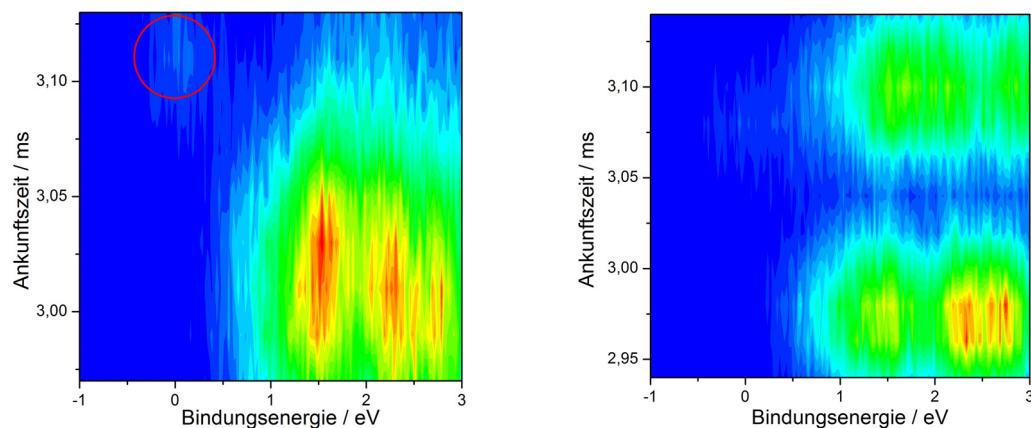


**Abbildung 29:** Ankunftszeiten (links) und PES (266nm, rechts) der Oligonukleotidtetraanionen des Typs A<sub>4</sub>T, Spektren von Ionen mit besonders niedrigen Bindungsenergien sind in blau dargestellt.

Die Gasphasenanionen des dATA<sub>3</sub><sup>4-</sup>, dA<sub>2</sub>TA<sub>2</sub><sup>4-</sup> und dA<sub>3</sub>TA<sup>4-</sup> bestehen alle mindestens aus einem Konformer, deren PES eine charakteristische Bande bei etwa 0 eV besitzen. dA<sub>4</sub>T<sup>4-</sup> (2) bzw. dTA<sub>4</sub><sup>4-</sup> zeigen ein kaum ausgeprägtes Signal bei einer Bindungsenergie von 0 eV. Dass ein

Signal hier überhaupt auftritt, lässt sich wahrscheinlich auf die Existenz kleinerer Mengen an Konformeren des Typs  $A^-$  zurückführen, die dem dominanten Signal überlagert sind, im IMS-Experiment zeitlich aber nicht divergieren (aufgrund ähnlicher Stoßquerschnitte).

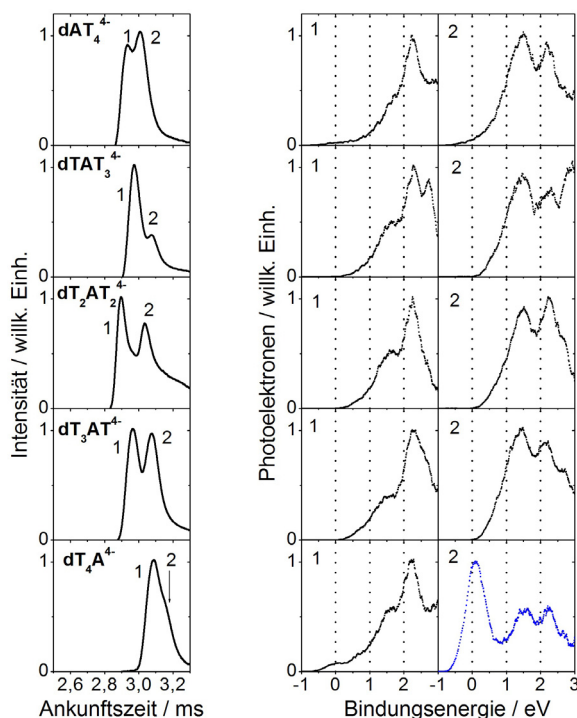
Ein tieferes Verständnis kann eine Aufnahme von 2D-(IMS-PES)-Spektren liefern, insbesondere was die vergleichsweise kaum erscheinende niederenergetische Bande der beiden Systeme  $dA_4T^{4+}$  und  $dTA_4^{4+}$  betrifft:



**Abbildung 30:** 2D-(IMS / PES)-Spektren (266nm) von  $dTA_4^{4+}$  (links) und  $dA_4T^{4+}$  (rechts)

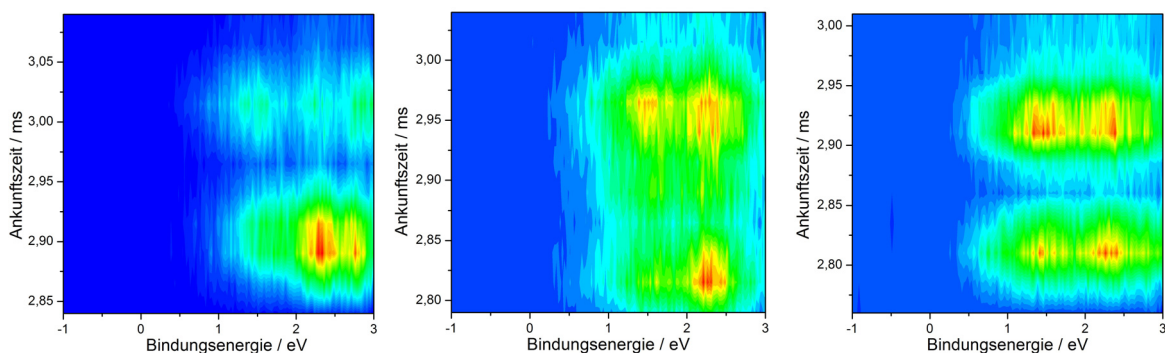
Die genauere Analyse führt zu folgendem Resultat: Bei großen Ankunftszeiten kann ein Konformer von  $dTA_4^{4+}$  des Typs  $A^-$  nachgewiesen werden (siehe roter Kreis in Abbildung 30). Im Gegensatz dazu lässt  $dA_4T^{4+}$  keine eindeutige Aussage zu, hier kann lediglich ein verhältnismäßig schwaches Signal bei 0 eV beobachtet werden.

Abbildung 31 vereinigt die sequenzabhängigen Ankunftszeiten und PES (266 nm), bestehend aus jeweils 4 Thyminbasen und einem Adenin.

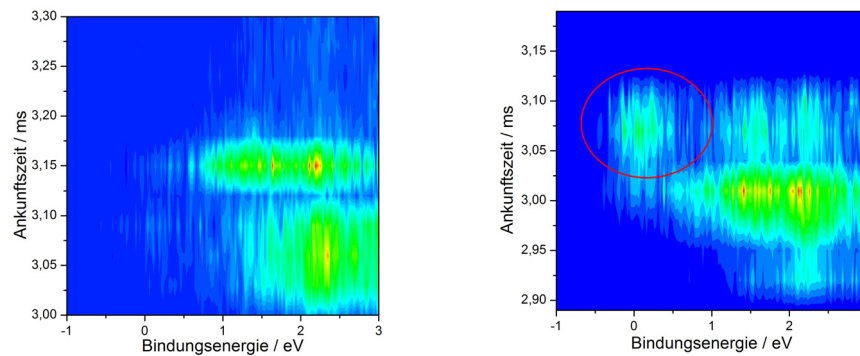


**Abbildung 31:** Ankunftszeiten (links) und PES (266nm) der Oligonukleotidtetraanionen des Typs  $AT_4$ , Spektren von Ionen mit besonders niedrigen Bindungsenergien sind in blau dargestellt.

Kein Konformer der Tetraanionen  $dTAT_3$ ,  $dT_2AT_2$  und  $dT_3AT$  besitzt eine auffallende Signatur bei 0 eV Bindungsenergie.  $dAT_4^{4-}$  hingegen zeigt ein sehr schwaches Signal in dieser Zone. Wird die Verzögerung des Lasers so eingestellt, dass eine Überlappung mit der Ionenwolke nur im letzten Bereich der Ankunftszeitverteilung von  $dT_4A^{4-}$  besteht, ergibt sich ein PES mit charakteristischem Signal um 0 eV. Eine Betrachtung der 2D-Spektren erweist sich auch hier als sinnvoll.



**Abbildung 32** 2D-(IMS / PES)-Spektren (266 nm) von  $dTAT_3^{4-}$  (links),  $dT_2AT_2^{4-}$  (Mitte) und  $dT_3AT^{4-}$  (rechts)  $dTAT_3$ ,  $dT_2AT_2$  und  $dT_3AT$  zeigen alle kein nennenswertes Detachmentsignal bei einer Bindungsenergie von 0 eV entlang des gesamten Bereichs der Driftzeitverteilung.

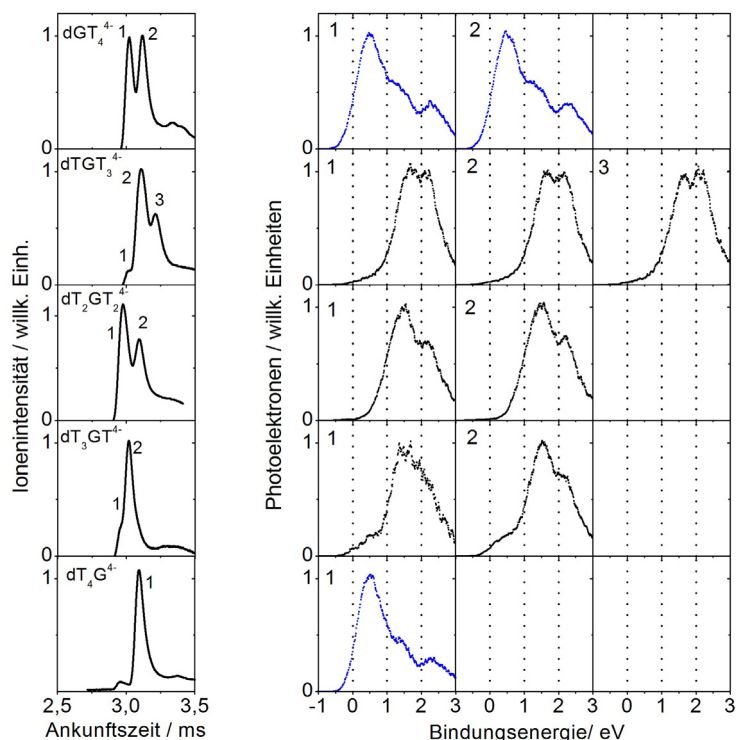


**Abbildung 33:** 2D-(IMS / PES)-Spektren (266 nm) von  $dAT_4^+$  (links) und  $dT_4A^+$  (rechts)

$dT_4A^+$  beinhaltet die bereits besprochene Signatur bei größeren Driftzeiten.  $dAT_4^+$  besitzt weiterhin eine kaum bestehende Bande bei 0 eV über ein größeres Gebiet der Ankunftszeitverteilung. Demzufolge kann ein Konformer des Typs  $A^-$  in geringen Mengen lediglich postuliert werden.

Zwar lassen nicht alle PES einwandfreie Rückschlüsse zu, schlussendlich ergibt sich dennoch nachstehende Information: Bestehen gleichzeitig Thyminbasen am Anfang bzw. Ende der Sequenz, so existiert offensichtlich kein Konformer des Typs  $A^-$  in der Gasphase. Demgegenüber scheint die Wahrscheinlichkeit solcher elektronischen Strukturen bevorzugt zu sein, sobald eine Adeninbase am Beginn (5-Ende) oder in besonderem Maße am Ende (3-Ende) der Sequenz realisiert ist. Mehr Einblick, inwiefern die soeben geschilderten Beobachtungen auf andere Systeme übertragbar sind, soll nun anhand von  $GT_4$ -Ionen diskutiert werden.

Die in Abbildung 34 dargestellten Ankunftszeiten und PES (266 nm) ergeben folgendes Ergebnis:  $dGT_4^+$  (2 Konformere gemäß IMS) und  $dT_4G^+$  besitzen ausgeprägte Peaks bei 0,3 eV, demnach die Signatur deprotonierter Guaninbasen. Diese Signal kann bei  $dTGT_3^+$  (3 Konformere gemäß IMS) und  $dT_2GT_2^+$  (2 Konformere) nicht beobachtet werden.  $dT_3GT^+$  zeigt eine wenig intensive Bande bei 0,3 eV.



**Abbildung 34:** Sequenzabhängige Ankunftszeiten (links) und PES (266nm, rechts) der Tetraanionen des Typs  $GT_4$ . Spektren von Ionen mit besonders niedrigen Bindungsenergien sind in blau dargestellt.

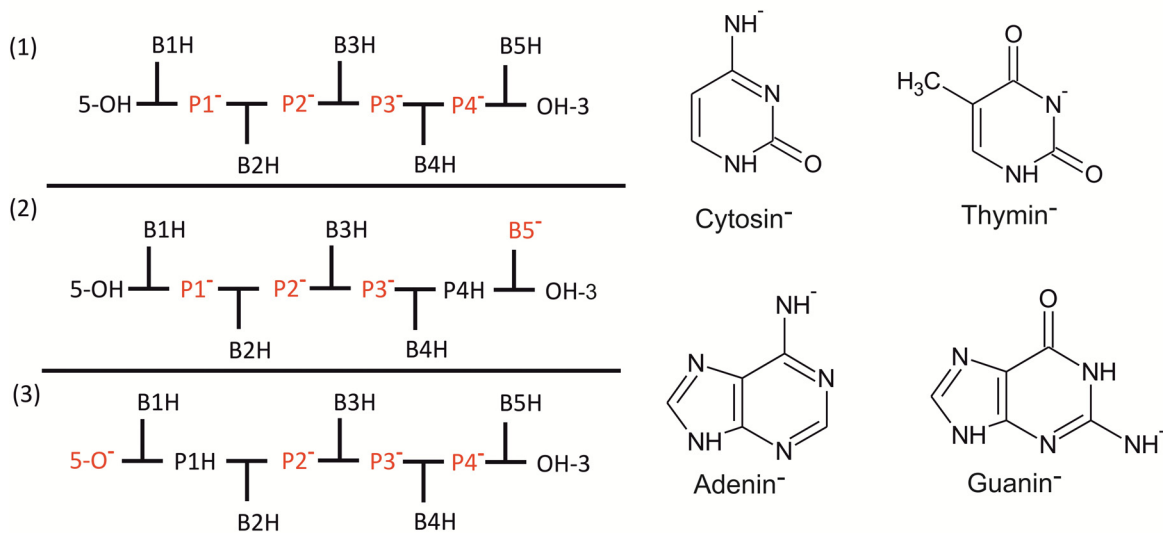
Die soeben geschilderten Resultate bestätigen die bereits getätigte Deutung der sequenzabhängigen PES. Guaninbasen an den Enden eines Oligonukleotidstrangs steigern die Wahrscheinlichkeit eines ausgeprägten niederenergetischen Photodetachmentsignals.

Demzufolge kann das folgende Fazit gezogen werden: Befinden sich Adenin- oder Guaninbasen am Anfang oder Ende der Sequenz, so können (wie bei  $dA_5^{4-}$  (2) oder  $dG_5^{4-}$  (2) / (3)) charakteristische Photodetachmentsignale bei 0,1 oder 0,3 eV erfasst werden. Quantenchemische Rechnungen könnten weitere Hinweise liefern, inwieweit deprotonierte Nukleinbasen involviert bzw. für diese typischen Übergänge verantwortlich sind. Daher werden im folgenden Abschnitt theoretische Rechnungen von Pentanukleotidtetraanionen speziell ausgewählter Strukturtypen mit bestimmter Ladungsverteilung präsentiert und näher beleuchtet.

### 5.1.8 Vergleich mit theoretischen Rechnungen

Die Generierung möglichst vieler Strukturen fand anhand von Kraftfeldrechnungen statt. Zunächst wurde mithilfe des im Programmpaket *AMBER* implementierten Programms *XLEAP* eine willkürliche Geometrie einer Ionensorte mit bestimmter Ladungsverteilung erzeugt. Die verwendeten Typen sind in Abbildung 35 dargestellt. Typ 1 liegt einem aus vier negativen Phosphaten aufgebautes Ion zugrunde. Typ 2 repräsentiert eine Ionenklasse, die

neben drei negativen Phosphaten unter anderem eine deprotonierte Base, basierend auf vorherigem Abschnitt an letzter Stelle der Sequenz, involviert. Die Abstraktion des Protons fand gemäß den Gasphasenaziditäten statt [17] (siehe Abbildung 35)<sup>2</sup>. Im Gegensatz dazu vertritt Typ 3 die Klasse der deprotonierten Hydroxyle (5-Ende). Die zur Simulation einer deprotonierten Base bzw. Hydroxylgruppe unumgängliche Modifizierung der Kraftfeldparameter wurde anhand einer simplen Erneuerung der Partialladungen aller betroffenen Atome vollzogen. Alle anderen Parameter blieben unverändert.



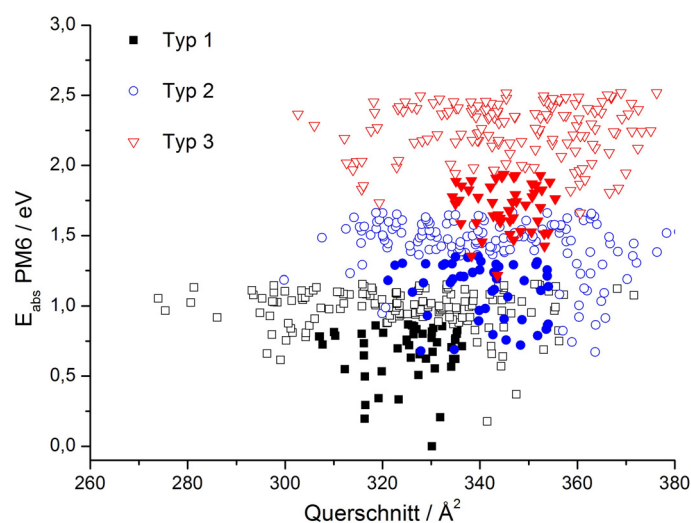
**Abbildung 35:** Links: Strukturtypen (1), (2) und (3), Rechts: deprotonierte Nukleinbasen. Die Deprotonierung des Guanins fand an der Aminogruppe gemäß [17] statt, obwohl laut [76] die N1-Position zumindest in der kondensierten Phase bevorzugt wäre.

Die Durchführung eines *simulated annealing*-Zyklus wurde anschließend zur Suche des globalen Minimums genutzt. Hierzu wurde die Molekulardynamik der mithilfe der Optimierungsmethoden *steepest descent* und *conjugate gradient* geometrieoptimierten Startstruktur bei einer Temperatur von  $T = 500$  K für 50 ps simuliert, innerhalb von 10 ps auf Raumtemperatur ( $T = 300$  K) gekühlt und ein weiteres Mal optimiert. Die gespeicherten neuen Koordinaten kamen als Startstruktur für einen anknüpfenden annealing-Prozess zum Einsatz. Ein Abbruch dieses automatisierten Verfahrens fand nach einer vordefinierten Anzahl solcher Zyklen ( $dA_5^{4-} / dG_5^{4-}$  jeweils 1000,  $dC_5^{4-} / dT_5^{4-}$ : 500) statt, die neuen Koordinaten dienten zur Stoßquerschnittsberechnung sowie einer quantenchemischen Rechnung auf Grundlage der semiempirischen Methode PM6, die im Programmpaket

<sup>2</sup> Das in kondensierter Phase azideste Proton des Guanins entspricht dem N1H [76]. Die korrespondierenden GPAs sind in [17] nicht enthalten, daher wurde zur Rechnung ein Proton der Aminogruppe entfernt. Vergleichbare Rechnungen mit einem deprotonierten Guanin an N1 ergaben außerdem keine nennenswerten Unterschiede.

MOPAC implementiert ist. Die Methode PM6 liefert unter anderem den Wert der HOMO-Energie, die nach Koopman (siehe Kapitel 2.4.1) der VDE genügt.

Im Optimalfall kann eine Auftragung der Absolutenergie in Abhängigkeit des Stoßquerschnitts jeder während des annealing-Prozesses entstandenen Struktur einer Ionensorte dazu dienen, die im Experiment dominanten Konformerfamilien vorauszusagen. Abbildung 36 vereinigt die gemäß PM6-Absolutenergie 200 günstigsten Strukturen der gerechneten Typen 1, 2 und 3 des Ions  $dA_5^{4-}$  in einem Diagramm. Alle Werte müssen als Relativwerte zum globalen Minimum (der Struktur mit niedrigstem  $E_{abs}$ ) gesehen werden.



**Abbildung 36:** PM6 Energie  $E_{abs}$  als Funktion des Stoßquerschnitts der energetisch günstigsten Strukturen jeden Typs von  $dA_5^{4-}$ . Strukturen die zur Bildung der Mittelwerte verwendet wurden, sind als ausgefüllte Symbole dargestellt (siehe Text).

Typ 1 besitzt sowohl den geringsten Stoßquerschnitt, der im Mittel dem Typ A ( $322 \text{ \AA}^2$ ) genügt als auch die aus energetischer Sicht günstigste Absolutenergie. Wesentlich höher (ab etwa  $0,75 \text{ eV}$  über dem globalen Minimum) liegen die erzeugten Strukturen des Typs 2, die eine deprotonierte Adeninbase mit einbeziehen. Der Erwartungswert des Stoßquerschnitts von schätzungsweise  $345 \text{ \AA}^2$  (hinsichtlich dieses Diagramms) weicht nur minimal von dem im Experiment beobachteten Typ B ( $338 \text{ \AA}^2$ ) ab. Als noch ungünstiger können die Strukturen des Typs 3 beurteilt werden, die eine deprotonierte Hydroxylgruppe einschließen. Auch hier wird ein mittlerer Stoßquerschnitt von ungefähr  $345 \text{ \AA}^2$  vorausgesagt.

Unter Berücksichtigung dieser theoretischen Resultate wird die Anwesenheit negativer Adeninbasen gestützt. Weitere Indizien könnte eine Analyse der PM6-HOMO-Energien liefern, die mit den vertikalen Detachmentenergien korrespondieren. Die Betrachtung einer einzigen Struktur kann hier (bei diesen ausgedehnten Systemen) nicht mehr als ausreichend aussagekräftig in Betracht gezogen werden. Aus diesem Grund wurden die Strukturen jeden



Typs nach einem bestimmten Schema aussortiert und Mittelwerte der HOMO- sowie der Absolutenergien unter der folgenden Hypothese gebildet: Der im Experiment bestehende Typ A gleicht Typ 1, während Typ B den theoretischen Typ 2 oder 3 erfüllt (da für Ionen, die deprotonierte Hydroxylgruppen oder Nukleinbasen besitzen [17,65], eine geringere Detachmentenergie vorausgesagt wird). Basierend auf den beiden experimentellen Stoßquerschnitten wurden alle erzeugten Geometrien entfernt, deren theoretischer Stoßquerschnitt um mehr als 5 % von diesen abweicht. Nach dem Sortieren der verbliebenen Strukturen nach ihrer PM6-Absolutenergie fand eine Berechnung der HOMO- bzw. Absolutenergiemittelwerte der 50 besten Strukturen (gemäß der PM6-Energie der verbliebenen Ionen nach der Aussortierung bezüglich deren Stoßquerschnitte) statt. Exakt dieselbe Prozedur kam bei den Ionen  $dC_5^{4-}$ ,  $dT_5^{4-}$  und  $dG_5^{4-}$  zum Einsatz. Hinsichtlich der Tatsache, dass von  $dC_5^{4-}$  und  $dT_5^{4-}$  lediglich 500 Geometrien erzeugt wurden, fand die Mittelwertbildung aus nur 25 Strukturen statt. In Tabelle 2 sind alle berechneten Daten zusammengefasst. Eine experimentelle Bestimmung der vertikalen Detachmentenergien wurde in Anbetracht der Gegebenheit, dass Dichtefunktionalrechnungen solcher Systeme eine beinahe kontinuierliche elektronische Zustandsdichte voraussagen, nicht ausgeführt, auch wenn die PES Maxima beinhalten [66]. Demzufolge werden zum Vergleich die adiabatischen Detachmentenergien herangezogen, wobei aufgrund der Diskrepanz experimenteller und theoretischer Detachmentenergien Relativwerte zugrunde gelegt werden.

	$E_{abs}(1)$	$E_{abs}(2)$	$E_{abs}(3)$	$E_{HOMO}(1)$	VDE (2)- VDE (1)	VDE (3)- VDE (1)	ADE(A)	ADE (B) - ADE (A)
$dC_5^{4-}$	0,3	1,4	1,8	-2,5	-1	-0,1	0,9	-0,8
$dT_5^{4-}$	0,3	0,8	1,7	-3,1	-0,3	-0,8	1,5	-0,9
$dA_5^{4-}$	0,7	1,1	1,7	-2	-0,8	-0,4	0,5	-0,9
$dG_5^{4-}$	0,8	1	2,4	-2,3	-0,4	-0,3	0,4	-0,5

**Tabelle 2:** Berechnete Mittelwerte der Absolutenergien  $E_{abs}$  von Typ 1, 2 und 3, HOMO-Energien  $E_{HOMO}$  von Typ 1 sowie die gemittelten VDE-Relativenergien. Zum Vergleich sind die experimentellen adiabatischen Detachmentenergien gezeigt. Alle Werte sind in eV angegeben.

Die gerechnete VDE des Typs 3 von  $dA_5^{4-}$  fällt im Vergleich zu Typ 1 um 0,4 eV geringer aus. Die Differenz von Typ 2 und Typ 1 von 0,8 eV zeigt hingegen eine bessere Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten Relativwert ADE (Typ B - Typ A) von -0,9 eV. Die Mittelwertbildung der Absolutenergien ausgesuchter Strukturen ergeben, dass Typ 2 im Mittel 0,4 eV bzw. Typ 3 1,0 eV oberhalb von Typ 1 liegt. Eine Analyse der Absolutenergien der anderen Ionen  $dC_5^{4-}$ ,  $dT_5^{4-}$  und  $dG_5^{4-}$  stellt sich als analog heraus. Aus energetischer Betrachtungsweise liegt Typ 2 generell unterhalb von Typ 3. Auch die relativen

Detachmentenergien zeigen mit dem Experiment eine bessere Korrespondenz, wenn Typ B dem Typ 2 zugewiesen wird. Eine Ausnahme stellt lediglich das Ion  $dT_5^{4-}$  dar.

Schlussendlich können die theoretischen und experimentellen Ergebnisse am besten in Einklang gebracht werden, wenn dem im Experiment beobachteten Typ B der gerechnete Typ 2 (mit deprotonierten Nukleinbasen) zugeordnet wird. Infolgedessen bestätigen die Resultate aus theoretischen Rechnungen die postulierte Präsenz deprotonierter Nukleinbasen in der Gasphase. Unter Einbeziehung der sequenzabhängigen PES-Messungen sollten diese bevorzugt an den Enden des Strangs vorhanden sein.

### 5.1.9 Photodetachment Mechanismus

Bisher wurden die unterschiedlichen PES hinsichtlich der allgemeinen Form (Struktur) gewissen Typen an Ionen zugeordnet, wobei die charakteristische Signatur des Typs B als Detachment von Elektronen einer deprotonierten Nukleinbase interpretiert wurde. Im Folgenden erfolgt eine semiklassische Abschätzung postulierter Übergänge unter Gebrauch von Gleichung (5.1). Generell zählen die Überschusselektronen eines Multianions zur Klasse schwach gebundener und demzufolge als potentiell mithilfe eines PES-Experiments erfassbare Photoelektronen. Eine andere Sorte stellen die in  $\pi$ -Systemen involvierten Elektronen dar. Im Besonderen bei der Anwesenheit von Guaninbasen wurden schon Detachmentprozesse neutraler Nukleinbasen beobachtet [15,75].

Zur Abschätzung der vertikalen Übergänge nach Gleichung (5.1) müssen die genauen Positionen der Überschussladungen bekannt sein. Daneben ist die Abschätzung der vertikalen Energien anhand von Gleichung (5.1) in dieser Form auf das Ablösen von Überschussladungen limitiert. Unter der Hypothese, dass alle Elektronen innerhalb des Coulombfeldes der Überschussladungen um einen entsprechenden Betrag an Coulombenergie elektrostatisch angehoben werden, erhält man folgende Modifikation:

$$VDE^{n-} = VDE^{m=0} - \sum_{i=1}^n \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\sigma r_i} \quad (5.2)$$

$VDE^{m=0}$  genügt jetzt der VDE einer neutralen Gruppe, wie z.B. einer Nukleinbase. Im Gegensatz zu Gleichung (5.1) wird die Summe über alle Überschussladungen gebildet<sup>3</sup>. Mithilfe der mittleren Abstände der Überschussladungen der Pentanukleotidtetraanionen (Typ A / 1), die in Tabelle 3 aufgelistet sind, lassen sich die vertikalen Übergänge abschätzen.

---

<sup>3</sup> Negative Gruppe: n = 3, neutrale Gruppe: n = 4

Hierzu wurden gemäß der Sortierung aller Geometrien nach Stoßquerschnitten und PM6-Absolutenergien die 10 besten Strukturen herangezogen.

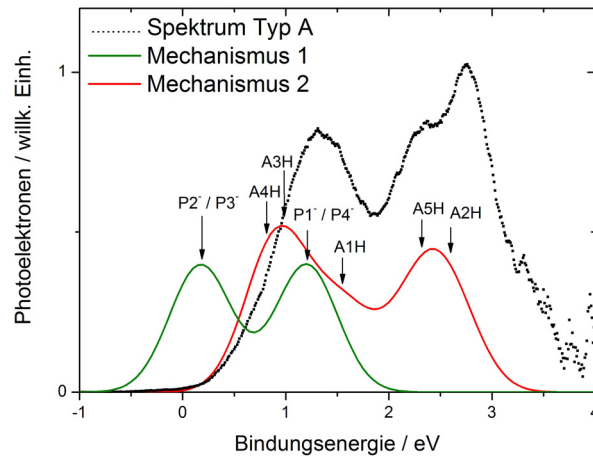
	$\Omega_{\text{kalk}} [\text{Å}^2]$	$P_{12}$	$P_{13}$	$P_{14}$	$P_{23}$	$P_{24}$	$P_{34}$	$\Omega_{\text{exp}} [\text{Å}^2]$	$\text{ADE}_{\text{exp}}$	Base	VDE
$\text{dC}_5^{4-}$	295	6,1	11,2	16,7	6,8	11,7	7,0	279,0	0,9	C	8,9
$\text{dT}_5^{4-}$	340	6,2	12,9	18,7	7,3	13,1	6,3	336,0	1,5	T	9,2
$\text{dA}_5^{4-}$	324	6,7	11,9	17,6	7,2	12,2	6,6	322,0	0,5	A	8,4
$\text{dG}_5^{4-}$	327	6,5	12,1	18,1	7,0	11,9	7,4	328,0	0,4	G	8,0

**Tabelle 3:** Gemittelte Abstände  $P_{ij}$  der Phosphate  $i$  und  $j$  aller Pentanukleotidtetraanionen der 10 besten Strukturen des Typs 1 (der mit Typ A übereinstimmt) mit dem mittleren Stoßquerschnitt  $\Omega_{\text{kalk}}$ . Zudem sind die vertikalen Detachmentenergien der neutralen Nukleinbasen gezeigt. Abstände sind in Å, Energien in eV angegeben.

Diese Phosphat-Phosphat-Abstände stimmen im Allgemeinen näherungsweise miteinander überein. Die beiden Phosphate  $P_2$  und  $P_3$  im Zentrum des Moleküls sollten im Vergleich zu  $P_1$  und  $P_4$  gemäß Gleichung (5.1) kleinere Detachmentenergien zu eigen haben. Unter der Annahme einer gleichen dielektrischen Abschirmkonstante  $\sigma$  aller vier Ionensorten kann durch Betrachten der P-P-Abstände eine Reihenfolge der Bindungsenergien ermittelt werden. Wird postuliert, dass die am schwächsten gebundenen Elektronen auf den Phosphaten lokalisiert sind, resultiert daraus der folgende Trend:  $\text{dC}_5^{4-} < \text{dT}_5^{4-} \approx \text{dG}_5^{4-} \approx \text{dA}_5^{4-}$ , der bei der Gegenüberstellung der experimentell bestimmten adiabatischen Detachmentenergien nicht bekräftigt werden kann. Auffallend erscheint dessen ungeachtet die direkte Korrelation der experimentellen Detachmentenergien (Typ A) und der Ionisationspotentiale der neutralen Nukleinbasen:  $G < A < C < T$ , sodass möglicherweise ein dominierendes Ablösen der Elektronen von den Basen vollzogen wird.

Demgemäß werden nun zwei verschiedene Prozesse (Mechanismus 1 und 2) diskutiert und die Banden der PES von  $\text{dA}_5^{4-}$  (1) abgeschätzten Übergängen unter Verwendung von Gleichung (5.1) und (5.2) gegenübergestellt.

Mechanismus 1 sieht lediglich ein Ablösen der Elektronen von den deprotonierten Phosphaten vor, während sich Mechanismus 2 auf reines Detachment von Elektronen der Nukleinbasen konzentriert. Von Desoxyriboseeinheiten stammende Photoelektronen werden angesichts der wesentlich größeren Ionisationspotentiale außer Acht gelassen [77]. Die zur Rechnung verwendete VDE der Phosphate beträgt 5,0 eV [78], die VDE der neutralen Adeninbase entspricht 8,4 eV [79]. Eine Skizzierung der geschätzten vertikalen Übergänge als Superposition von Gaußfunktionen bei einer dem Experiment angepassten Halbwertsbreite von 0,6 eV führt zu den in Abbildung 37 gezeigten Übergängen des  $\text{dA}_5^{4-}$  Typ A. Alle Übergänge werden als äquivalent betrachtet, auch im Bereich der RCB-Schwelle.

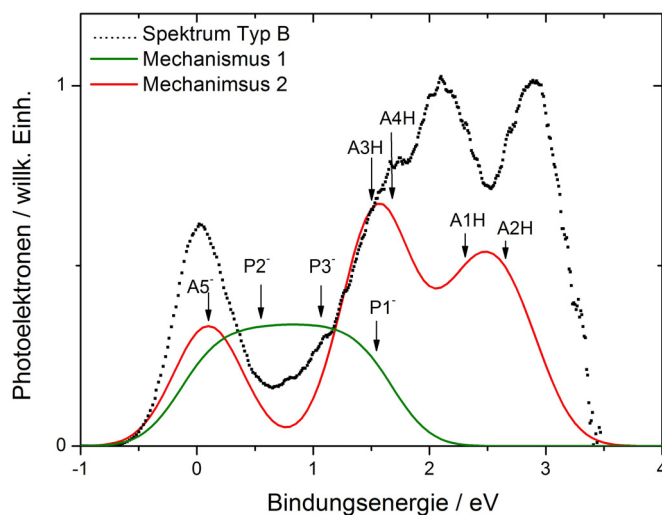


**Abbildung 37:** *Abgeschätzte Detachmentenergien der beiden postulierten Detachmentprozesse von  $dA_5^{4-}$  Typ A.  $P_i^-$  bezeichnet ausgehend vom 5-Ende die negativ geladene Phosphatgruppe Nummer  $i$ ,  $A_iH$  die neutrale Adeninbase Nummer  $i$ .*

Ausgehend von Mechanismus 1 werden zwei Banden erwartet, die hinsichtlich der Analogie von P2 und P3 bzw. P1 und P4 aus zwei überlagerten Photodetachmentsignalen aufgebaut sind. Durch Extrapolation der ersten ansteigenden Flanke erhält man eine ADE von -0,4 eV, die unterhalb der experimentell bestimmten ADE liegt. Demnach erfüllt entweder die dielektrische Abschirmkonstante  $\sigma$  einen von eins verschiedenen Wert oder der postulierte Mechanismus 1 tritt in außerordentlich geringerem Ausmaß auf. Im Gegensatz dazu sagt Mechanismus 2 eine ADE von 0,3 eV voraus, die in guter Korrespondenz mit dem Experiment steht. Wären die gerechneten Strukturen bezüglich deren 5- bzw. 3-Ende symmetrisch (siehe außerdem Abbildung 39), sollten die Übergänge von A5H und A1H bzw. A2H und A4H bei ähnlicher Bindungsenergie erscheinen. Daneben müsste A3H die am schwächsten gebundenen Elektronen bereitstellen. Dieser Sachverhalt lässt sich nicht bestätigen. Gemäß dieser Abschätzung besitzt A4H die geringste VDE (liegt im stärksten Coulombfeld), A2H die größte, die Elektronen liegen demgemäß energetisch oberhalb der an den Enden des Strangs lokalisierten Elektronen von A1H und A5H.

Eine Beschreibung auf gleicher Basis kann auch dem  $dA_5^{4-}$  Typ B zugrunde gelegt werden. Die Ladungsverteilung des zugehörigen Typs 2 (mit deprotoniertem Adenin) ist in Abbildung 35 dargestellt. Hier müsste in die Diskussion mit einbezogen werden, dass die negative Ladung der Adeninbase streng genommen nicht als eine auf einem Stickstoff der Aminogruppe lokalisierte Punktladung beschrieben werden kann. Vielmehr sollte eine aus dem  $\pi$ -System des Adenins resultierende Delokalisierung der Ladung auftreten. Trotzdem ist zur Berechnung der vertikalen Übergänge die Kenntnis der Koordinaten aller Überschussladungen zwingend erforderlich. Daher wurde die negative Ladung des Adenins durch eine Punktladung approximiert, die in der Mitte des Purinsystems lokalisiert ist.

Mechanismus 1, der nur ein Ablösen der Überschusselektronen vorsieht, umfasst demnach Elektronen von den Phosphaten P1, P2, P3 und A5. Mechanismus 2 beinhaltet nach wie vor ausschließlich ein Ablösen der Elektronen von Adeninbasen. Die in beiden Mechanismen notwendige VDE des deprotonierten Adenins  $A5^-$  betrug 3,0 eV [17]. Die berechneten Übergänge sind in Abbildung 38 dargestellt.



**Abbildung 38:** Abgeschätzte Detachmentenergien des  $dA_5^{4-}$  Typ B.  $A5^-$  entspricht dem Übergang einer negativen Adeninbase.

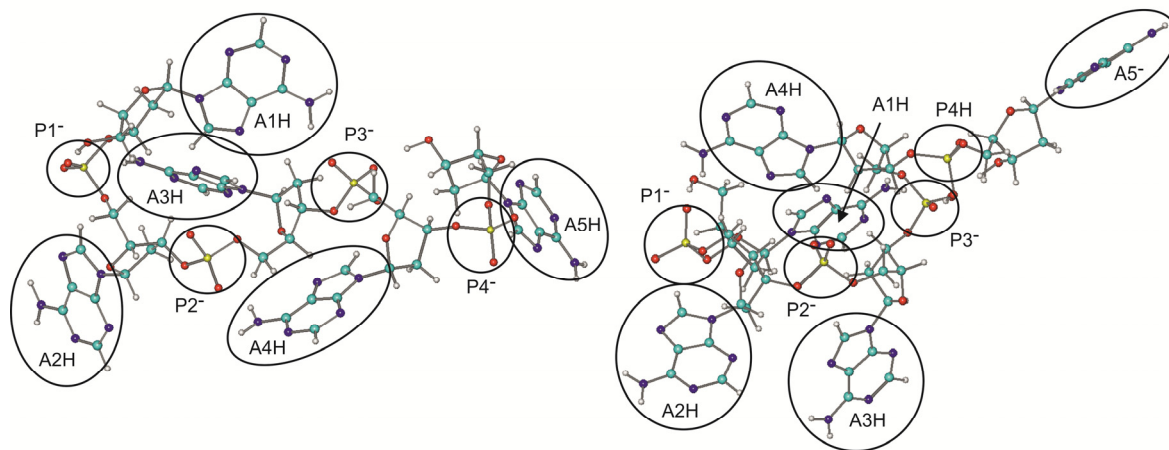
Die unter Mechanismus 1 vollzogenen Annahmen führen zu einer ADE von -0,5 eV. Diese ist demzufolge in guter Übereinstimmung mit dem Experiment. Aufgrund der verminderten Symmetrie der Überschussladungen differieren die geschätzten Detachmentenergien in allen vier Fällen. Ein dem experimentellen PES vergleichbares Spektrum wird offensichtlich nicht vorausgesagt. Im Gegensatz dazu genügt Mechanismus 2 (rote Kurve) eher den experimentell beobachteten Übergängen. Eine niederenergetische Bande resultiert aus dem Ablösen von Elektronen aus der negativen Adeninbase  $A5^-$ . A3H und A4H sowie A1H und A2H zeigen größere Detachmentenergien von ungefähr 1,5 und 2,5 eV.

Mechanismus 2, der ein dominantes Ablösen der Photoelektronen von den Basen vorsieht, kann im Allgemeinen eine bessere Übereinstimmung der PES beider Klassen von  $dA_5^{4-}$  gewährleisten. PES umfassen dennoch alle Kategorien möglicher Mechanismen, sodass die gemessenen Spektren im Grunde eine Superposition verschiedener Prozesse darstellen, die entsprechend ihren wellenlängenabhängigen Detachmentquerschnitten gewichtet sind. Insbesondere eine Berücksichtigung stärker gebundener Photoelektronen wäre notwendig. Das kleinste Analogon der Phosphatgruppe (der behandelten Oligonukleotide)  $H_2PO_4^-$  besitzt, relativ zur hier ausschließlich betrachteten energetisch niedrigsten Bande, um 0,8 bzw. 1,3 eV stärker gebundene Zustände [78]. Unter Umständen könnten auch ungleiche tautomere

Formen der Nukleinbasen (z.B. aufgrund zu großer Injektionsspannung) erscheinen, die abweichende vertikale Detachmentenergien besitzen [80,81,82,83]. Auch die erwartete Existenz einer nahezu kontinuierlichen Zustandsdichte für Systeme solcher Größe wurde bereits erwähnt, sodass die vorgenommenen Näherungen zur Beschreibung möglicher Detachmentprozesse als kritisch erachtet werden müssen. Trotzdem scheint aufgrund der direkten Korrelation der Ionisationspotentiale der Basen und der experimentell bestimmten adiabatischen Detachmentenergien von Typ A ein Ablösen der Photoelektronen direkt von einer neutralen Base bevorzugt stattzufinden.

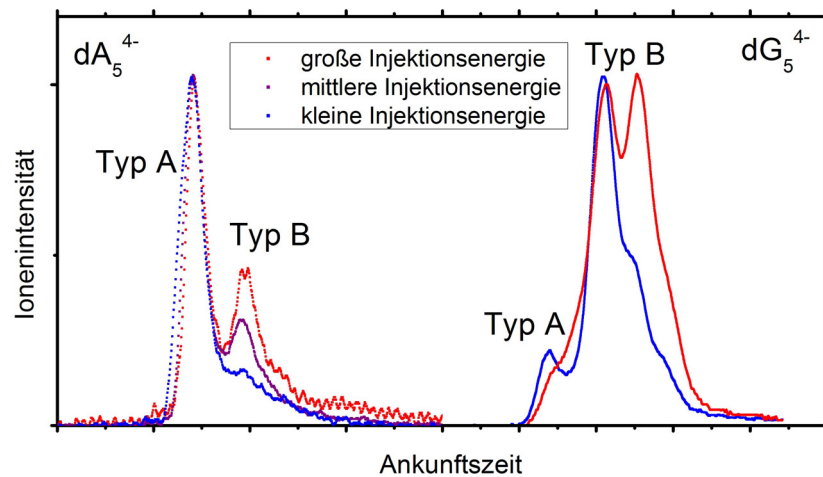
### 5.1.10 Abschließende Diskussion

Für viele der untersuchten mehrfach geladenen Anionen konnten in der Gasphase Konformere beobachtet werden, die bezüglich ihrer elektronischen Struktur durch die Existenz einer niederenergetischen Bande auffallen. Dies konnte auf die Gegenwart von in biologischen Systemen nicht agierende negativ geladene Nukleinbasen an den Enden der Sequenz zurückgeführt werden. Die Ursache ihrer Präsenz liegt vermutlich in einer deutlichen Verringerung der repulsiven Coulombwechselwirkung aller Überschussladungen begründet. Abbildung 39 enthält repräsentative Strukturen der beiden Konformerenklassen von  $dA_5^{4-}$ .



**Abbildung 39:** Repräsentative Strukturen von  $dA_5^{4-}$  Typ A (links) und Typ B (rechts)

Generell fallen die Abstände der Überschussladungen von Typ A bei P1, P2, P3 und P4 geringer aus. Eine Berechnung der gesamten Coulombenergie (der vier Überschussladungen) des Typs A ergibt einen Wert von 8,9 eV. Der entsprechende Betrag des Typs B beträgt 7,2 eV und liegt damit 1,7 eV darunter. Beiläufig zeigen die Ankunftszeiten der Pentanukleotidtetraanionen eine auffällige Abhängigkeit von den Injektionsbedingungen, die in Abbildung 40 anhand der Ionen  $dA_5^{4-}$  und  $dG_5^{4-}$  dargestellt ist.



**Abbildung 40:** Abhängigkeit der Ankunftszeiten ( $dA_5^{4-}$  und  $dG_5^{4-}$ ) von den jeweiligen Injektionsenergien

Die Gasphasenform des  $dA_5^{4-}$  zeigt unter milden Injektionsbedingungen hauptsächlich Typ A, dessen Intensität bei Erhöhen der Injektionsspannung zugunsten von B abnimmt. Ähnliche Reaktionen lassen sich bei genauer Analyse des guaninhaltigen Analogons feststellen. Während die Dichte an Ionen des Typs A abnimmt, kommt es zu einer Zunahme an Ionen des Typs B. Dies lässt folgende Schlussfolgerung zu: Offensichtlich scheint Typ B zumindest partiell ein Folgeprodukt des thermisch aktivierten Typs A zu sein. Die kollisionsinduzierte Anregung provoziert demzufolge einen intramolekularen Protonentransfer von einer Base zu einer negativ geladenen Phosphatgruppe. Aus kinetischer Wahrnehmung würde ein Transfer zwischen benachbarten Gruppen wie z.B. P4 und A5 am effizientesten vonstattengehen, insbesondere bei der Gegenwart intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen. Transfer vom dem einen zum anderen Ende des Oligonukleotidstrangs kann dagegen als weniger wahrscheinlich in Betracht gezogen werden, da die gemessenen Stoßquerschnitte von Typ A eher linearen Ketten gleichen. Wegen der Molekulardynamik bei Raumtemperatur stellen diese jedoch ausschließlich Mittelwerte dar. Findet relativ zur Zeitskala des Ionenmobilitätsexperiments schnelle Interkonversion zwischen offenen und kompakten Strukturen statt, wird lediglich ein Stoßquerschnitt bestimmt, der einem Stoßquerschnitt gewichtet mit der relativen Häufigkeit der beiden Konformationen entspricht. Demnach kann die Existenz geringer Mengen ringförmiger Konformationen nicht ausgeschlossen werden. Werden diese über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten, bestünde das Endprodukt nach der Aktivierung in einer deprotonierten Base und einer neutralen Phosphorsäureeinheit an entgegengesetzten Enden. Spielt nur die Verminderung der repulsiven Coulombenergie eine Rolle, so ist ein intramolekularer Transfer an den Enden der Sequenz begünstigt, was ein in Abbildung 39 gezeigtes Isomer zur Folge hat.

Zusammenfassend stellt Typ B ein aus dem Entfernen des ladungsmindernden Lösungsmittels resultierendes Produkt dar. Die Korrelation seines prozentualen Anteils von der Injektionsenergie lässt darauf schließen, dass das Elektrosprühen zu einer Bildung der Ionen des Typs A führt, also zunächst die in kondensierter Phase relevante Form mit negativen Ladungen ausschließlich auf den Phosphaten abbildet. Kollisionsinduziertes Heizen begünstigt die finale Bildung des Typs B bei synchroner Minderung der Coulombabstoßung der Überschussladungen, sodass Typ B aller Wahrscheinlichkeit nach bei Ionen kleinerer Ladungsdichte nicht in Erscheinung tritt.

### **5.2 Telomere Sequenz und Quadruplexe**

Nachdem Kenntnisse über die elektronischen Strukturen von Oligonukleotidanionen gewonnen wurden, erfolgt nun ein Wechsel zu biologisch relevanteren Systemen wie der telomeren Sequenz oder kürzeren Duplexen (von insgesamt 16 Basen pro Strang). Es wird vorausgesetzt, dass deren elektronische Eigenschaften nur in Konformationen existent sind, die der biologisch relevanten Struktur verwandt sind. Daher werden im Gegensatz zu den bisher getätigten Betrachtungen niedrigere Ladungszustände untersucht. Größere Ladungszustände begünstigen potentiell eher Strukturen, die nicht den Konformationen der kondensierten Phase gleichen.

Die telomere Sequenz stellt einen bestimmten Sequenzabschnitt an den Enden der Chromosomen dar [84]. Beim Menschen entspricht die Abfolge der Basen  $(5\text{-T}_2\text{AG}_3\text{-}3)_n$ . Aufgrund des Endreplikationsproblems wird diese während jeder Zellteilung verkürzt [85]. Der erhöhte Guaningehalt bewirkt die Affinität zur Bildung von Quadruplexen [86]. Im Gegensatz zu Watson-Crick-Basenpaaren sind sie aus vier Guaninbasen aufgebaut, die unter der Ausbildung von Hoogsten-Basenpaaren einen Komplex formen. Eingelagerte Kationen im inneren Kanal haben eine zusätzliche Stabilisierung des Komplexes zur Folge [87].

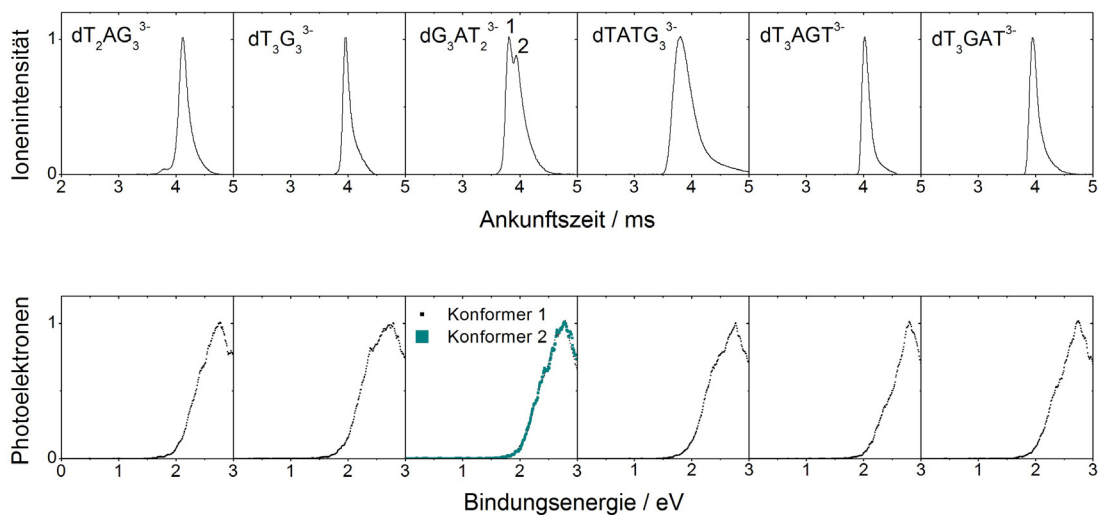
Üblicherweise verläuft die Oxidation der DNA bevorzugt in guaninreichen Zonen ab. Zum Teil lässt sich diese Sachlage auf das niedrige Ionisierungspotential gestapelter Guaninbasen zurückführen, andererseits findet Ladungstransfer innerhalb der DNA bevorzugt zu solchen Zonen statt, da hier die beste Stabilisierung eintritt [88]. Ab initio Rechnungen konnten belegen, dass das IP einer Abfolge von drei übereinander gestapelten Guaninbasen um etwa 0,7 eV unterhalb eines Guanins liegt [89,90]. Genau diese Aneinanderreihung ist auch in der telomeren Sequenz  $d\text{T}_2\text{AG}_3$  realisiert. Dieser Konstellation geht eine weitere Purinbase Adenin sowie zwei Thyminbasen voraus. Von allen Kombinationen möglicher gestapelter Nukleinbasen besitzt die Anordnung GA nach GG das zweitniedrigste IP [89].



Im vorherigen Abschnitt wurde vermutet, dass das Ablösen von Elektronen von Oligonukleotiden möglicherweise primär von den Basen stattfindet. Werden vergleichsweise niedrige Ladungszustände analysiert, sodass der Strukturtyp B nicht beachtet werden muss, dann entspricht der vertikale Endzustand eines n-fach geladenen Anions einem Ion, das eine Nukleinbase mit positivem Loch und n negativ geladene Phosphatgruppen besitzt. Bestehen im vertikalen Endzustand gestapelte Basen bzw. findet eine räumliche Überlappung der  $\pi$ -Systeme statt, sodass das verbleibende positive Loch bestmöglich stabilisiert bzw. delokalisiert wird, so erscheint der vertikale Übergang im Vergleich zu einer Referenzsequenz im PES bei geringerer Bindungsenergie. Ob derartige elektronische Phänomene bei der telomeren Sequenz in Erscheinung treten, soll im folgenden Abschnitt geklärt werden. Hierzu werden Photoelektronenspektren der telomeren Sequenz in bestimmten Ladungszuständen von Hexanukleotiden und Ikonanukleotiden mit Referenzspektren verglichen. Außerdem wird die Eigenschaft der telomeren Sequenz Quadruplexe zu bilden ausgenutzt, um die elektronische Struktur dieser in der DNA vorkommenden intramolekularen Anordnung zu untersuchen.

### 5.2.1 Hexanukleotide

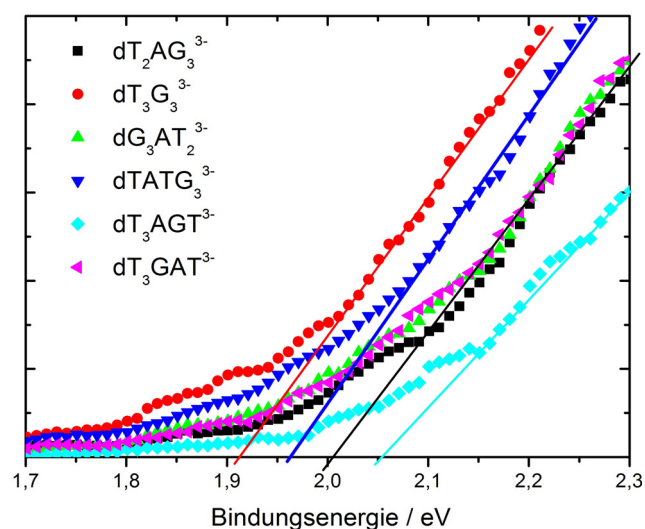
In Abbildung 41 sind die Ankunftszeiten und PES (266 nm) der Hexanukleotidtrianionen der telomeren Sequenz  $dT_2AG_3$  und einiger anderer Vergleichssequenzen dargestellt.



**Abbildung 41:** Ankunftszeiten und PES (266 nm) der telomeren Sequenz  $dT_2AG_3^{3-}$  sowie einiger Referenzsequenzen

Im Allgemeinen können verhältnismäßig verbreiterte Ankunftszeitverteilungen beobachtet werden, sodass ein Gemisch verschiedener Konformere existierend ist, die möglicherweise auf der Zeitskala des Experiments interkonvertieren. Nur  $dG_3AT_2^{3-}$  zeigt zwei zeitlich auflösbare Konformere, deren PES allerdings identisch sind. Alle aufgenommenen PES

bestehen aus einer breiten Bande, die im Bereich um 2,0 eV beginnt. Für den besseren Vergleich sind in Abbildung 42 alle PES in dieser Umgebung vergrößert dargestellt.



**Abbildung 42:** Vergrößerte PES im Bereich der ansteigenden Flanken, nur ein PES der identischen  $dG_3AT_2^{3-}$  - Spektren ist dargestellt.

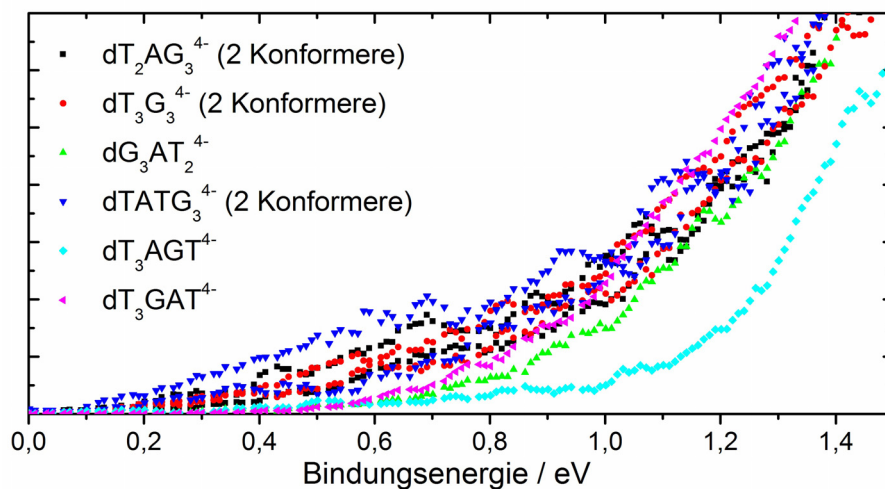
Das Ion  $dT_3G_3^{3-}$  besitzt die geringste ADE. Eine um 0,1 eV größere ADE zeigt das Trianion der telomeren Sequenz  $dT_2AG_3$ .  $dG_3AT_2^{3-}$  sowie  $dT_3GAT^{3-}$  verfügen über nahezu identische adiabatische Detachmentenergien. Eine Verschiebung um 50 meV zu größeren Bindungsenergien zeigt  $dT_3AGT^{3-}$ .  $dTATG_3^{3-}$  dagegen weist eine Bindungsenergie zwischen der von  $dT_2AG_3^{3-}$  und  $dT_3G_3^{3-}$  auf. Bis auf minimale elektronische Verschiebungen der PES lassen sich keine signifikanten Unterschiede erfassen. Nennenswerte Differenzen hinsichtlich einer beständigen  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung, insbesondere bei einer Abfolge von drei Guaninbasen oder einem  $AG_3$ -Element, können daher nicht eindeutig registriert werden. Folgende Ursachen könnten zutreffend sein: Im vorherigen Abschnitt wurde abgeleitet, dass das Ablösen von Photoelektronen von den Basen als sehr wahrscheinlich betrachtet werden kann, beachtliches Detachment von Elektronen der Phosphateinheiten lässt sich dennoch nicht ausschließen. Werden die Elektronen von negativ geladenen Phosphateinheiten abgelöst, hätte dies im Wesentlichen, je nach Konformation, elektronische Verschiebungen der Banden im PES zur Folge. Außerdem könnten strukturelle Eigenschaften verantwortlich sein. Typischerweise zeigen Systeme solcher Größe eine sehr flexible Molekulardynamik. Messbare Effekte werden aber nur dann erfasst, wenn die dominante Konformation gestapelte Basen einbezieht. Ferner entspricht der Stoßquerschnitt (Tabelle 4) des  $dT_2AG_3^{3-}$  keiner kompakten Struktur. Es ist also ohnehin ungewiss, ob gestapelte Basen überhaupt in Erscheinung treten. Als auffällig erweist sich dessen ungeachtet die Tatsache, dass das Ion

$dT_3G_3^{3-}$  im Vergleich zu allen anderen Sequenzen (außer  $dTATG_3^{3-}$ ) eine um 0,1 eV niedrigere Bindungsenergie besitzt. Bestünde eine partiell vorhandene  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung, hätte ein ladungsinduzierter Entfaltungsprozess zu gestreckten Konformationen eine Minderung dieser Wechselwirkung zur Folge. Daher sollen zunächst die elektronischen Strukturen der Tetraanionen besprochen werden.

	Stoßquerschnitt / $\text{\AA}^2$	ADE / eV
$dT_3G_3^{3-}$	332	1,90
$dT_2AG_3^{3-}$	350	2,00
$dG_3AT_2^{3-}$	309 / 323	2,00
$dTATG_3^{3-}$	331	1,95
$dT_3AGT^{3-}$	327	2,00
$dT_3GAT^{3-}$	332	2,05

**Tabelle 4:** Stoßquerschnitte und adiabatische Detachmentenergien der Hexanukleotidtrianionen

Deren PES (266 nm) sind in Abbildung 43 im Bereich der ansteigenden Flanke in vergrößerter Ansicht gezeigt.



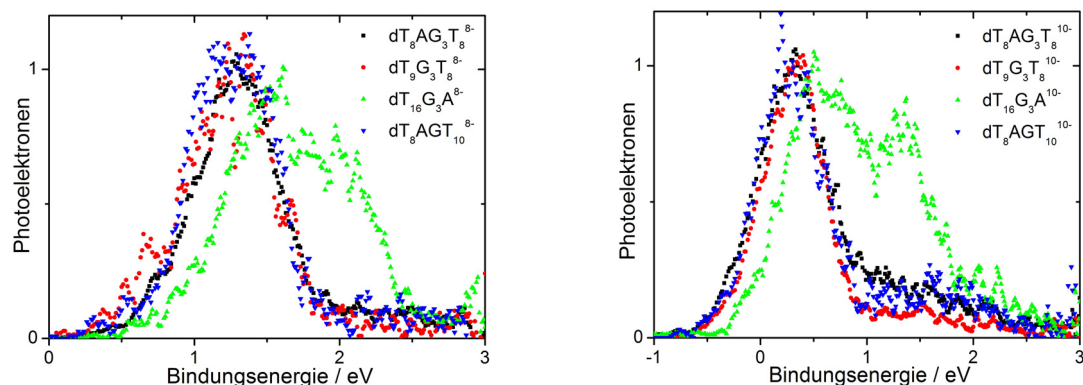
**Abbildung 43:** Vergrößerte Photoelektronenspektren (266 nm) der Tetraanionen

$dT_3G_3^{4-}$  (2 Konformere) sowie die anderen G3-reichen Sequenzen  $dG_3AT_2^{4-}$  und  $dTATG_3^{4-}$  (2 Konformere), die telomere Sequenz  $dT_2AG_3^{4-}$  (2 Konformere) und auch  $dT_3GAT^{4-}$  besitzen ungefähr gleiche adiabatische Detachmentenergien.  $dT_3AGT^{4-}$  verfügt über die größte Bindungsenergie. Vermutlich lässt sich dieser Sachverhalt mit einer Versetzung der Base mit niedrigstem Ionisierungspotential zu minimal geringerem Coulombfeld (negativer Ladungsdichte der Phosphatgruppen) begründen. Im Gegensatz zu allen anderen Sequenzen enthält es kein Guanin an der dritten bzw. vierten Position der Sequenz, wo die von allen Ladungen erzeugte Coulombenergie bei einer postulierten symmetrischen Anordnung der Basen und Phosphatgruppen am größten ist.

Schlussendlich können im Hinblick auf außergewöhnliche elektronische Effekte der telomeren Sequenz  $dT_2AG_3$  keine Besonderheiten abgeleitet werden. Läge die Ursache in einer zu chaotischen Molekulardynamik des Systems begründet, könnte sich der Einsatz längerer Sequenzen als Vorteil erweisen. Infolgedessen werden im nächsten Abschnitt die PES von Iksanukleotiden besprochen.

### 5.2.2 Iksanukleotide

Deren PES (266 nm) sind in Abbildung 44 abgebildet.



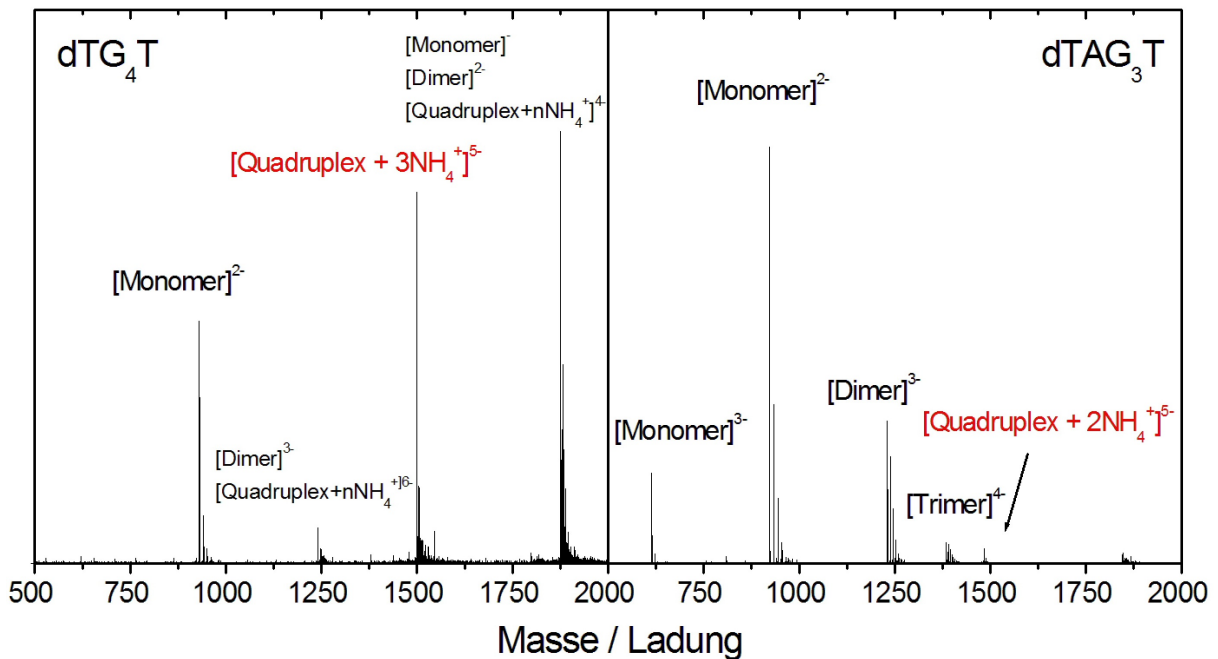
**Abbildung 44:** PES (266 nm) der Iksanukleotidoktaanionen (links) und Iksanukleotiddecaanionen (rechts)  $dT_8AG_3T_8^{8-}$ ,  $dT_9G_3T_8^{8-}$  und  $dT_8AGT_{10}^{8-}$  sowie deren verwandte Decaanionen zeigen keine offensichtlichen Unterschiede bezüglich ihrer elektronischen Strukturen. Unter Umständen werden die Spektren durch die Überzahl der vertretenen Thyminbasen beherrscht, sodass Photodetachmentprozesse gestapelter Guaninbasen nicht hinreichend erfasst werden, oder die Molekulardynamik verbietet die Ausbildung solcher Einheiten.

Beide Ladungszustände des  $dT_{16}G_3A$  besitzen im Vergleich zu den Referenzsequenzen größere adiabatische Detachmentenergien. Abermals wird deutlich, dass die Bindungsenergie einer Sequenz steigt, sobald die Basen mit geringerem Ionisierungspotential (Guanin und Adenin) am Ende der Sequenz, bei vermutlich geringerer negativer Ladungsdichte, lokalisiert werden. (siehe  $dT_{16}G_3A$  in Abbildung 44, das zu größeren Bindungsenergien verschobene Spektren zeigt).

### 5.2.3 Quadruplexe

Eine Möglichkeit, guaninreiche Sequenzen als relativ starres Gerüst in einer gestapelten Anordnung in der Gasphase zu untersuchen, stellen Quadruplexe dar. Mithilfe von Ionenmobilitätsmessungen konnte belegt werden, dass die Anordnungen eines aus vier Strängen bestehenden  $[dTG_4T]_4$  und  $[dT_2AG_3]_4$  auch in der Gasphase auf der Zeitskala des IMS-Experiments erhalten bleiben [91].

Die Bildung eines Quadruplexes erfolgte in einer 600  $\mu\text{M}$  Lösung des Analyten in 150 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung, die auf 80  $^\circ\text{C}$  erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. Gesprüht wurde eine 150  $\mu\text{M}$  Lösung aus Wasser / Methanol im gleichen Verhältnis. Die telomere Sequenz  $\text{dT}_2\text{AG}_3$  zeigte zur photoelektronenspektroskopischen Untersuchung keine ausreichende Signalintensität. Deshalb wurde auf die Sequenz  $\text{dTAG}_3\text{T}$  zurückgegriffen. Die an der Orbitrap aufgenommenen Massenspektren sind in Abbildung 45 dargestellt.



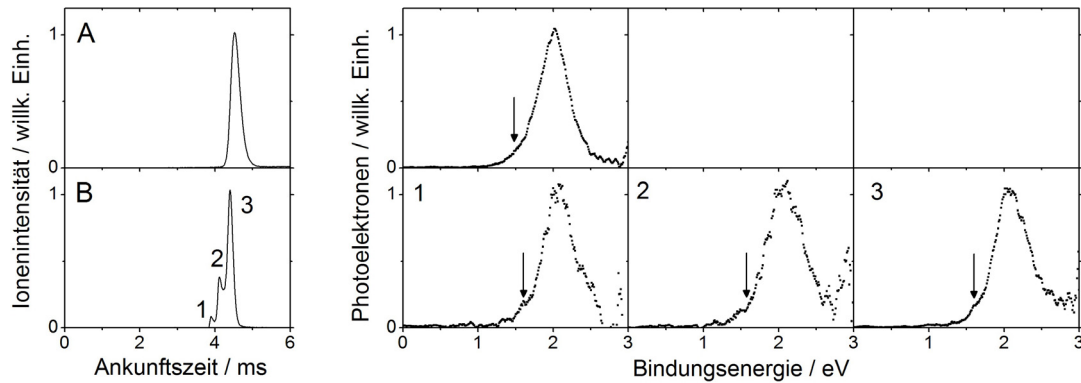
**Abbildung 45:** Massenspektren der Sequenzen  $\text{dTG}_4\text{T}$  (links) und  $\text{dTAG}_3\text{T}$  (rechts)

Das MS der Sequenz  $\text{dTG}_4\text{T}$  zeigt ein ausgeprägtes Signal des Quadruplexpentaanions mit drei eingeschlossenen Ammoniumionen. Im Massenspektrum der  $\text{dTAG}_3\text{T}$ -Lösung lassen sich primär Monomere, Dimere und Trimere beobachten. Die relative Intensität des Quadruplexpentaanions ist verhältnismäßig klein. Außerdem schließt der Quadruplex lediglich zwei Ammoniumionen ein.

Die Ankunftszeiten und PES (266 nm) der beiden Quadruplexe  $[(\text{dTG}_4\text{T})_4 + 3\text{NH}_4^+]^{5-}$  (=A) und  $[(\text{dTAG}_3\text{T})_4 + 2\text{NH}_4^+]^{5-}$  (=B) sind in Abbildung 46 dargestellt. Aus Intensitätsgründen wurde als Stoßgas (in der Driftzelle) die von außen einströmende Luft verwendet. Analog [91] zeigt die Driftzeitverteilung von A ein breites Signal. Die ADE beträgt 1,5 eV. Die Ankunftszeitverteilung von B lässt auf drei verschiedene Konformere schließen. Die beinahe identischen PES führen zu adiabatischen Detachmentenergien von 1,6 eV.

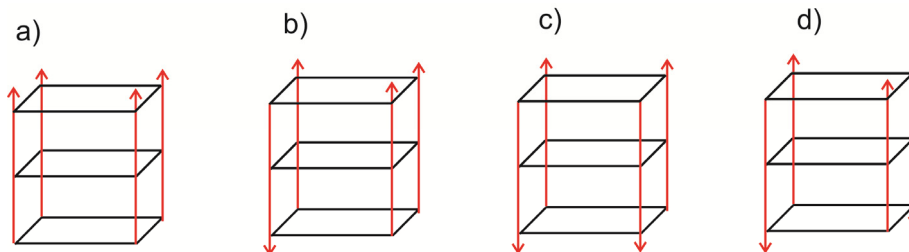
Aus einem Vergleich von Mobilitätsmessungen in Luft und Helium können die experimentell bestimmten Luftstoßquerschnitte der beiden Quadruplexe näherungsweise in Heliumstoßquerschnitte umgerechnet werden. Die hierfür erforderliche Kalibrierung verlief

mithilfe eines aus 16 Basen bestehenden Oligonukleotidstrangs<sup>4</sup>. Auf diese Weise beträgt der Stoßquerschnitt des Quadruplexes A  $810 \text{ \AA}^2$ . Die Abweichung zum bestimmten Heliumstoßquerschnitt aus [91], der einer quadruplexartigen Struktur gleicht, beträgt 4 %. Die drei Konformere von B besitzen Stoßquerschnitte von  $742 \text{ \AA}^2$  (1),  $783 \text{ \AA}^2$  (2) und  $826 \text{ \AA}^2$  (3).



**Abbildung 46:** Ankunftszeiten (links) und PES (266nm, rechts) der Quadruplexpentaanionen von  $dTG_4T$  (A) und  $dT_2AG_3$  (B)

Generell bestehen vier verschiedene Möglichkeiten aus vier Einzelsträngen einen Quadruplex zu formen, je nachdem ob die Stränge parallel oder antiparallel angeordnet werden: Folglich können Konformationen gebildet werden, bei denen alle Stränge parallel (Abbildung 47, (a)), einer antiparallel (b) oder zwei entweder benachbart (c) oder entgegengesetzt antiparallel (d) vorliegen.



**Abbildung 47:** Konformationen, eines aus vier Strängen aufgebauten Quadruplexes, siehe außerdem [91]

Die Konformere (2) und (3) von B besitzen Stoßquerschnitte, die einer der eben beschriebenen Konformationen eines Quadruplexes entsprechen. Eine exakte Zuordnung kann jedoch zum einen wegen der Ungenauigkeit der experimentellen Stoßquerschnitte und zum anderen aufgrund fehlender struktureller Informationen, die beispielsweise aus Molekulardynamiksimulationen der möglichen Konformationen zugänglich wären, nicht getroffen werden. (1) dagegen erfüllt eine noch kompaktere Struktur, die unter Umständen auch einem sphärischen Tetramer gleicht. Unklar ist außerdem, inwiefern sein PES vom

<sup>4</sup> Der Fehler dieser Methode kann nur geschätzt werden und bezieht sich vermutlich auf einige Prozent, siehe außerdem Anhang B.

wesentlich dominanteren Konformer (2) bei minimal größeren Ankunftszeiten beherrscht wird.

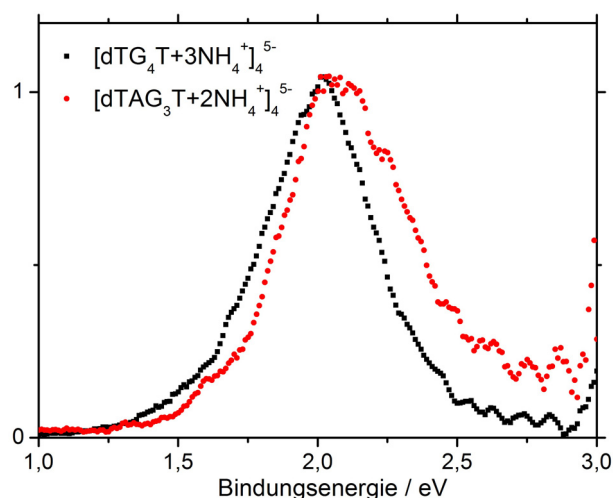
Wird ein Detachmentmechanismus postuliert, in dem die Photoelektronen ausschließlich von den Guaninbasen abgelöst werden, so kann unter Zuhilfenahme von Gleichung (5.2) die VDE geschätzt werden. Hierzu wurde die Röntgenstruktur eines parallelen dTG<sub>4</sub>T-Quadruplexes 2GW0.pdb [92] herangezogen. Da gemäß dem Massenspektrum das Quadruplexpentaanion drei Ammoniumionen einschließt, die sich wahrscheinlich innerhalb des inneren Kanals zwischen den einzelnen G4-Schichten befinden, resultieren daraus acht negativ geladene Phosphateinheiten. Aufgrund der Präsenz positiver Ladungen (mit der Anzahl  $m$ ) wird Gleichung (5.2) wie folgt modifiziert:

$$\text{VDE}^{n-} = \text{VDE}^0 - \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\sigma} \left( \sum_{i=1}^{n+m} \frac{1}{r_i^-} - \sum_{j=1}^m \frac{1}{r_j^+} \right) \quad (5.3)$$

Wird postuliert, dass jeder der vier Stränge zwei negative Phosphatgruppen an Position P2 bzw. P4 (ausgehend vom 5-Ende) beinhaltet, so kann die Detachmentenergie dieser Ladungsverteilung jeden einzelnen Guanins geschätzt werden. Unter Anwendung einer Abschirmkonstante von  $\sigma = 1$  ließ sich ein Minimalwert von 3,6 eV ermitteln, während das PES eine Bande bei einer Bindungsenergie von bereits 2,0 eV umfasst. Die Verwendung einer realistischeren Abschirmkonstante (für diese kompakte Struktur) würde zu einer noch beachtlicheren Widersprüchlichkeit führen. Entweder findet folglich ein überlegenes Ablösen der Photoelektronen von den Phosphatgruppen statt, die den bisher beobachteten Befunden widersprechen oder aber eine effiziente Überlappung der  $\pi$ - Systeme bewirkt, dass das nach dem Ablösen der Photoelektronen verbleibende positive Loch nicht auf nur einem Guanin lokalisiert ist. Würde eine Delokalisierung über vier gestapelte Guaninbasen stattfinden, hätte dies eine Abnahme der Bindungsenergie (im Vergleich zu einem elektronisch isolierten Guanin) zur Folge. Eine Delokalisierung innerhalb einer G4-Ebene erscheint dagegen quasi unwahrscheinlich. Anhand von Dichtefunktionalrechnungen konnte bewiesen werden, dass keine Kopplung der  $\pi$ -Systeme der Guaninbasen über die Wasserstoffbrückenbindungen der Hoogstenbasenpaare hinaus stattfindet [93].

In Abbildung 48 sind die PES des Quadruplexes A und des dominanten Konformers (3) von B zum Vergleich in einem Diagramm dargestellt. Wird dementsprechend eine Guaninbase durch eine Adeninbase ausgetauscht, so verschiebt sich die im PES beobachtete Bande um 0,1 eV zu größeren Bindungsenergien. Die Existenz von nur zwei eingelagerten Ammoniumionen (B) lässt darauf schließen, dass gegebenenfalls nur drei übereinander

gestapelte Ebenen an Purinbasen bestehen (im Vergleich zu A). Daher wird der Quadruplex aller Wahrscheinlichkeit nach von drei Guaninebenen gebildet, während die Adeninbasen außerhalb des gestapelten Aufbaus vorliegen, sodass, wenn überhaupt, nur eine schwache elektronische Kopplung der  $\pi$ -Systeme des Guaninsystems und der Adeninbasen stattfinden kann. Demgemäß liegt die elektronische Verschiebung von 0,1 eV eventuell in einer Reduzierung der Guaninebenen begründet (also in der Differenz der vertikalen Detachmentenergien eines G4- und G3-Elements).



**Abbildung 48:** Vergrößerte Darstellung der PES der Quadruplexe  $A = [(dTG_4T)_4 + 3NH_4^+]^{5-}$  und  $B = [(dTAG_3T)_4 + 2NH_4^+]^{5-}$

#### 5.2.4 Abschließendes Fazit

Die Bestimmung der elektronischen Struktur ausgewählter Sequenzen wie der telomeren Sequenz oder anderer besonders guaninreicher Abfolgen sollte dazu dienen, besondere elektronische Phänomene wie Ladungsdelokalisierung nach elektronischer Anregung zu untersuchen. Das Hexanukleotidtrianion  $dT_3G_3^{3-}$  zeigt minimale Anhaltspunkte, dass solche guaninreiche Zonen (wie auch theoretisch erwartet) eine vergleichsweise minimal geringere Bindungsenergie aufweisen. Keine Differenzen im Hinblick auf die elektronische Struktur kann der telomeren Sequenz  $dT_2AG_3$  zugrunde gelegt werden. Die PES der Ikosanukleotidanionen zeigen ferner keine Besonderheiten.

Die Spektren der Guaninquadruplexe können nur erklärt werden, indem eine  $\pi$ -Delokalisierung postuliert wird. Um 0,1 eV unterschiedliche adiabatische Detachmentenergien besitzen die Quadruplexanionen  $[dTG_4T]_4^{5-}$  und  $[dTAG_3T]_4^{5-}$ . Als eine potentielle Erklärung kann der Übergang von einem aus vier zu drei Ebenen bestehenden Quadruplex genannt werden.



Ob die Ursache dieser Verschiebung wirklich auf eine bessere Delokalisierung der verbleibenden positiven Ladung zurückgeführt werden kann, könnte mithilfe zeitabhängiger Dichtefunktionalrechnungen geklärt werden. Substituieren der Nukleinbasen innerhalb des Quadruplexes könnte weitere Informationen liefern, ebenso wie eine Analyse intramolekularer einsträngiger Systeme [94].

Schlussendlich können jedoch nur minimale Differenzen zwischen den aus dTG<sub>4</sub>T und dTAG<sub>3</sub>T gebildeten Quadruplexen erfasst werden. Dem telomeren Strukturelement AG<sub>3</sub> lässt sich demzufolge im Vergleich zu G<sub>4</sub>, welches außerdem Bestandteil der telomeren Sequenz einiger Einzeller ist [95], keine besonderen Eigenschaften bezüglich der Stabilisierung des Systems nach UV-Anregung bzw. dem Herauslösen von Elektronen zuordnen.

### 5.3 DNA

In der DNA, die die Erbinformation speichert, bilden zwei Polynukleotidstränge unter Ausbildung von paarweisen Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleinbasen eine Doppelhelix, wobei grundsätzlich immer Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin miteinander als sog. Watson-Crick-Basenpaare in Wechselwirkung treten. Diese Anordnung von Basenpaaren beinhaltet die Information zur Synthese von Proteinen. Jeweils drei nacheinander folgende Basenpaare entsprechen einer Aminosäure. Die B-Form ist die typische Erscheinungsform der DNA. Sie erscheint als rechthändige Schraubenform, wobei eine Windung aus ungefähr 10 Basenpaaren besteht. Diese liegen horizontal übereinander gestapelt, sodass es zu einer partiellen Überlappung der auf den Basen ansässigen  $\pi$ -Systemen kommt, worin außerdem der Superaustauschladungstransfer begründet liegt [96]. In der A-Konformation besteht eine der rechthändigen Windungen aus 11 Basenpaaren. Eine weitere, seltenere Erscheinungsform stellt die linkshändige Z-DNA dar.

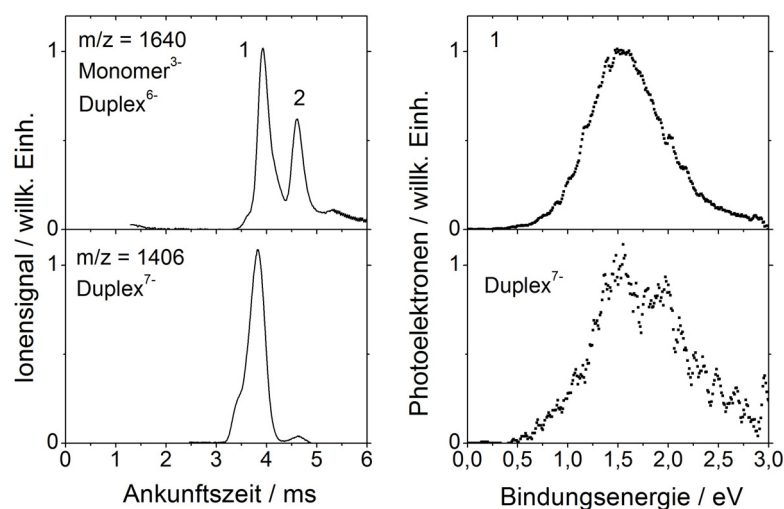
Anhand von Mobilitätsmessungen wurde belegt, dass die helikale Struktur kürzerer DNA-Stränge auch in der Gasphase teilweise beständig bleibt. Es konnte dokumentiert werden, dass ab einer Länge von zehn Basenpaaren kollabierte helikale Strukturen auf der Zeitskala des Mobilitätsexperiments existent sind [97,98,99]. Über die elektronische Struktur solcher Systeme ist bislang wenig bekannt. So ist fraglich, ob eine effiziente Überlappung der  $\pi$ -Systeme auch in der Gasphase weiterhin besteht.

Ein weiterer in Einzelsträngen nicht auftretender elektronischer Effekt resultiert aus der Wechselwirkung der Basen innerhalb eines GC-Paares, die eine Reformierung der vertikalen Übergänge der Basen Guanin und Cytosin veranlasst. Dies hat zur Folge, dass das Ionisationspotential des Guanins eines GC-Paares um ca. 0,5 eV erniedrigt, während das IP

des Cytosins simultan um den gleichen Betrag angehoben wird [100]. Bei einer verzerrten Basenpaaranordnung könnte diese elektronische Separation geringer ausfallen, die hieraus resultierende Abnahme des Ionisationspotentials von Guanin wäre demzufolge weniger ausgebildet. Auch hier kann das Herauslösen von Photoelektronen aus den  $\pi$ -Systemen der Basen hilfreiche Hinweise liefern. Deshalb werden im folgenden Abschnitt die PES der selbstkomplementären Sequenz dGCGGCCGCGCGGCCGC diskutiert.

### 5.3.1 Experimentelle Befunde

Um eine möglichst große Konzentration an Duplexen zu erzeugen, wurde eine 1 mM wässrige Lösung des Oligonukleotids über den Schmelzpunkt der Duplex erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Schmelzpunkt lässt sich aus dem GC-Gehalt abschätzen und beträgt in etwa 64 °C. Gesprüht wurde eine 150  $\mu$ M Lösung aus Wasser / Methanol im Verhältnis 1:1. In Abbildung 49 sind die Driftzeitverteilungen und PES (266 nm) dieses selbstkomplementären Oligonukleotids bei zwei verschiedenen Masse zu Ladungsverhältnissen dargestellt.



**Abbildung 49:** Ankunftszeiten und PES (266 nm) des selbstkomplementären Oligonukleotids bei  $m/z = 1640$  bzw. 1406

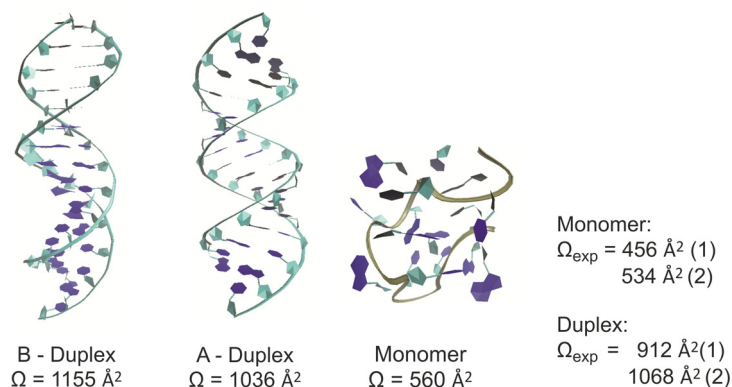
Das Signal bei einem Masse zu Ladungsverhältnis von 1406 kann nur durch die Präsenz eines Duplexheptaanions oder eines entsprechenden Dimers (einer willkürlichen räumlichen Anordnung / Konformation der beiden Nukleotidstränge) erklärt werden. Das PES besteht aus breiten Banden bei 1,5 bzw. 2,0 eV.

Ein nach IMS zeitlich separiertes Ionenpaket von  $m/z$  gleich 1640 umfasst zwei verschiedene Strukturen. Plausibel wären ein Monomertrianion (2) sowie ein Duplexhexaanion (1). Signifikantes Photodetachment bei einer Wellenlänge von 266 nm konnte nur (1) aufweisen.

Erkennbar ist eine breite Bande bei einer Bindungsenergie von 1,5 eV. Die ADE beträgt lediglich 0,8 eV.

### 5.3.2 Vergleich mit Strukturkandidaten

Ein Vergleich theoretisch berechneter Stoßquerschnitte vorgegebener Geometrien mit experimentellen Werten kann wertvolle strukturelle Auskünfte liefern. Daher wurden mithilfe des Programms *nucgen*, das in AMBER 7.0 implementiert ist, Strukturen der selbstkomplementären Sequenz in der A- bzw. B-Konformation gebildet und deren Stoßquerschnitte theoretisch berechnet. Als kompliziert kann die konformelle Vielfalt des Monomers betrachtet werden. Aus diesem Grund wurde eine 2,5 ns andauernde Molekulardynamiksimulation bei  $T = 350$  K durchgeführt und alle 10 ps die Koordinaten der momentanen Struktur gespeichert. In Abbildung 50 sind die berechneten Stoßquerschnitte repräsentativer Geometrien vereinigt. Daneben sind die experimentellen Stoßquerschnitte gezeigt. Diese wurden in Luft bestimmt und (wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben wurde) in die jeweiligen Heliumstoßquerschnitte umgerechnet.

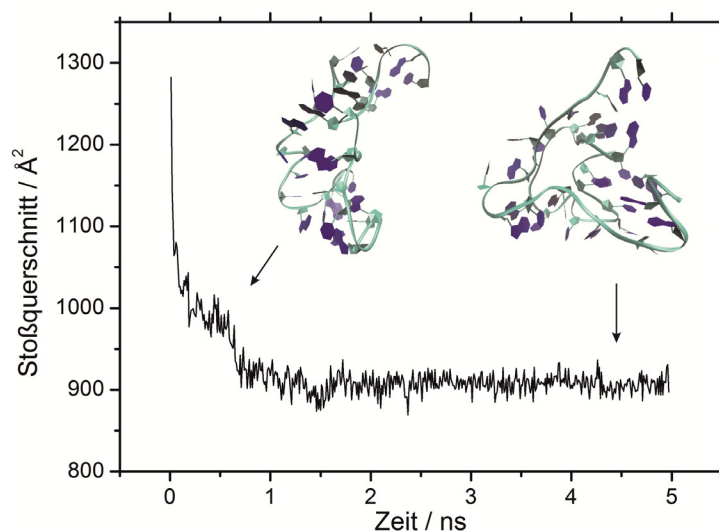


**Abbildung 50:** Relevante Strukturen und deren Stoßquerschnitte sowie die experimentell bestimmten Stoßquerschnitte der potentiellen Monomere oder Dimere

Aus der Molekulardynamiksimulation des Einzelstrangs lassen sich überwiegend sphärische Strukturen extrahieren. Aus dem Vergleich theoretischer und experimenteller Stoßquerschnitte kann geschlossen werden, dass solch eine globuläre Konformation als Kandidat des Ions (2) wahrscheinlich wäre. Erwägbar wäre außerdem eine Duplex, die A-Konformation besitzt. Eine B-Konformation muss bei einer Abweichung des Stoßquerschnitts von 7,5 % ausgeschlossen werden. Keine der gezeigten Geometrien kommen hingegen als Strukturkandidaten von (1) in Frage. Der experimentelle Stoßquerschnitt eines Monomers entspräche einer im Vergleich zu Abbildung 50 noch kompakteren sphärischen Anordnung. Die Abweichung von experimentellem und theoretischem Stoßquerschnitt dieser Struktur beträgt mehr als 20 %. Zwar ließen sich vermutlich noch kompaktere Strukturen realisieren,

allerdings wären Konformationen, die eine Abnahme des Stoßquerschnitts um 20 % zur Folge hätten, undenkbar. (1) muss folglich eine Duplex oder ein Dimer darstellen. Eine Übereinstimmung der experimentellen und theoretischen Stoßquerschnitte liegt dagegen nicht vor, sodass keine Zuordnung zu einer der beiden DNA-Konformationen A oder B erfolgen kann. Demgemäß erfüllt (1) entweder eine kollabierte Duplex, bei der die helikale Struktur noch partiell bewahrt ist oder ein Dimer.

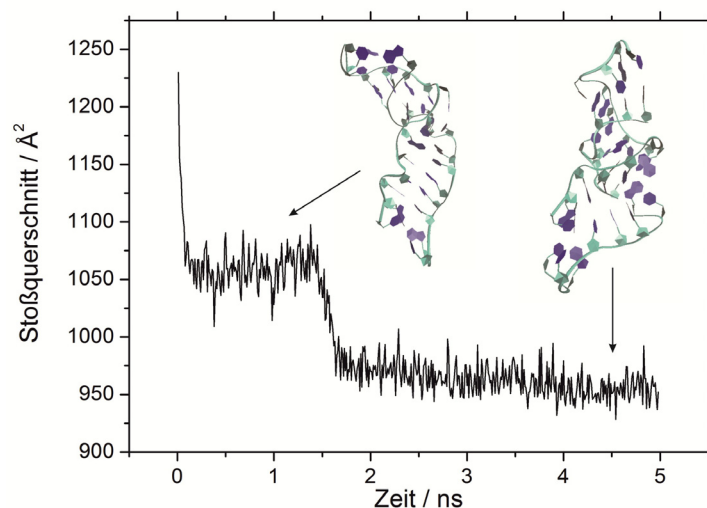
Genauere strukturelle Informationen können einer Molekulardynamiksimulation entnommen werden. Dazu wurden die aus *nucgen* erzeugten Strukturen so modifiziert, dass ein Ladungszustand von sechs generiert wurde. Eine Duplex aus 16 Basenpaaren enthält 30 Phosphorsäureeinheiten. Gemäß der Binominalverteilung beträgt die Anzahl möglicher Ladungsverteilungen eines Hexaanions 593775. Wird angenommen, dass beide Einzelstränge drei Ladungen tragen, sind es immer noch 207025 Permutationen. Zur Minimierung der Coulombabstoßung wurde eine Startstruktur entwickelt, bei der ausgehend vom 3-Ende die erste, sechste und zwölfte, bzw. am zweiten Strang ausgehend vom 5-Ende die vierte, neunte und fünfzehnte Phosphorsäuregruppe deprotoniert wurden. Anschließend fand eine Simulation der A- und B-Konformation bei einer Temperatur von  $T = 350$  K für insgesamt 5 ns statt. Alle 10 ps wurden die momentanen Koordinaten gespeichert, die zur Querschnittsberechnung dienten. Eine Simulation der seltenen Z-Konformation ist nicht erfolgt. In Abbildung 51 sind die Stoßquerschnitte der B-Konformation als Funktion der Simulationszeit aufgetragen.



**Abbildung 51:** Molekulardynamiksimulation der B-Konformation (gezeigt sind die Stoßquerschnitte als Funktion der Simulationszeit)

Bereits innerhalb der ersten Pikosekunden der Simulation vollstreckt sich der Übergang zu einer kollabierten Struktur. Nach etwa 600 ps kann eine weitere Konformationsänderung

beobachtet werden, die während der restlichen Simulationszeit stabil bleibt. Ihr berechneter Stoßquerschnitt von ungefähr  $900 \text{ \AA}^2$  korrespondiert mit dem Experimentalwert von  $911 \text{ \AA}^2$ , sodass diese als ein Strukturkandidat betrachtet werden kann. Die Resultate der Molekulardynamiksimulation der A-Konformation sind in Abbildung 52 dargestellt.



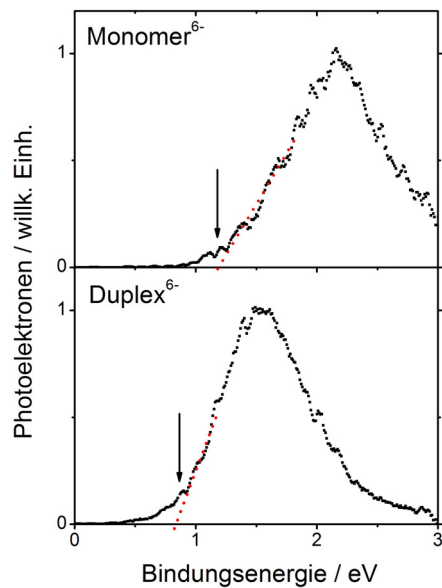
**Abbildung 52:** Molekulardynamiksimulation der A-Konformation (gezeigt sind die Stoßquerschnitte als Funktion der Simulationszeit)

Wieder findet ein rasches Zusammenbrechen der Duplex zu einer kompakteren Struktur statt, die bei 350 K über einen langen Zeitraum besteht. Nach 1,5 ns vollzieht sich die Konformationsänderung in die bei dieser Molekulardynamiksimulation finale Struktur. Mit einem Stoßquerschnitt von ungefähr  $940 \text{ \AA}^2$  beträgt die Abweichung vom experimentellen nur 4 %, womit sie ebenso einen Kandidat von (1) repräsentiert.

Die beiden finalen Konformationen, die beide potentiell als Struktur des Duplexhexaanions in Frage kommen, besitzen weiterhin intakte, wenn auch teilweise verzerrte Basenpaare (siehe Abbildung 51 und Abbildung 52). Inwieweit die aus überlappenden  $\pi$ -Systemen resultierende elektronische Kopplung weiterhin intakt ist, kann aus den Strukturen natürlich nicht abgeleitet werden. Findet keine Wechselwirkung statt, so sollte die Differenz der adiabatischen Detachmentenergien einer Duplex und eines Einzelstrangs (ähnlicher Struktur und Ladung) in guter Näherung die Differenz aus VDE eines GC-Paares und eines Guanins erfüllen. Da ein solches System nicht zugänglich ist, werden im Folgenden die PES des gleichen Ladungszustands eines Monomers näher diskutiert.

### 5.3.3 Vergleich experimenteller Daten von Monomeren und Duplexen

Das PES (266 nm) des Monomerhexaanions ist in Abbildung 53 dargestellt.



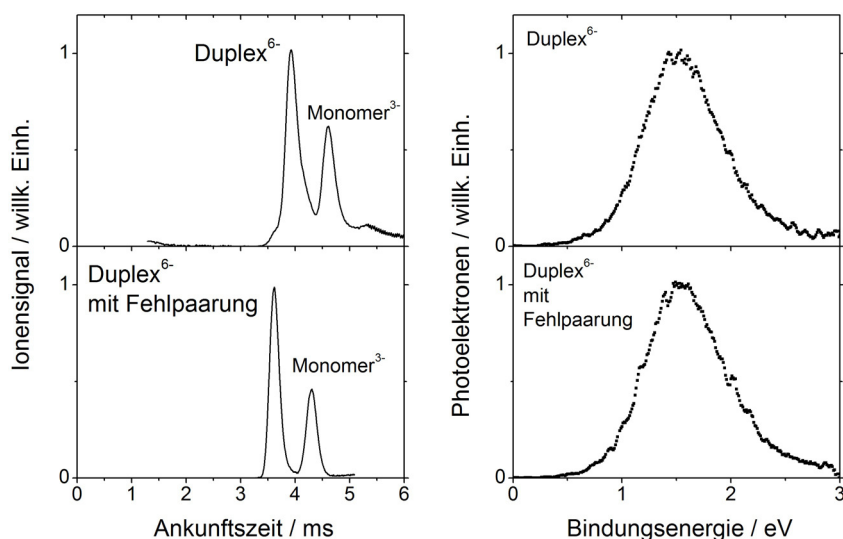
**Abbildung 53:** PES (266 nm) des Monomerhexaanions und des Duplexhexaanions der selbstkomplementären Sequenz

Im PES des Monomers kann eine breite Bande bei etwa 2,2 eV beobachtet werden. Die Extrapolation liefert eine ADE von etwa 1,2 eV und liegt demzufolge 0,4 eV oberhalb der Duplex. Folglich besitzt diese zweifellos kompaktere Struktur im Vergleich zu einer Duplex desselben Ladungszustands stärker gebundene Elektronen. Wird vorausgesetzt, dass die Elektronen hauptsächlich von den Nukleinbasen abgelöst werden, kann dieser Umstand nur dann eintreten, wenn das verbleibende positive Loch bestmöglich stabilisiert wird. Dies vollzieht sich aber nur dann, wenn noch intakte GC-Basenpaare bestehen, deren Ionisationspotentiale besonders gering sind oder eine Delokalisierung der Ladung entlang des noch partiell unversehrten  $\pi$ -Systems besteht. Diese Beobachtungen bekräftigen zudem, dass Konformer (1) kein Dimer (willkürliche Anordnung der beiden Stränge), sondern eine noch partiell intakte Duplex darstellt.

### 5.3.4 Experimenteller Vergleich verwandter Sequenzen

Weitere Hinweise könnten aus Vergleichsmessungen einer verwandten Sequenz gezogen werden. Strukturelle Änderungen können in der Nachbarschaft einer Basenfehlpaarung zu einer Reduzierung der  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung der Basen beitragen. Eine weniger wahrscheinliche Delokalisierung der verbleibenden positiven Ladung hätte unter Umständen eine Verschiebung der beobachteten Bande im PES zu größeren Bindungsenergien zur Folge. Deshalb wurde die elektronische Struktur der Sequenz dGCGGCCGCCCCGCCGC analysiert. Die Basenposition Nummer 9 beinhaltet anstatt eines Guanins ein Cytosin. Beim Erscheinen als Duplex wird sie deshalb in der Mitte eine Basenfehlpaarung (an Position 8 und

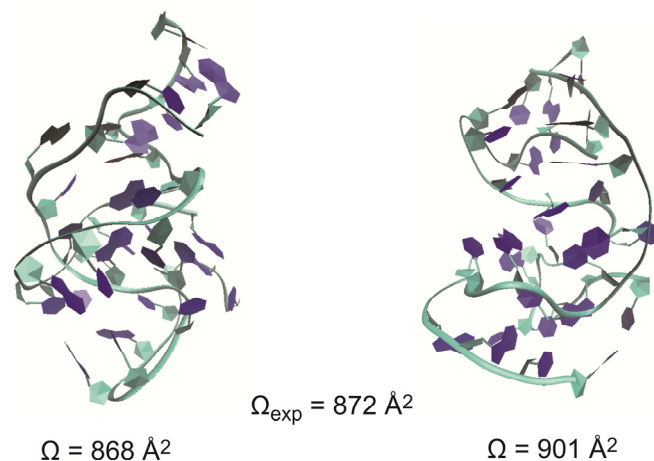
9) besitzen. In Abbildung 54 sind die Ankunftszeiten und PES (266 nm) des Hexaanions gezeigt.



**Abbildung 54:** Ankunftszeiten und PES (266 nm) der beiden Duplexe  $[dGCGGCCGCGCGGCCGC]_2^{6-}$  und  $[dGCGGCCGCCCCGGCCGC]_2^{6-}$

Wieder können zwei verschiedene Strukturen mithilfe IMS zeitlich aufgetrennt werden. Das Ionensignal bei größeren Ankunftszeiten ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf ein Monomer zurückzuführen und wird im Folgenden ignoriert. Der Querschnitt der potentiellen Duplex mit Basenfehlpaarung bei kleinerer Driftzeit beträgt  $872 \text{ \AA}^2$  und liegt damit 4 % unterhalb der verwandten Duplex. Demnach zeigen sich anhand der Querschnitte keine kennzeichnenden strukturellen Eigenheiten. Ebenso können dem PES keine signifikanten Unterschiede entnommen werden. Die ADE beträgt auch hier 0,8 eV.

Hinweise, inwiefern die Strukturen der untersuchten Duplexe vergleichbar sind, lieferte eine Molekulardynamiksimulation. A- und B-Konformationen der Duplex  $(dGCGGCCGCCCCGGCCGC)_2$  wurden mithilfe von *nucgen* erzeugt. Eine 2 ns andauernde Simulation dieser beiden Strukturen bei  $T = 350 \text{ K}$ , der eine identische Ladungsverteilung wie der bereits untersuchten zugrunde gelegt wurde, erzeugte Strukturkandidaten. Zwei repräsentative sind in Abbildung 55 dargestellt.



**Abbildung 55:** Repräsentative Strukturen der fehlgepaarten Duplex: A-Konformation (links), B-Konformation (rechts)

Die Stoßquerschnitte beider Strukturen wären im Rahmen des Fehlerbereichs des Experiments vereinbar. Beide Ausgangsstrukturen liefern kollabierte Duplexe. Basenpaare bzw. gestapelte Nukleinbasen sind zwar stark verzerrt, aber möglicherweise noch immer intakt.  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen scheinen wahrscheinlich. Auswirkungen der Basenfehlpaarung können daher weder aus struktureller noch aus elektronischer Sicht (PES) erfasst werden.

### 5.3.5 Abschließende Diskussion

Im letzten Abschnitt wurde untersucht, inwiefern elektronische Kopplungsphänomene von GC-Basenpaaren sowie gestapelten  $\pi$ -Systemen der DNA in der Gasphase nach dem Entfernen des Lösungsmittels bestehen bleiben. Eine Duplex wird beim Elektrosprühen einer selbstkomplementären Sequenz bestehend aus 16 Nukleinbasen beobachtet. Es lässt sich belegen, dass diese Duplex im Vergleich zu ihrem Einzelstrang im selben Ladungszustand eine kleinere ADE besitzt. Als Ursachen kommen eine Reorganisation der Ionisationspotentiale der Guaninbasen nach der Ausbildung von GC-Basenpaaren sowie eine noch beständige elektronische Kopplung der  $\pi$ -Systeme in Frage. Diese Effekte bleiben existent, wenn eine Vergleichssequenz mit formeller Basenfehlpaarung spektroskopiert wird. Ob die Differenzen hinsichtlich der adiabatischen Detachmentenergien von Duplexen und Monomeren auch in anderen Ladungszuständen erfüllt sind, ist unbekannt. Eine extrem asymmetrische Ladungsverteilung der Duplex (die als eine weitere plausible Ursache der vergleichsweise geringen ADE genannt werden kann), könnte auf diese Weise als weniger wahrscheinlich in Betracht gezogen werden. Als für die Interpretation von entscheidender Bedeutung könnte sich eine Berechnung der vertikalen Detachmentenergien verzerrter GC-Basenpaare mithilfe zeitabhängiger Dichtefunktionalrechnung erweisen. Aus diesen Beträgen könnte abgeschätzt werden, in welchem Umfang eine zusätzliche  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zur



---

Interpretation der PES herangezogen werden muss. Die Tatsache, dass die ADE einer Struktur, die aller Wahrscheinlichkeit nach deutlich größere Abstände der Ladungen besitzt als ihr verwandtes Monomer, um 0,4 eV kleiner ausfällt, während die Abnahme der VDE eines Guanins in geordneten Basenpaaren lediglich 0,5 eV beträgt, kann als Hinweis einer noch zum Teil beständigen Überlappung der  $\pi$ -Systeme in der Gasphase bewertet werden.

## 6 Peptide und Proteine

Peptide bzw. Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaute Polymere. Es existieren 20 natürlich vorkommende Aminosäuren, die unter Ausbildung einer Amidbindung zu den Peptiden oder Proteinen polymerisieren. Der Übergang von Peptiden zu Proteinen ist über die Anzahl der verknüpften Aminosäuren definiert, wobei als Richtwert eine Anzahl von etwa 100 Aminosäuren genannt werden kann. Ein bedeutendes Kriterium bezüglich seiner Funktion besteht in seiner Struktur / Konformation, die von der jeweiligen Sequenz des Proteins beherrscht wird. Aufgrund der Komplexität wird die Struktur bzw. Faltung des Proteins üblicherweise in vier Stufen unterteilt. Die Primärstruktur erfüllt die Sequenz, also die Abfolge der Aminosäuren. Als Sekundärstruktur wird die Faltung des Peptid- oder Proteinrückgrates bezeichnet. Mögliche Struktur motive stellen beispielsweise die  $\alpha$ -Helix oder die  $\beta$ -Faltblattstruktur dar. Die räumliche Anordnung dieser Strukturtypen entspricht der Tertiärstruktur. Diese wird von den intramolekularen Wechselwirkungen der Seitenketten z.B. durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder Disulfidbindungen zwischen zwei Cysteinseitenketten dominiert. Die nächste übergeordnete Struktur, beispielsweise wegen der Formierung von Oligomeren, stellt die Quartärstruktur dar.

Die Bildung dieser Strukturen wird vor allem durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst. Infolge der Polarität der funktionellen Gruppen des Proteins bzw. seiner Polarisierbarkeit findet eine ausgeprägte elektrostatische Abschirmung der Ladungen statt. Diese dielektrische Abschirmung oder intramolekulare Dielektrizitätskonstante genügt einer komplizierten Funktion aller Ortskoordinaten. Im Allgemeinen sind Aminosäuren, die polare Seitenketten besitzen, eher an der Oberfläche des Proteins beheimatet, während unpolare Reste vermehrt im Inneren des Proteins angetroffen werden. Wird noch der zusätzlich stark polarisierende Effekt des Wassers berücksichtigt, kann die intramolekulare Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  näherungsweise als eine von innen nach außen kontinuierlich wachsende Funktion betrachtet werden [101,102,103]. Je nach Protein werden im Inneren mittlere Werte von  $\epsilon = 2-5$  erzielt. Diese Konstante nähert sich nach außen hin sukzessive dem Wert von Wasser ( $\epsilon = 78$ ) an [104,105]. Vergleiche von theoretischen und experimentellen Methoden ergaben Anhaltspunkte, dass auch Gasphasenproteine nach dem Entfernen des Lösungsmittels Dielektrizitätskonstanten von zwei oder mehr zu eigen haben [106,107]. Für eine gegebene Struktur vorgegebener Ladungsverteilung kann aus einem Vergleich experimenteller vertikaler Detachmentenergien und einem aus Gleichung (5.1) berechneten Wert, die Abschirmkonstante  $\sigma$ , die der gemittelten intramolekularen

Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  entspricht, bestimmt werden. Neue Hinweise, inwiefern nennenswerte Unterschiede von beispielsweise nativer und denaturierter Form gegenwärtig sind, könnte konformerenaufgelöste PES von Proteinanionen erzielen. Im übernächsten Abschnitt sollen nun die konformerenaufgelösten Photoelektronenspektren der in der Literatur bereits vielfach diskutierten Proteine Cytochrom C,  $\alpha$ -Lactalbumin sowie Insulin besprochen werden.

### 6.1 Peptide

Vorab erfolgt jedoch eine Betrachtung der Photoelektronenspektren einiger ausgewählter Peptide zur Gewinnung fundamentaler Kenntnisse bezüglich deren Detachmentprozesse im Allgemeinen. Die Aziditäten der Seitenketten der natürlichen Aminosäuren in wässriger Lösung genügen folgendem Trend: ASP > GLU > CYS > TYR. Hingegen lautet die Reihenfolge der Aziditäten einiger funktioneller Gruppen in der Gasphase: COOH (ASP, GLU) > Imidazol (HIS) > Phenol (TYR) > Indol (TRP) > Thiol (CYS) [108,109,110,111,112]. Demgemäß sollten beim Sprühen mehrfach geladener Anionen die negativen Überschussladungen in Form deprotonierter Carboxylatgruppen in Erscheinung treten. Die VDE einer isolierten Carboxylatgruppe beträgt in etwa 3,5 eV [32], die Abschirmung durch positiv polarisierte Gruppen kann diesen Betrag signifikant anheben. Infolge von Wasserstoffbrückenbindungen besitzen aliphatische Dicarbonsäuremonoanionen vertikale Detachmentenergien von etwa 4,5 eV, Kühlen ( $T = 70$  K) kann diesen Betrag sogar weiter erhöhen [113] (=innere Solvatisierung). Aufgrund dieser im Vergleich zum Peptidrückgrat geringen Bindungsenergie werden Elektronen in größeren Systemen wie Peptiden oder Proteinen daher voraussichtlich von diesen Gruppen abgelöst. Weiterhin besitzen die aromatischen Seitenketten des Tryptophans und Tyrosins verhältnismäßig schwach gebundene Elektronen. Die vertikalen Detachmentenergien eines Indols bzw. eines Phenols betragen 7,9 bzw. 8,6 eV [114,115], sodass potentiell auch an diesen Gruppen (mit dem verwendeten Detachmentlaser) nachweisbare Photodetachmentprozesse stattfinden können. Hinweise bezüglich des Detachmentprozesses können aus den Trianionen folgender Sequenzen erhalten werden.

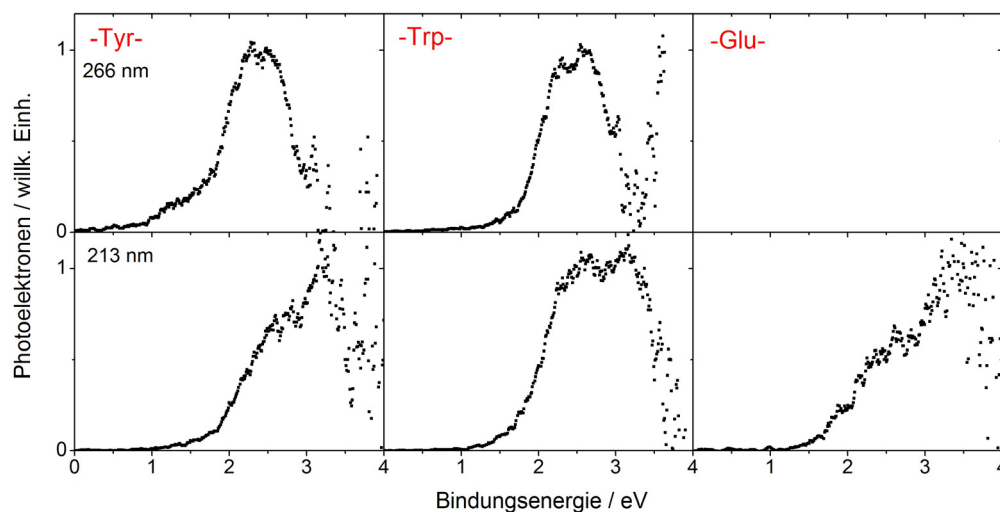


Diese wurden exakt so ausgewählt, dass die aromatischen Seitenketten des Tyrosins und des Tryptophans eines Trianions von drei negativen Carboxylaten umgeben sind. Nach Gleichung

(5.2) werden ihre vertikalen Übergänge enorm erniedrigt, sodass diese unter Gebrauch des Detachmentlasers (=266 und 213 nm) voraussichtlich erfasst werden. Als Referenz kam eine Sequenz zum Einsatz, die anstatt einer Aminosäure mit aromatischer Seitenkette eine weitere Glutaminsäure einschließt.

### 6.1.1 Photoelektronenspektren der Peptidtrianionen

Die PES (266 und 213 nm) sind in Abbildung 56 dargestellt. Aus den Ankunftszeitverteilungen war jeweils nur ein dominantes Signal erkennbar, sodass diese hier nicht explizit gezeigt sind.



**Abbildung 56:** PES (266 und 213 nm) der Peptidtrianionen

Alle drei PES bei 213 nm zeigen eine stetig anwachsende Flanke im Bereich von ungefähr 1,5 eV, sodass sich in allen drei Fällen eine ähnliche ADE extrapolieren lässt. Dementsprechend kann aus dieser Gegebenheit geschlossen werden, dass zumindest der Bereich des PES, der die schwächer gebundenen Elektronen umfasst, im Wesentlichen von Photoelektronen aus negativen Carboxylaten geleitet wird.

Aus dem PES des tryptophanhaltigen Peptids bei 266 nm lässt sich ein kontinuierlich zunehmendes Signal bei 1,5 eV beobachten. Die Spektren bei 266 und 213 nm sind demnach konsistent, d.h. die elektronische Struktur des Peptids wird im PES abgebildet. Hingegen lässt sich aus dem Spektrum des tyrosinhaltigen Peptids bei 266 nm (verglichen mit dem 213 nm-Spektrum) niederenergetische Schulter im Bereich von 1,0 - 1,5 eV erkennen. Abgesehen von der allgemeinen Tatsache, dass die UV-Absorptionsspektren des Tyrosins (und Tryptophans) jeweils eine intensive breite Bande im Bereich von 280 nm besitzen, daher nach der elektronischen Anregung (mit 266 nm) bereits genannte Relaxationsprozesse [26,69-74] stattfinden können, kann als eine weitere Ursache eine minimal höhere RCB (relativ zu

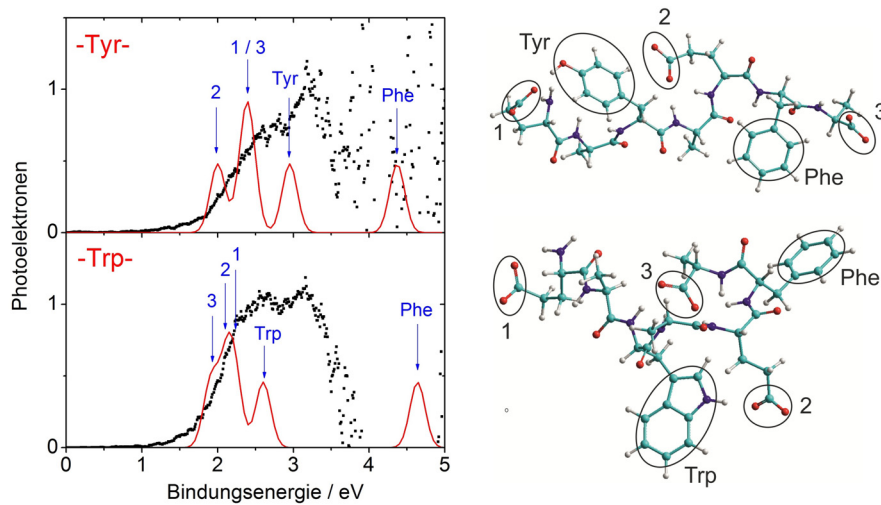
-Trp-) genannt werden. Dann würde die tiefere Bande (bei größere Bindungsenergie) teilweise abgetrennt erscheinen und demzufolge wäre die relative Übergangswahrscheinlichkeit der schwächer gebundenen Elektronen bei 266 nm deutlich stärker ausgeprägt. Im Gegensatz dazu muss Absorption des Peptidtrianions -GLU- nicht in Betracht gezogen werden. Infolgedessen wurde auf die Aufnahme eines PES bei 266 nm verzichtet.

Vertikale Übergangsenergien können mithilfe der Gleichungen (5.1) und (5.2) geschätzt werden, wozu Strukturkandidaten unentbehrlich sind. Darum erfolgt im nächsten Abschnitt die Diskussion theoretischer Befunde.

### **6.1.2 Vergleich mit theoretischen Abschätzungen**

Unter Gebrauch des Programms *XLEAP* ließen sich willkürliche Startgeometrien der Peptide generieren: Da beispielsweise negativ geladene Phenolate in der Gasphase bereits mehrfach belegt wurden [116,117], fanden außerdem Simulationen von Isomeren statt, die außer ausschließlich negativen Carboxylaten (insgesamt 3) auch ein Phenolat sowie ein Indolat einschließen. Die speziell bei diesen Isomeren zur Erzeugung eines Trianions unerlässlichen weiteren Überschussladungen wurden in Form von zwei Carboxylaten realisiert. Zwar existieren hierfür drei verschiedene Verteilungsmöglichkeiten, erzeugt und simuliert wurde dennoch nur ein einziges Isomer. Die dazu erforderliche Deprotonierung der COOH-Gruppen fand an der Seitenkette der ersten Glutaminsäure sowie an der endständigen COOH-Gruppe der Sequenz statt. Zwitterionische Strukturen gelten in der Gasphase vor allem als Multianionen als weniger wahrscheinlich und wurden daher außer Acht gelassen. [118,119]. Nach der Durchführung eines annealing-Zyklus mithilfe von AMBER 7 (50 ps bei  $T = 1000$  K, 10 ps kühlen auf  $T = 300$  K und anschließender Geometrieoptimierung), wobei eine Erzeugung von 500 Strukturen eines jeden Typs stattfand, erfolgte eine Berechnung der Stoßquerschnitte sowie eine Sortierung der Strukturen hinsichtlich der Übereinstimmung experimenteller und theoretischer Stoßquerschnitte und Absolutenergien. Die dieser Prozedur folgende Abschätzung der vertikalen Detachmentenergien nach Gleichung (5.1) und (5.2) als Mittelwert aus den zehn besten Strukturen (nach Stoßquerschnitt und Absolutenergie) geschah unter Verwendung einer VDE von Phenolat und Indolat von 2,7 bzw. 2,6 eV [116,120]. Ergänzend fand eine Berechnung der VDE des an der Seitenkette des Phenylalanins lokalisierten Phenylrings statt. Die VDE hierfür betrug 9,2 eV [121]. Die VDE einer Carboxylatgruppe entsprach 4,5 eV, wurde demnach auf eine in eine Wasserstoffbrückenbindung involvierte Carboxylatgruppe abgestimmt [113]. Die berechneten

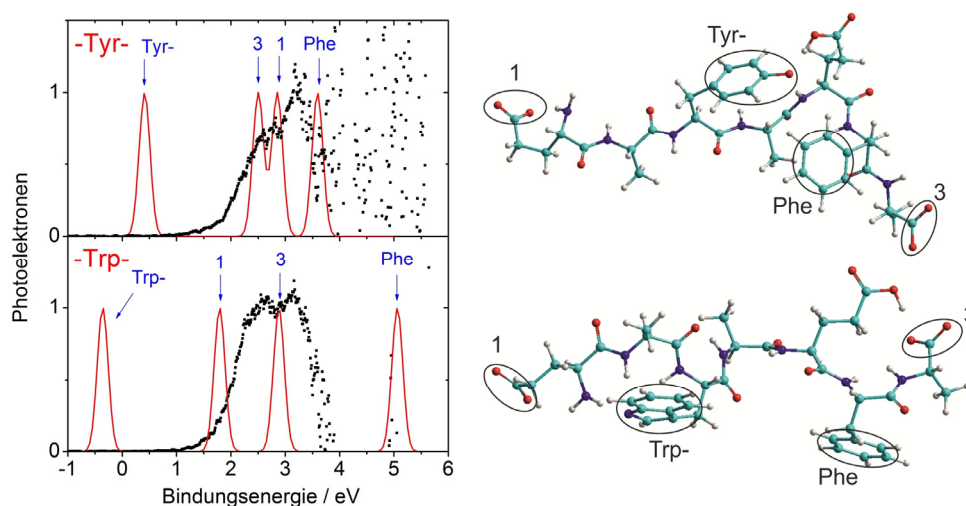
Übergänge sind in Abbildung 57 dargestellt (rote Kurve). Die Wahl der Halbwertsbreite geschah willkürlich.



**Abbildung 57:** Abgeschätzte Übergänge (rot) der Peptidtrianionen, die drei deprotonierte Carboxylatgruppen besitzen (links) sowie repräsentative Gasphasenstrukturen (rechts)

Die Bezeichnung der Übergänge kann aus der rechten Seite von Abbildung 57 entnommen werden. 1 bedeutet beispielsweise, dass ein Elektron von der Carboxylatgruppe (1) entfernt wird. Die vertikalen Übergänge der aromatischen Seitenketten von Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin wurden gemäß ihrer Abkürzung als Tyr, Trp und Phe benannt. Zum Vergleich sind in Abbildung 57 zusätzlich die PES bei 213 nm abgebildet (schwarz gepunktete Linie). Übergänge des Phenylrings (von Phenylalanin) treten erst bei größeren Bindungsenergien auf. Die abgeschätzten vertikalen Übergänge des Tryptophans sowie des Tyrosins erscheinen nach der Rechnung hingegen im experimentell zugänglichen Bereich, können daher zur Interpretation der Spektren nicht vernachlässigt werden. Die vertikalen Erwartungswerte der Carboxylatgruppen rangieren alle im Bereich der ansteigenden Flanken der Spektren und entsprechen ferner den am schwächsten gebundenen Elektronen. Demzufolge wird die Bestimmung der ADE eines Peptids oder Proteins von diesen Übergängen beherrscht.

Die abgeschätzten Detachmentenergien der Peptide, die die negativ geladenen Chromophore Phenolat und Indolat enthalten, sind in Abbildung 58 gezeigt.



**Abbildung 58:** *Abgeschätzte Übergänge der Peptidtrianionen, die zwei Carboxylate, und je ein Phenolat oder Indolat enthalten (links) sowie repräsentative Gasphasenstrukturen (rechts)*

Wieder korrespondieren die Zahlen mit den benannten Carboxylaten auf der rechten Seite der Abbildung. Tyr- und Trp- beschreiben die vertikalen Detachmentenergien des Phenolats und Indolats. Keine besonders schwach gebundenen Elektronen werden dem Phenylring des Phenylalanins vorhergesagt. Die beiden negativen Carboxylate des tyrosinhaltigen Peptids zeigen Übergänge im Bereich von 2,0 - 3,0 eV Bindungsenergie. Im Falle des Peptids -Tyr- wird auch ein Ablösen von Photoelektronen unterhalb 2,0 eV prognostiziert. Die abgeschätzten vertikalen Übergänge der beiden negativ geladenen Chromophore befinden sich nahe 0 eV und damit außerhalb der (experimentellen) Detachmentzonen. Dem deprotonierten Indolat kann sogar eine negative Bindungsenergie postuliert werden.

Insgesamt lässt sich eine überwiegend bessere Übereinstimmung zwischen Experiment und den angewandten theoretischen Methoden erzielen, wenn die drei Überschussladungen des Peptids in Form von drei negativen Carboxylaten verwirklicht werden.

Neben der Bestimmung der elektronischen Struktur mittels Photoelektronenspektroskopie kann eine Analyse der Absorptionsbanden der Chromophore in der Gasphase dazu dienen, deren Ladungszustand und dadurch eine mögliche Deprotonierung (dieser aromatischen Chromophore) zu erfassen. Ein zur direkten Emission von Photoelektronen konkurrierender Prozess stellt die Absorption des eingestrahlten Lichts mit anschließendem Elektronenverlust durch das Tunneln der RCB oder Dissoziation im Allgemeinen dar. Das Ausmaß dieser Prozesse hängt von der Anzahl absorbierter Photonen ab. Generell können sich die Absorptionsspektren nach der Deprotonierung der Chromophore grundlegend von ihren neutralen Verwandten unterscheiden. Hierzu wurden Photodetachmentmessungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Philippe Dugourd an der Universität in Lyon durchgeführt.

### 6.1.3 Photodetachmentmessungen der Peptidtrianionen

Die verwendete Anlage besteht im Wesentlichen aus einer Elektrosprayquelle und einer Quadrupolionenfalle (LCQ DUO) der Firma Thermo Scientific. Licht aus einem OPO (*optical parametric oscillator*), der mit der 3. Harmonischen eines Nd:YAG betrieben wird, ermöglicht die Dissoziation des Mutterions im Wellenlängenbereich von 220 – 320 nm [122]. Diese Fragmentbildung lässt sich mithilfe der Ionenfalle erfassen und kann als sog. inverses Lambert-Beersches-Gesetz, d.h. es wird nicht die Intensitätsänderung des Lichts, sondern die gebildeten Photofragmente werden detektiert, aufgetragen gemäß:

$$I(\lambda) = \ln \left[ \frac{I_{\text{Mutterion}} + \sum I_{\text{Fragmente}}}{I_{\text{Mutterion}}} \right] \frac{1}{\phi} \quad (6.1)$$

$I_{\text{Mutterion}}$  entspricht der Intensität des Mutterions,  $I_{\text{Fragmente}}$  der aufsummierten Intensitäten aller Fragmente. Außerdem ist eine Normierung bezüglich der eingestrahlenen Leistung  $\phi$  unumgänglich. Die beiden Photodetachmentspektren der Peptidtrianionen sind in Abbildung 59 dargestellt. Zudem sind die UV/VIS-Absorptionsspektren der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin der kondensierten Phase gezeigt.

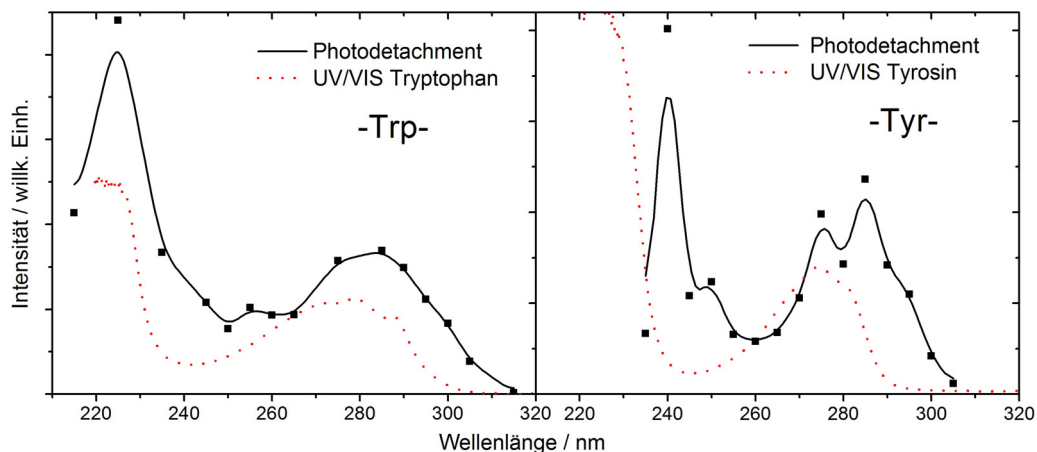


Abbildung 59: Detachmentspektren der Peptidtrianionen

Beide Photodetachmentspektren besitzen überwiegend zwei Banden. Das dominante Signal (beider Peptide) im Bereich von 220 - 240 nm lässt sich auf Absorption des Peptidrückgrates zurückführen. Im Spektrum des tryptophanhaltigen Peptidtrianions kann eine breite Bande im Bereich von 280 nm beobachtet werden, die dem Absorptionsmaximum des Tryptophans entspricht. Das Peptid -Tyr- zeigt ebenso eine ausgeprägte Absorption im selben Bereich. Die durchschnittliche Abweichung bzw. der statistische Fehler dieses Experiments kann als verhältnismäßig groß eingeschätzt werden. Daher entspricht die Doppelpeakstruktur des tyrosinhaltigen Peptids bei 280 nm vermutlich nicht der Realität und kann als Photodetachmentbande des Chromophors Tyrosin interpretiert werden. Relativ zur



kondensierten Phase zeigt sich eine leicht ausgebildete Rotverschiebung. Als mögliche Ursache kann das Entfernen der Solvathülle genannt werden. Ansonsten können benachbarte Ladungen zu bathochromen Verschiebungen beitragen, was beispielsweise anhand des Tryptophananions nachgewiesen und mithilfe zeitabhängiger Dichtefunktionalrechnungen bestätigt wurde [123]. Würden negative Chromophore in Erscheinung treten, sollte gemäß [117,124] eine Verschiebung der Banden zu kleineren Wellenlängen auftreten. Demgemäß können solche Anionen mithilfe dieser Detachmentmessungen ausgeschlossen werden. Ferner besitzt das Peptid -Tyr- eine kaum sichtbare Bande bei ungefähr 255 nm. Abgesehen von möglichen systematischen Messfehlern (z.B. schlechter Justage des Lasers) kann als generelle Ursache eine Absorption des involvierten Phenylalanins genannt werden, das ein Absorptionsmaximum in diesem Bereich aufweist.

#### **6.1.4 Abschließende Diskussion**

Die diskutierten PES der Peptidtrianionen sollten grundlegende Informationen zur Interpretation von Spektren größerer Systeme liefern. Hinweise, dass die Photoelektronen überwiegend von negativen Carboxylaten abgelöst werden, kann aus der Gegenüberstellung der PES und abgeschätzter Detachmentenergien möglicher Strukturkandidaten erhalten werden. Die vertikalen Übergänge der aromatischen Seitenketten (Indol und Phenol) lassen sich je nach Geometrie des betrachteten Ions im experimentell zugänglichen Bereich (Detachmentwellenlänge 266 nm) finden. Bezüglich der Detachmentmessungen in einer Quadrupolionenfalle sowie der Tatsache, dass die berechneten Energien zum Ablösen von Photoelektronen aus deprotonierten Chromophoren wie Phenol (Tyr) und Indol (Trp) nicht mit Banden der PES korrespondieren, lässt sich die Existenz von Phenolaten und Indolaten ausschließen. Inwiefern neben Carboxylaten andere deprotonierte Gruppen größerer Systeme in der Gasphase miteinbezogen werden müssen, kann hier natürlich nicht geklärt werden. Weitere Aminosäuren mit prinzipiell deprotonierbaren Seitengruppen stellen das Histidin oder Cystein, aber auch das Serin oder Threonin in Form negativer Hydroxylate dar.

Als potentielle Fehlerquelle bei einer in dieser Weise durchgeführten semiklassischen Näherung kann die Ungenauigkeit der verwendeten vertikalen Detachmentenergien genannt werden. Der hierfür angenommene Betrag einer Carboxylatgruppe von 4,5 eV entspricht der VDE einer Carboxylatgruppe, die einer ausgeprägten inneren Solvatisierung durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ausgesetzt ist. Natürlich müssen solche Effekte nicht zwingend agieren, sodass gerade bei gestreckten, strukturell offeneren Proteinmultianionen isolierte Carboxylatgruppen einkalkuliert werden müssen. Deren

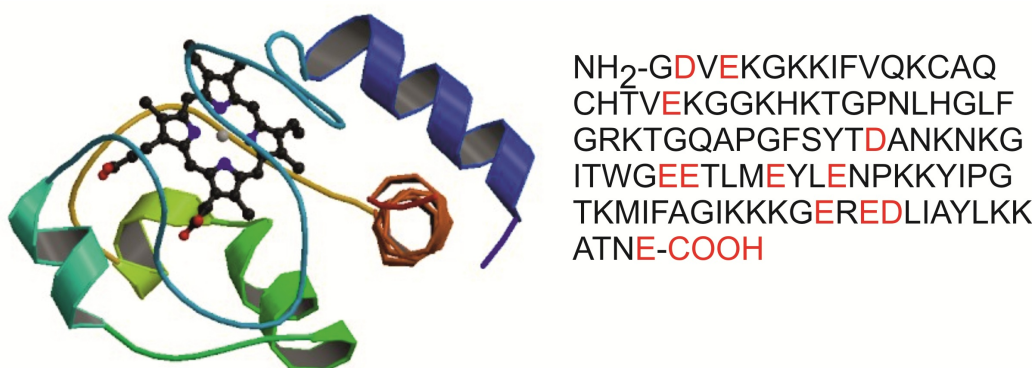
vertikale Übergänge sollten dann (ohne Beachtung aller anderen Überschussladungen) vielmehr dem Wert einer isolierten Carboxylatgruppe genügen. Unter Umständen lässt sich das schwach ausgeprägte Photodetachmentsignal der Peptidtrianionen im Bereich von 1 - 1,5 eV, das in besonderem Maße bei Verwendung einer Detachmentwellenlänge von 266 nm auftritt, auf diese isolierten Carboxylatgruppen zurückführen. „Hot Bands“ wären allerdings ebenfalls plausibel.

Schlussendlich kann als Fazit gezogen werden, dass die negativen Ladungen in Form negativer Carboxylate repräsentiert werden und diese die am schwächsten gebundenen Elektronen bereitstellen. Die Diskussion der Proteinmultianionen im folgenden Abschnitt findet daher unter Vernachlässigung alternativer Ladungsträger wie des Phenolats statt. Zumindest die mäßig gebundenen Banden der PES können dann einem Ablösen von Elektronen direkt von den Carboxylaten zugeteilt werden.

### 6.2 *Cytochrom C*

Das Cytochrom C ist ein an der Atmungskette beteiligtes Protein, bestehend aus 104 Aminosäuren. Viele Gasphasenexperimente fanden bereits statt. Ionenmobilitätsmessungen ergaben, dass eine Vergrößerung des Ladungszustands eine voranschreitende Umwandlung von nativen zu entfalteten / gestreckten Strukturen zur Folge hat. Rückfaltungsprozesse nach der Reduzierung des Ladungszustands wurden sowohl experimentell als auch theoretisch untersucht [125,126,127,128,8]. Eine Bestimmung der dielektrischen Eigenschaften fand indirekt über eine Bestimmung der Gasphasenbasizitäten von Kationen statt [10].

Die Struktur bzw. die Sequenz des hier verwendeten Cytochroms C, das aus Rinderherzen extrahiert wurde, sind in Abbildung 60 dargestellt.



**Abbildung 60:** Struktur des Cytochroms C aus Rinderherzen (links), Sequenz des Proteins (rechts) [129]

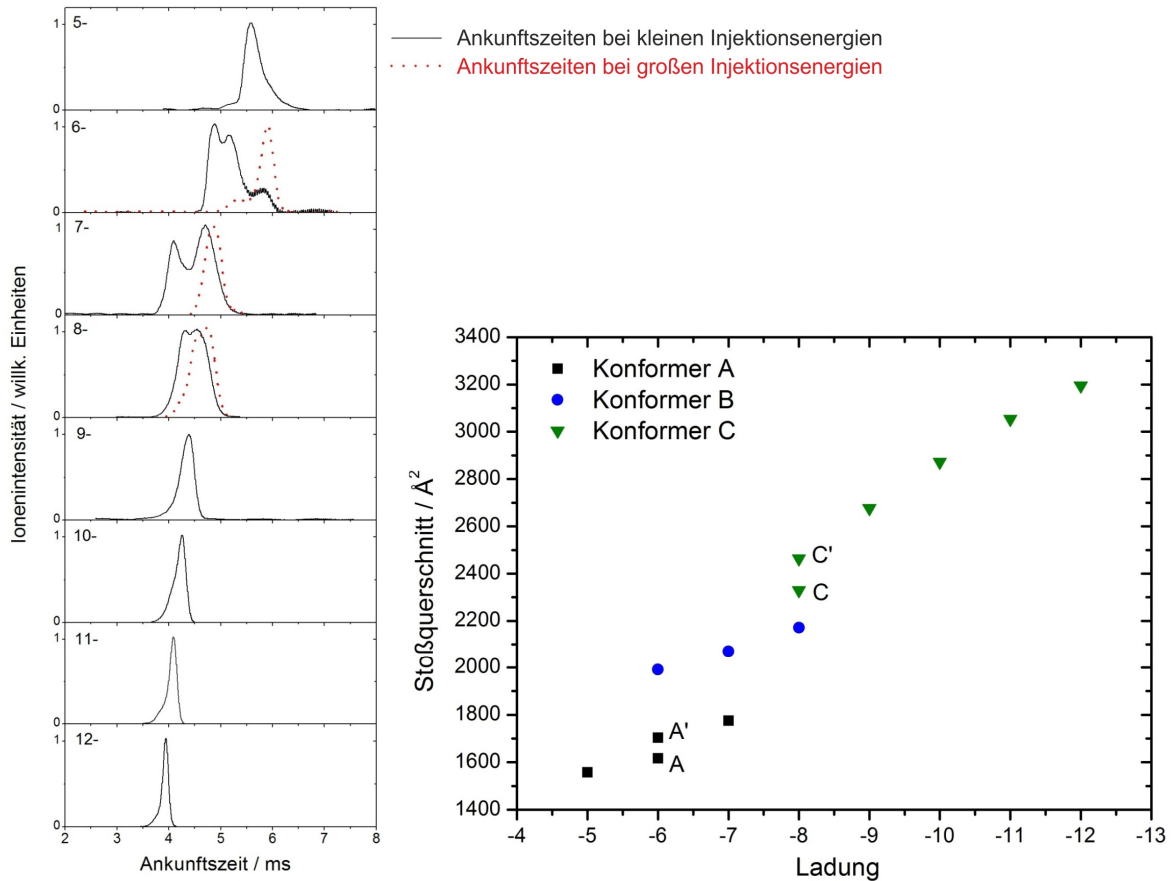
Die sauren Aminosäuren Asparagin (D)- und Glutaminsäure (E) sind rot unterlegt. Beiläufig ist das an zwei Cysteine kovalent gebundene Häm c gezeigt, das zwei azide COOH-Gruppen

einschließt. Insgesamt sind 15 saure Gruppen gegenwärtig, sodass als höchster Ladungszustand im Anionenmassenspektrum -15 auftreten sollte. Hier allerdings ließen sich nur bis zu 12 negative Ladungen beobachten.

### **6.2.1 Ankunftszeitverteilungen und Stoßquerschnitte der Cytochrom C Anionen**

Zur Erzeugung mehrfach geladener Proteinanionen wurde eine 0,1 mM Lösung des Proteins aus einer Mischung aus 50 mM KOH-Lösung mit Methanol im Verhältnis von 1:4 bei einer Flussrate von 0,05 - 0,10 mL/h verwendet. Da das Elektrosprühen aus salzhaltiger Lösung geschah, muss mit einer ausgeprägten Kaliumadduktbildung gerechnet werden [66]. Die Transmission des Quadrupolmassenfilters des (IMS-PES)-Experiments ist bei hinreichend großer Auflösung zur vollständigen Abtrennung dieser Addukte vom Mutterion nicht ausreichend groß, um PES-Messungen noch durchführen zu können. Deshalb muss bei der Betrachtung der Ankunftszeiten und Photoelektronenspektren mit einer Überlappung dieser Ionen gerechnet werden. Beim Gebrauch von Helium als Stoßgas in der Driftzelle konnte keine ausreichend große Intensität an Ionen erzeugt werden, alle durchgeführten Messungen fanden deshalb in Luft (als Puffergas) statt. Eine Umrechnung gemäß Anhang B liefert aus den experimentell bestimmten Luftquerschnitten die problemlos mit theoretischen Rechnungen vergleichbaren Heliumquerschnitte. Die Ankunftszeiten sowie eine Auftragung der experimentellen Stoßquerschnitte als Funktion des Ladungszustands sind in Abbildung 61 gegeben.

Die Driftzeiten der untersuchten Anionen zeigen breite Verteilungen. Beispielsweise beträgt die IMS-Auflösung eines Pentaanions in etwa  $t/\Delta t = 40$ , sodass die Halbwertsbreite bei einer Ankunftszeit von 5,50 ms etwa 0,14 ms entsprechen müsste. Die experimentelle Peakbreite des Pentaanions beträgt jedoch 0,40 ms, demzufolge besteht das Ionenpaket aus mehreren Konformationen, die fast identische Stoßquerschnitte zu eigen haben. Ähnlich ausgedehnte Ankunftszeiten besitzen auch alle anderen Ladungszustände. Die Halbwertsbreite nimmt zwar im Allgemeinen mit zunehmendem Ladungszustand ab, dies liegt jedoch in der Wurzelabhängigkeit der theoretischen Auflösung begründet, sodass jedes zeitlich aufgetrennte Signal ganzen Familien von Konformationen zugeordnet werden muss.



**Abbildung 61:** Ankunftszeiten (links) und Stoßquerschnitte (rechts) der untersuchten Ladungszustände der Cytochrom C Anionen. Die gepunkteten Kurven (rot) stellen Ankunftszeiten nach thermischer Aktivierung im Eingangstrichter dar. Gemäß den experimentell bestimmten Stoßquerschnitten fand eine Einteilung in drei Klassen von Konformeren statt (siehe Text).

Aus [59] ist bekannt, dass in der Gasphase drei verschiedene Konformationen des Hexaanions erscheinen. Eine Vergrößerung der Injektionsenergie (rote Kurve in Abbildung 61) bewirkt ein Wechsel zu Konformationen, die eine größere Driftzeit besitzen.

Der Ladungszustand 7 besteht aus zwei verschiedenen Konformationen. Auch hier löst eine thermische Aktivierung (rote Kurve in Abbildung 61) eine Denaturierung des Proteins aus.

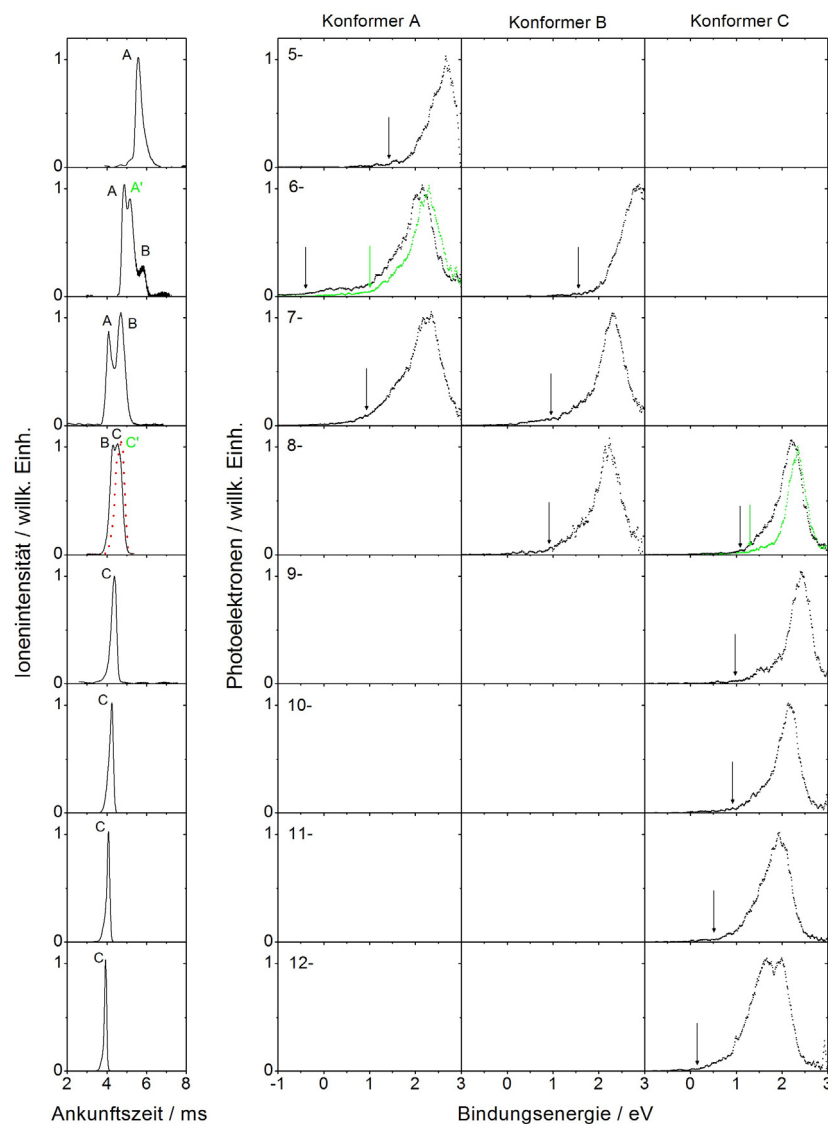
Das Oktaanion weist eine stark verbreiterte Ankunftszeitverteilung auf. Je nach Injektionsbedingungen können drei verschiedene Maxima erfasst werden, sodass aller Wahrscheinlichkeit nach drei unterschiedliche Familien von Konformationen vorliegen, deren Stoßquerschnitte aber kaum unterschiedlich sind.

Alle anderen Ladungszustände lassen sich als lediglich eine dominante Konformation verstehen. Anhand der experimentell bestimmten Stoßquerschnitte kann eine Einteilung in gewisse Typen von Konformationen geschehen, die bereits in Abbildung 61 vorgenommen wurde. Aus [59,130] ist außerdem bekannt, dass einige Ionen der Ladungszustände 5 bis 7 in Helium (Konformer A) einen zur nativen Proteinkonformation analogen Stoßquerschnitt

besitzen. Ferner resultiert aus einer Zunahme der Ladung ein Übergang zu entfalteten Strukturen, sodass die Konformationen C bereits teilweise gestreckte Strukturen darstellen, deren Sekundärstrukturen in bestimmtem Ausmaß noch erhalten sind. Die Konformationen B hingegen besitzen Querschnitte, die keinem der eben genannten Typen zugehörig sind. Wahrscheinlich lassen sie sich in Strukturen einteilen, deren Entfaltungsprozess zwar bereits begonnen hat, andererseits aber bestimmte Bereiche der Tertiärstruktur noch existent sind. Die finalen Schritte des Entfaltungsvorgangs wurden daher noch nicht eingeleitet.

### 6.2.2 Photoelektronenspektren der Cytochrom C Anionen

Die konformerenaufgelösten PES (266 nm) der Cytochrom C Anionen sind in Abbildung 62 dargestellt.



**Abbildung 62:** Anlaufzeiten (links) und PES (266 nm) der Cytochrom C Anionen, Pfeile kennzeichnen die bestimmte adiabatische Detachmentenergie

Im Allgemeinen bestehen alle PES aus ausgedehnten Banden. Bei einer Anzahl von 15 COOH-Gruppen können viele verschiedene Ladungsverteilungen realisiert werden. Einem Pentaanion stehen beispielsweise 3003 verschiedene Permutationen zur Verfügung, die fünf Überschussladungen zu vergeben. Um einiges vervielfacht wird diese Anzahl, wenn postuliert wird, dass die zwitterionische Struktur elektrosprühter Proteinionen teilweise oder ganz bestehen bleibt, also beispielsweise ein Pentaanion 5 - 15 negative Carboxylate und dem entsprechend 0 - 10 positiv geladene basische Seitenketten beinhaltet. Wird ferner beachtet, dass jede Konformerfamilie aus vielen verschiedenen Strukturen besteht, entsteht eine außerordentlich große Anzahl an vertikalen Endzuständen nach dem Entfernen eines Elektrons. Deshalb können die beobachteten Banden der PES als Superposition einer außergewöhnlich großen Anzahl an Übergängen charakterisiert werden <sup>5</sup>.

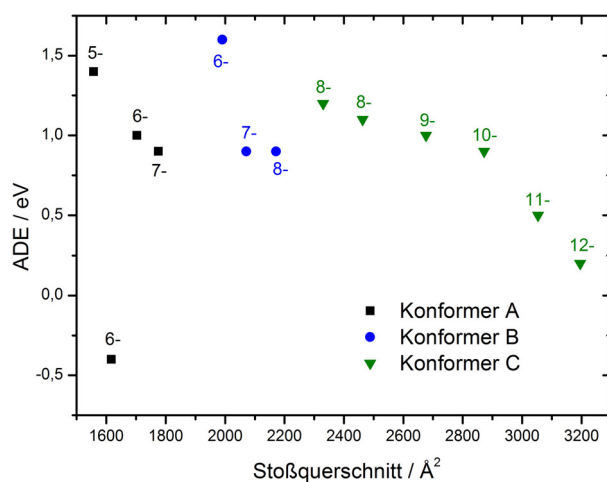
Die genaue Analyse der PES zeigt, dass eine Zunahme der Ladung grundsätzlich eine Abnahme der adiabatischen Detachmentenergien eines jeden Strukturtyps zur Folge hat. Jeder untersuchte Ladungszustand des Konformerentyps C verfügt über verwandte Spektren. Das Dodecaanion zeigt zwar eine Doppelpeakstruktur, trotzdem lassen sich die Spektren hinsichtlich ihres Erscheinungsbilds als vergleichbar betrachten, wobei aus einer Zunahme der Ladung eine Verschiebung der Banden zu kleineren Bindungsenergien resultiert. Über die repulsiven Coulombbarrieren solch ausgedehnter Systeme ist bislang wenig bekannt. Es muss jedoch angenommen werden, dass infolge der räumlichen Reichweite eines Proteins diese Barriere je nach Ladungsverteilung verschiedene Maxima sowie Minima besitzt und daher als komplizierte dreidimensionale Funktion betrachtet werden muss. Dies bedeutet, dass Elektronen aus verschiedenen räumlichen Bereichen des Proteins unterschiedliche repulsive Coulombbarrieren überqueren müssen. Verglichen mit Zonen, in denen kaum negative Carboxylate anwesend sind, sollte die RCB in einer Umgebung größerer negativer Ladungsdichte wesentlich mächtiger ausfallen, wo zudem geringere Detachmentenergien vorausgesagt werden. Daher stellt die RCB eines Proteins (bzw. einer Carboxylatgruppe) aller Wahrscheinlichkeit nach eine Größe dar, die in Bezug auf dessen ADE einen gegensätzlichen Trend zu eigen hat. Anhand diesem Umstand kann geklärt werden, weshalb alle Spektren, das kompaktere Hexaanion Typ A ausgenommen, eine in etwa vergleichbare Struktur besitzen und die Erhöhung der Ladungszahl die Banden lediglich zu kleineren Bindungsenergien verschiebt.

---

<sup>5</sup> Speziell hier müsste außerdem noch eine Berücksichtigung möglicher direkt an der Hämgruppe ablaufender Detachmentprozesse stattfinden, vor allem nach der Deprotonierung der beiden involvierten Carbonsäureresten an den beiden Seitenketten. In Anhang A ist gezeigt, dass eine zusätzliche Betrachtung eines solchen Detachmentprozesses in guter Näherung vernachlässigt werden kann.

Die PES der nativen Konformationen A und A' des Hexaanions beinhalten jeweils eine Bande im Bereich von 2,5 eV. A schließt zusätzlich eine weitere, weit auslaufende niederenergetische Flanke ein, die zu einer negativen ADE von -0,4 eV führt. Weshalb die beiden Spektren eine so unterschiedliche Struktur besitzen, kann allerdings nicht exakt bewiesen werden. Aus der Ankunftszeitverteilung des Hexaanions kann dennoch geschlossen werden, dass die PES der beiden Konformationen A und A' möglicherweise grundsätzlich Anteile der jeweiligen anderen Konformation einbeziehen. Gegebenenfalls liegt die Bande der kompakteren Konformation A im Bereich von 2,5 eV (schwarze Kurve) aus einer Überlagerung der anderen (grüne Kurve A') begründet. Weiterhin wäre eine langsame (auf der Zeitskala des IMS-Experiments ablaufende) Konversion von A zu A' denkbar. Wären beide Strukturen zeitlich besser separiert, bestünde eine Asymmetrie der Driftzeitverteilung. So sollte die bei längeren Ankunftszeiten abnehmende Flanke der kompakteren Struktur A (schwarz) verbreitert dargestellt werden. Fände hingegen Interkonversion statt, dann wäre auch der ansteigende Zweig der anderen Konformation A' (grün) verbreitert. Eine weitere plausible Interpretation bestünde in einer stark asymmetrischen Ladungsverteilung (A), d.h. es existieren Bereiche hoher negativer Ladungsdichte, was eine kräftige Abnahme der Bindungsenergie zur Folge hätte.

Werden die adiabatischen Detachmentenergien der einzelnen Konformationen in Abhängigkeit ihrer Stoßquerschnitte aufgetragen, können Änderungen hinsichtlich der adiabatischen Detachmentenergien und ihrer Strukturen gleichzeitig erfasst werden (siehe Abbildung 63). Die adiabatischen Detachmentenergien aller Ladungszustände sind außerdem in Tabelle 5 zusammengefasst.



**Abbildung 63:** Adiabatische Detachmentenergien als Funktion der Stoßquerschnitte der Cytochrom C Anionen

Ladung	ADE / eV		
	Konformer A	Konformer B	Konformer C
5-	1,4		
6-	-0,4 / 1	1,6	
7-	0,9	0,9	
8-		0,9	1,1 / 1,2
9-			1
10-			0,9
11-			0,5
12-			0,2

**Tabelle 5:** ADE aller Konformationen von Cytochrom C

Bleibt die kompaktere Proteinkonformation des Hexaanions (mit einer ADE von  $-0,4$  eV) unberücksichtigt, dann kann eine klare Abnahme der Bindungsenergie der nativen Konformation (A) mit zunehmendem Ladungszustand registriert werden, die durch eine minimale Zunahme des Proteindurchmessers nicht im Geringsten kompensiert werden kann. Eine lineare Anpassung hätte im Falle von Hexaanion A eine ADE von etwa  $1,2$  eV zur Folge. Weiterhin zeigt der Typ B eine Abnahme der ADE mit zunehmendem Ladungszustand. Dagegen fällt diese Abnahme des entfalteten Typs C zunächst weniger dramatisch aus. Beim Wechsel vom Octa- zum Decaanion lässt sich eine Abnahme der Bindungsenergie von lediglich  $0,3$  eV ableiten, wobei der Stoßquerschnitt simultan bedeutend anwächst. Die beiläufig verbundene Zunahme der mittleren Abstände der Überschussladungen kann das Hinzufügen weiterer Ladungen offensichtlich nahezu kompensieren, sodass die ADE minimal abfällt. Weiteres Aufladen (bzw. Deprotonieren) des Moleküls führt dann aber letztendlich zu einem prägnanten Einbruch der ADE (von Ladungszustand 10 zu 12). Dem Anschein nach kann der voranschreitende Entfaltungsprozess dieser zunehmenden Coulombabstoßung nicht mehr befriedigend entgegenwirken oder aber es müssen aufgrund der vorgegebenen Sequenz COOH-Gruppen in Bezirken außerordentlich großer negativer Ladungsdichte deprotoniert werden, was eine deutliche Abnahme der vertikalen Detachmentenergien der in dieser Umgebung lokalisierten Carboxylatgruppen zur Folge hätte <sup>6</sup>. Dieser Sachverhalt könnte auch begründen, warum größere Ladungszustände (13 - 15) nicht beobachtet werden. Die finale ADE nach dem Hinzufügen weiterer Ladungen wäre negativ. Unter Umständen kann ein derartig flexibles Molekül bestimmte Konformationen realisieren, die ein effizientes Tunneln der RCB einer potentiell metastabil gebundenen Überschussladung verwirklichen, sodass alle erzeugten metastabilen Multianionen auf der Zeitskala des Experiments (50 - 100 ms) nicht mehr nachgewiesen werden. (Dennoch konnten metastabile Multianionen eines beispielsweise denaturierten  $\alpha$ -Lactalbumins erfasst werden, siehe Kapitel 6.4)

### **6.2.3 Vergleich mit elektrostatischen Abschätzungen**

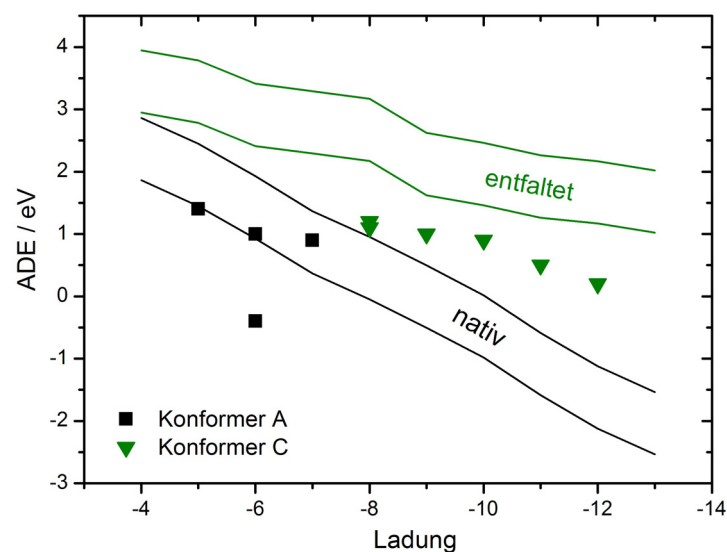
Mithilfe des in dieser Arbeit bereits häufig genutzten elektrostatischen Modells lassen sich die adiabatischen Detachmentenergien der einzelnen Ladungszustände abschätzen. Dies fand in der Arbeitsgruppe von Prof. Philippe Dugourd statt. Hierzu wurde die Struktur 1CYC.pdb aus der Proteindatenbank verwendet [131]. Da die theoretische Beschreibung von Proteinen angesichts der exorbitanten konformellen Vielfalt möglicher Strukturen enorme

---

<sup>6</sup> Siehe außerdem Kapitel 6.4 und 6.5: Vermehrt auftretende, weitauslaufende Banden, wie sie insbesondere das Dodecaanion aufweist, werden hier intensiver diskutiert.



Anstrengungen bereitet, geschah eine Abschätzung der Detachmentenergien lediglich anhand einer nativen sowie einer linearen Form. Diese ließ sich durch Modifikation der Dihedralwinkel des Proteinrückgrates auf genau  $180^\circ$  und Entfernen des Häms, das eine Linearisierung der Struktur verbietet, generieren. Die Carboxylatgruppen der Hämgruppe blieben demzufolge unberücksichtigt. Nach der Bildung aller möglichen Ladungsverteilungen der Ladungszustände 4 bis 13 mithilfe eines Algorithmus fand die Berechnung der adiabatischen Detachmentenergien unter Anwendung von Gleichung (5.1) (VDE wird hier durch ADE ersetzt,  $\sigma = 1$ ) statt, wobei jedem Ladungszustand nur die nach absoluter Coulombenergie der Überschussladungen günstigste Verteilung zugrunde gelegt wurde. Um elektrostatische Effekte angrenzender Gruppen entgegengesetzter Polarität mit einzubeziehen, kam eine ADE von 4,25 eV zum Einsatz. Eine simultane Abschätzung lieferte zudem Detachmentenergien isolierter Carboxylate (ADE gleich 3,25 eV). Auf diese Weise erhält man bezüglich des Photodetachments tendenzielle Energiebereiche als Funktion der Ladung, die in Abbildung 64 mit den experimentell bestimmten adiabatischen Detachmentenergien vereinigt sind. Da diese Betrachtung nur die beiden Extremfälle einbezieht, wurde auf eine explizite Darstellung des Typs B verzichtet.



**Abbildung 64:** Berechnete Detachmentregionen der nativen und entfaltenen linearen Struktur des Cytochroms C sowie die experimentell bestimmten adiabatischen Detachmentenergien des Typs A und C

Alle berechneten Detachmentenergien der offeneren (gestreckten) Konformerfamilie (C) liegen unterhalb der berechneten Detachmentzone einer linearen Konformation. Aus einem Vergleich theoretisch und experimentell bestimmter Stoßquerschnitte in Helium konnte auch einem Ladungszustand von 12 keine lineare Struktur zugeordnet werden [59]. Deswegen können die Abstände der Überschussladungen der im Experiment beobachteten Konformationen als geringer eingeschätzt werden, was die Diskrepanz im Hinblick auf die

berechneten und experimentell bestimmten adiabatischen Detachmentenergien erklärt. Die experimentellen Detachmentenergien des nativen Typs A befinden sich (die mit einer grundlegend abweichenden Struktur des Ladungszustands 6 (A) ausgenommen) vorwiegend im berechneten Gebiet. Zumindest hier ist relativ sichergestellt, dass (im Gegensatz zu Typ C, der als lineare Struktur genähert wurde) eine bessere strukturelle Verwandtschaft der experimentellen und der theoretisch berechneten Struktur besteht. Eine Problematik besteht in der zur Rechnung genutzten dielektrischen Abschirmkonstante  $\sigma$  von eins. Aus Rechnungen geläufig und vielfach dokumentiert ist der Umstand, dass auch ohne den polarisierenden Lösungsmittelleffekt die mittlere Dielektrizitätskonstante niemals einen Wert von Eins anstrebt [101-105]. Da zumindest in der kondensierten Phase Carboxylatgruppen tendenziell an der Oberfläche gefunden werden, sollten diese, solange keine wesentliche Änderung der Konformation (wie z.B. Entfaltung mit einhergehender Rückfaltung in eine neue Struktur nach dem Entfernen des Lösungsmittels und eventueller Umorientierung zur Einschränkung der einzelnen Dipolmomente) eintritt, weiterhin an der Oberfläche lokalisiert bleiben. Die Wechselwirkung zweier an der Oberfläche direkt benachbarter Ladungen kann dann zwar immer noch mithilfe einer Abschirmkonstante von eins beschrieben werden, für beispielsweise gegenüberliegende Ladungen ist dieser Umstand keinesfalls erfüllt. Dementsprechend muss die dielektrische Abschirmkonstante einer nativen Konformation als ungleich von eins gewählt werden. Wird dieser Faktor in entsprechender Weise bemessen, tritt eine Verschiebung der gerechneten Detachmentregion zu größeren Bindungsenergien auf, sodass die experimentellen adiabatischen Detachmentenergien (A) aus dieser Region verschwinden. Dann müssen zur einwandfreien Beschreibung von Proteinanionen aber auch Ladungsverteilungen berücksichtigt werden, die aus energetischer Sicht höher liegen (größere Coulombenergie), beispielsweise weil beim Übergang von kondensierter Phase in die Gasphase keine ausreichend schnelle Umverteilung der Protonen zugunsten einer Minimierung der Coulombenergie stattfindet oder Konformationsänderungen in das neue globale Minimum so langsam verlaufen, dass diese mit dem verwendeten Experiment nicht erfasst werden.

Als potentiell förderlich und aufschlussreich erscheint nun die Untersuchung von Proteinen, die auch in der Gasphase in größeren Ladungszuständen als native Form existent sind bzw. wo konkurrierende Konformationen verschiedener Ladungszustände beobachtet werden können. Disulfidbrückenbindungen stellen in der Natur ein Mittel dar, die Struktur eines Proteins zu stabilisieren und einem Entfaltungsprozess entgegenzuwirken. Mittels IMS-

Messungen konnten Valentine et al. belegen, dass selbst Decakationen des Lysozyms, das vier Disulfidbrücken beinhaltet, auf der Zeitskala des IMS-Experiments stabile native Konformationen einnehmen können [132]. Außerdem ließ sich eine weitere, teilweise entfaltete Konformation beobachten. Die Reduktion der Disulfidbrücken führte schlussendlich zu vermehrt offeneren / gestreckten Konformationen und allgemein größeren Ladungszuständen. Die Sequenz des Lysozyms verfügt allerdings über relativ wenige saure Reste, sodass große anionische Ladungszustände erwartungsgemäß kaum zugänglich sind.  $\alpha$ -Lactalbumin dagegen besitzt eine nahezu identische Struktur sowie eine immens größere Anzahl an aziden COOH-Gruppen. Im folgenden Kapitel werden folglich gezielt dessen strukturelle und dielektrische Eigenschaften besprochen und diskutiert.

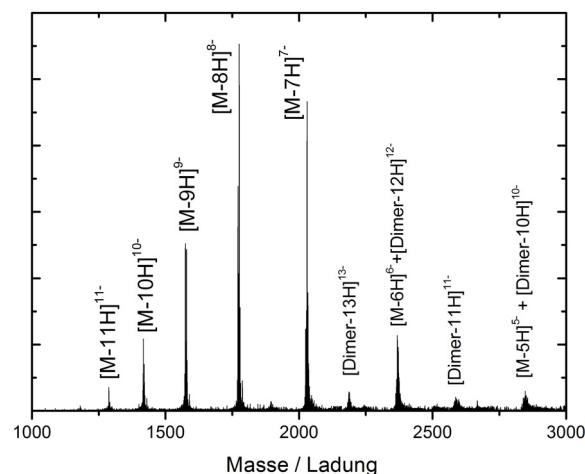
### 6.3 $\alpha$ -Lactalbumin

Die Sequenz des Rinder- $\alpha$ -Lactalbumins lautet:

MEQLTKCEV**FRELKDL**KGYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAI**VQNN**DSTEYGLFQIN  
NKIWCK**DD**QNP**HSSNICNISC**DKFL**DDDLTDD**IVCVKKILDKVGINYWLAHKALCSE  
KLDQWLCEKL-COOH [133].

Damit bestehen 21 COOH-Gruppen. Disulfidbrücken sind zwischen den Cysteinen 6 und 120, 28 und 111, 61 und 77 sowie 73 und 91 realisiert. Außerdem wurde ein Produkt genutzt, bei dem das üblicherweise beinhaltende Kalziumion entfernt wurde.

Ein Massenspektrum der zur ES-Ionisierung verwendeten 0,1 mM Lösung aus Ammoniak (1%) und Methanol im Verhältnis 1:4 ist in Abbildung 65 dargestellt.



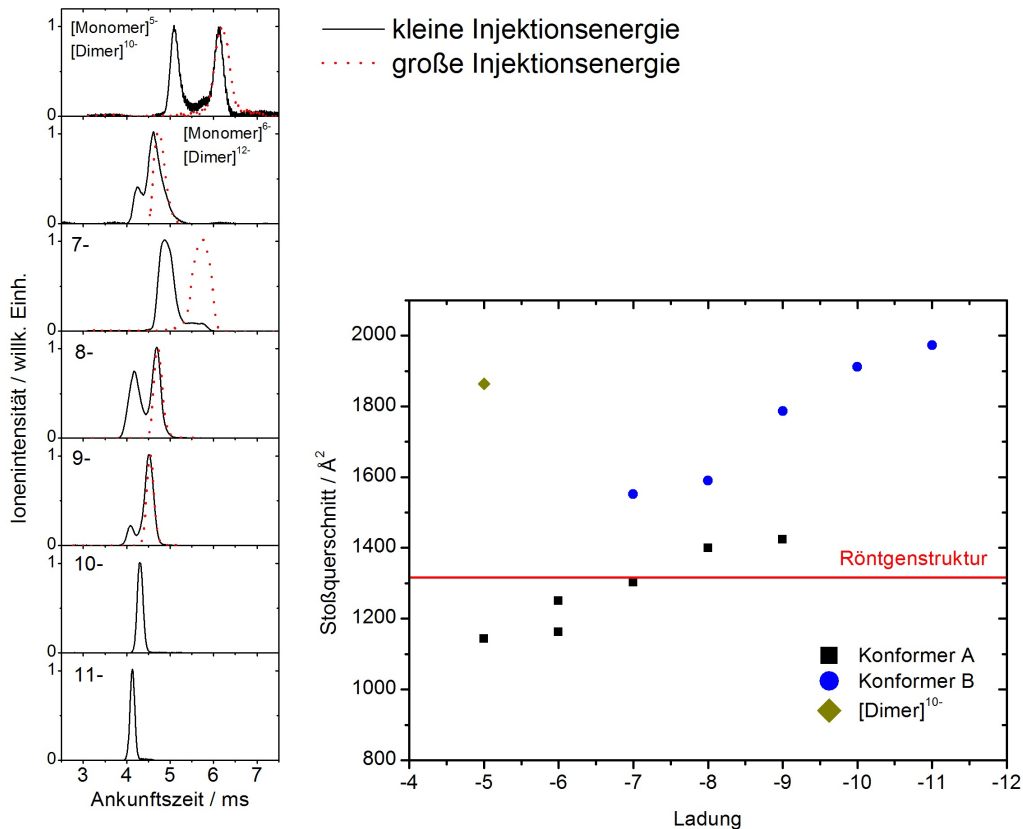
**Abbildung 65:** Massenspektrum von  $\alpha$ -Lactalbumin

Obwohl 21 COOH-Gruppen involviert sind, kann ein maximaler Ladungszustand von nur elf oder sogar zwölf (sehr schwaches Signal bei  $m/z = 1182$ ) erfasst werden. Daneben lassen sich

dimere Aggregate beobachten, sodass vor allem die Ankunftszeitverteilungen der Penta- und Hexaanionen zum Teil mit Dimeren überlagert sind.

### 6.3.1 Ankunftszeitverteilungen und Stoßquerschnitte der $\alpha$ -Lactalbuminanionen

In Abbildung 66 sind die Ankunftszeiten sowie die experimentell bestimmten Stoßquerschnitte als Funktion des Ladungszustands dargestellt. Alle durchgeführten Messungen geschahen in Luft (als Puffergas), die Ausgleichsgerade in Anhang B wurde zur Umrechnung in Heliumquerschnitte eingesetzt.



**Abbildung 66:** Ankunftszeiten (links) und Heliumstoßquerschnitte der  $\alpha$ -Lactalbuminanionen als Funktion der Ladung (rechts)

Ankunftszeitverteilungen, die aus mehreren zeitlich getrennten Ionenpaketen bestehen, können bei insgesamt fünf Ladungszuständen (5-9) erfasst werden. Wieder zeigt sich, dass thermische Aktivierung durch Vergrößerung der Injektionsenergie die Denaturierung des Proteins zugunsten einer Einnahme offenerer Konformationen fördert. Die Ladungszustände 10 und 11 setzen sich aus lediglich einer Konformerenfamilie zusammen.

Die Konformationen lassen sich entsprechend ihren experimentell bestimmten Stoßquerschnitten in Strukturtypen gliedern. Der berechnete Stoßquerschnitt der Röntgenstruktur des  $\alpha$ -Lactalbumins beträgt  $1317 \text{ \AA}^2$  (rote Linie). Darum können Konformationen, die einen ähnlichen Stoßquerschnitt besitzen, diesem Typ (A) zugeordnet

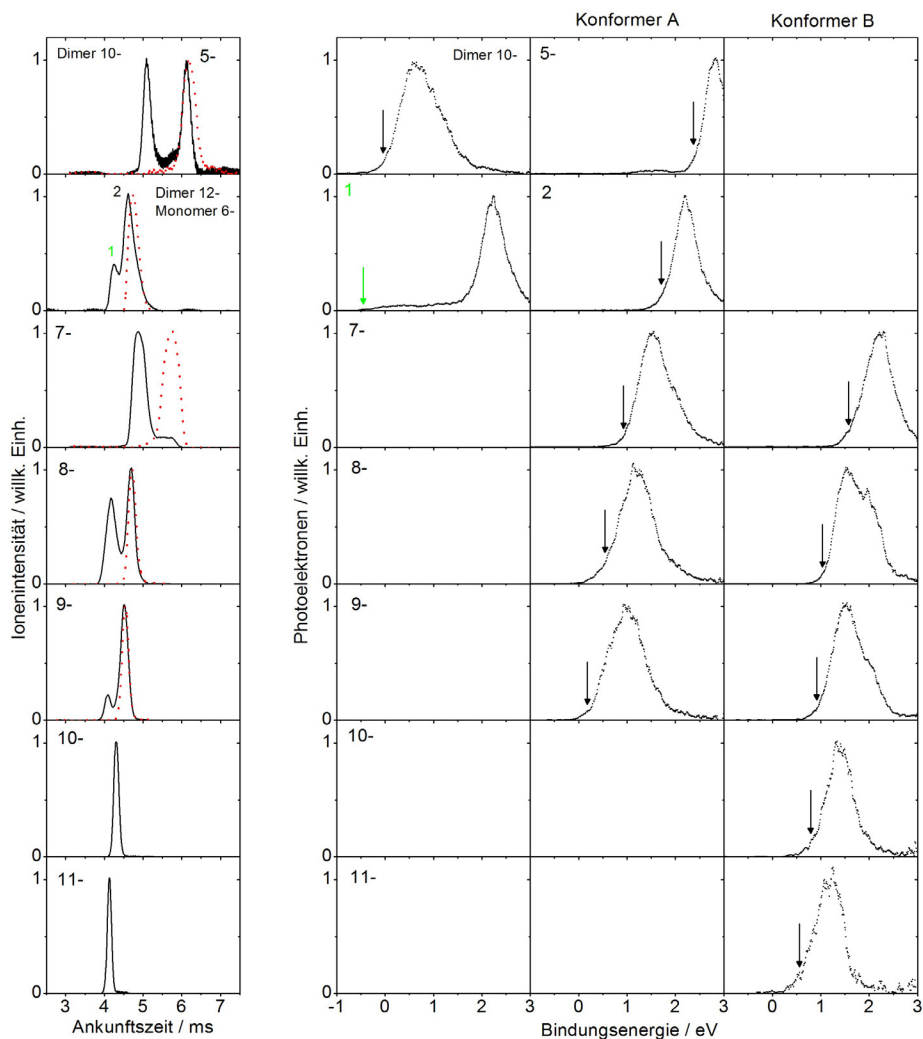
werden. Gerade die kleineren Ladungszustände (5-6) zeigen Strukturen, die einen kleineren Querschnitt als die Röntgenstruktur zu eigen haben. Eine Umorientierung der an der Oberfläche des Proteins ansässigen polaren Gruppen zugunsten einer kompakteren Struktur kann als potentieller Grund genannt werden. Der blaue Typ (B) hingegen ließe sich als partiell geöffnete Struktur einschätzen, dessen Nachweis findet bereits ab einem Ladungszustand von 7 statt.

Das schnellere Ionenpaket des hypothetischen Ladungszustands 5 entspricht faktisch einem Dimer (ein Monomer besäße einen um 20 % kleineren Stoßquerschnitt als die Röntgenstruktur), was auch durch Analyse der Isotopenverteilung des (Orbitrap)-Massenspektrums bestätigt wurde. Eine sphärische Aggregatbildung hätte beispielsweise folgendes Wachstum mit der Anzahl  $n$  an einzelnen Proteinionen zur Folge:  $\Omega \sim n^{2/3}$  (siehe außerdem Kapitel 6.6) Als Stoßquerschnitt käme deshalb ein Wert von  $2094 \text{ \AA}^2$  in Frage. Entspräche dieses schnellere Ion (Peak 1 des hypothetischen Pentaanions) einem sphärischen Aggregat, betrüge der Stoßquerschnitt  $1862 \text{ \AA}^2$ . Zwar wäre eine sphärische Anordnung im Falle eines Dimers unwahrscheinlich, trotzdem ergeben sich aufgrund der besseren Korrespondenz des experimentellen und des theoretischen Stoßquerschnitts einer sphärischen Struktur Hinweise hinsichtlich einer Existenz eines beispielsweise hantelförmigen Dimers.

Der Stoßquerschnitt eines postulierten Dimerdodecaanions (Peak 1 im Falle des hypothetischen Hexaanions) betrüge  $2262 \text{ \AA}^2$ , ist damit relativ zu dem experimentellen Querschnitt des Dimerdecaanions 21 % größer, liegt aber im theoretisch denkbaren Bereich ( $\Omega_{\text{theoretisch}} = 2094 \text{ \AA}^2$ ). Andererseits wäre aber auch ein Monomer vorstellbar. (Eine genauere Aussage kann nicht getroffen werden.)

### **6.3.2 Photoelektronenspektren der $\alpha$ -Lactalbuminanionen**

Die PES der  $\alpha$ -Lactalbuminanionen sind in Abbildung 67 dargestellt. In Anhang C sind ansonsten die Spektren bei Detachmentwellenlängen von 213 nm gezeigt. (Anhand dieser Spektren lassen sich konkurrierende Prozesse des direkten Photodetachments als weniger wahrscheinlich beurteilen, siehe außerdem Kapitel 5.1.5.)



**Abbildung 67:** Ankunftszeiten (links) und PES (266 nm, rechts) der  $\alpha$ -Lactalbuminanionen, Pfeile kennzeichnen die bestimmte adiabatische Detachmentenergie

Wieder werden im Allgemeinen breite Banden beobachtet, die einem Ablösen vieler verschiedener Elektronen aus unterschiedlichen Strukturen der zeitlich getrennten Konformerfamilien entsprechen. Innerhalb eines Konformerentyps findet eine stetige Abnahme der ADE mit zunehmendem Ladungszustand statt. Das Dimerdecaanion besitzt bereits eine negative ADE von -0,1 eV. Das Pentaanion des nativen Typs A zeigt eine stark ansteigende Flanke im Bereich von 2,0 - 2,5 eV. Ansonsten ist eine schwache Bande bei einer Bindungsenergie von 1,5 eV ersichtlich. Aus der in Abbildung 67 dargestellten Ankunftszeitverteilung kann eine Schulter bei kleineren Driftzeiten beobachtet werden. Demzufolge könnte das kaum ausgeprägte Signal des Pentaanions (1,5 eV) bei geringerer Bindungsenergie von dieser kompakteren Konformerfamilienfamilie (die zeitlich überlagert ist) hervorgerufen werden.

Das zeitlich schnellere Hexaanion (1) (oder Dimerdodecaanion) verfügt über eine Bande bei 2,5 eV sowie eine weitere, extrem breite, nahezu strukturlose niederenergetische Schulter, die

zu einer negativen Bindungsenergie führt. Eine Diskussion möglicher Ursachen fand bereits in Kapitel 6.2.2 statt (Cytochrom C, Hexaanion A). Andererseits offenbart das (Orbitrap)-Massenspektrum Indizien bezüglich einer Überlagerung von Dimeren. Die elektronischen Strukturen eines Dimerdodecaanions und eines Dimerdecaanions sollten generell verwandt sein. Da im Vergleich zum Decaanion zwei weitere Ladungen eingeschlossen werden, sollte zum einen die ADE geringere und zum anderen die RCB größere Werte einnehmen. Zumindest zweites kann nicht beobachtet werden. Allerdings bestünde auch die Eventualität, dass thermische Aktivierung nach der zeitlichen Trennung der Ionen in der Driftzelle im Endtrichter einen Zerfall der Dimere begünstigt. Bestehen die dimeren Aggregate außerdem aus Proteineinheiten gleicher Ladung (5-), besitzen die beiden Fragmente und das eigentliche Dimer gleiche Masse zu Ladungsverhältnisse, sodass in der Detachmentkammer eine aus Monomeren und Dimeren bestehende Ionenwolke spektroskopiert würde. Dann entspräche die niederenergetische Flanke dem Dimer, während das zu (2) identische Photodetachmentsignal dem monomeren nativen Protein zugeordnet werden müsste.

Wird die Ladung der nativen Form vom Pentaanion zum Nonaanion kontinuierlich erhöht, kann ein Einbruch der ADE von 2,4 auf 0,2 eV erfasst werden. Im Gegensatz dazu entspricht die Abnahme der ADE lediglich 1,0 eV beim Wechsel von Hepta- zu Undecaanion des offeneren Konformerentyps B. Als Argumentation können wesentlich größere Abstände der Überschussladungen genannt werden. Um exaktere Aussagen zu treffen, sind aufwendige Rechnungen notwendig. Es können aber dennoch einfache elektrostatische Abschätzungen getroffen werden.

### **6.3.3 Vergleich mit theoretischen Abschätzungen (native Form)**

Werden die Ladungen des Proteins so verteilt, dass die Coulombenergie minimiert wird, also die Abstände der negativen Carboxylatgruppen maximal werden, kann bei gegebener Abschirmkonstante  $\sigma$  ein Minimalwert der ADE abgeschätzt werden. Dies geschieht im Folgenden anhand bestimmter Polyeder, dessen Ecken als Punktladungen betrachtet werden, wobei folglich die exakte Position der Carboxylatgruppen gemäß der Sequenz unberücksichtigt bleibt. Hierzu wurde wie folgt verfahren: Aus den experimentell bestimmten Stoßquerschnitten fand unter der Annahme einer sphärischen Struktur eine Berechnung des Radius einer Kugel statt. Dieser entspricht in guter Näherung der Summe aus Proteinradius und Heliumradius von 140 pm (van der Waals-Radius), womit sich die räumliche Ausdehnung der Gasphasenstruktur näherungsweise abschätzen lässt. Anschließend kann ein Körper mit  $k$  Ecken (=Ladungszustand) in das Innere der Kugel gelegt werden, sodass die

Ecken, die als Punktladung betrachtet werden, eine Position auf der Oberfläche der Kugel definieren. Die günstigste Struktureinheit eines Hexaanions stellt dann beispielsweise ein Oktaeder dar. Die Betrachtung aller anderen Ladungszustände gestaltet sich hingegen als komplizierter. Eine trigonale Bipyramide, die gemäß der hier verwendeten Betrachtungsweise einem Pentaanion entspräche, kann nur in verzerrter Form in das Innere einer Kugel gelegt werden, sodass andererseits asymmetrischere Geometrien durchaus bevorzugt wären. Da nur ungefähre Beträge geschätzt werden sollten, wurden zur Vereinfachung lediglich die adiabatischen Detachmentenergien folgender Geometrien berechnet: Eine verzerrte pentagonale Bipyramide zur Beschreibung des Pentaanions, Hexaanionen werden mithilfe eines Oktaeders beschrieben. Eine pentagonale Bipyramide bzw. ein Würfel dienen zur Berechnung der adiabatischen Detachmentenergien eines Hepa- bzw. Octaanions. Das Nonaanion wird durch einen einfach überkappten Würfel angenähert. Die berechneten Detachmentenergien können aus Tabelle 6 entnommen werden. Potentielle dielektrische Abschirmung der Ladungen blieb unberücksichtigt, d.h. die Abschirmkonstante  $\sigma$  betrug eins, die ADE einer Carboxylatgruppe entsprach 4,25 eV.

<i>Ladung</i>	<i>Stoßquerschnitt / Å<sup>2</sup></i>	<i>ADE<sub>theoretisch</sub> / eV</i>	<i>ADE<sub>experimentell</sub> / eV</i>
5-	1143	2,2	2,4
6-	1163	1,7	1,7
7-	1302	0,9	0,9
8-	1399	0,3	0,4
9-	1424	-0,3	0,2

**Tabelle 6:** Berechnete adiabatische Detachmentenergien der nativen  $\alpha$ -Lactalbuminanionen unter Verwendung eines einfachen Kugelmodells, Struktur (1) des Hexaanions / Dimerdodecaanions blieb unberücksichtigt

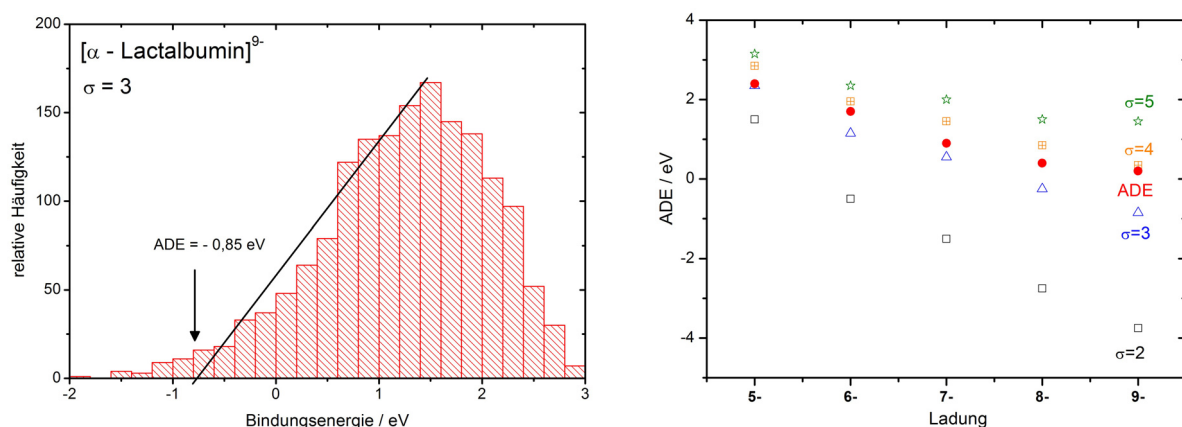
Offenbar lässt sich eine gute Korrespondenz erzielen. Nur die gerechnete ADE des Nonaanions weicht stark vom experimentellen Betrag ab. Unter Umständen hätte eine günstigere Verteilung der Ladungen durch die Auswahl einer anderen Geometrie (z.B. in Form eines verzerrten dreifach überkappten trigonalen Prismas) eine verminderte Diskrepanz zur Folge.

Die hier getätigten Näherungen, insbesondere die Missachtung der vorgegebenen Sequenz, die die Position der Überschussladungen exakt vordefiniert, können allerdings als zu radikal beurteilt werden. Eine Abschirmkonstante  $\sigma$  von eins, insbesondere für ein natives Protein gilt zudem als unrealistisch.

Die elektronische Anregung eines Proteinmultianions findet in eine außerordentlich große Anzahl vertikaler Endzustände statt. Werden nur jeweils die am schwächsten gebundenen Elektronen der Carboxylatgruppen bedacht und zwitterionische Strukturen übergangen,



können  $n!/[k!(n-k)!] \cdot k$  Endzustände einer einzigen Struktur erreicht werden, wobei  $n$  die Anzahl an COOH-Gruppen bzw.  $k$  die Menge an Überschussladungen erfüllt. Ein PES kann daher approximativ als Histogramm aller Übergänge ausgelegt werden, wobei die Übergänge mit der relativen Häufigkeit einer Struktur / Ladungsverteilung gewichtet werden sollten. Demgemäß wird jetzt ein weiteres Modell diskutiert, dass ein PES in dieser Weise beschreibt. Zur Generierung einiger Strukturen wurde ausgehend von der Röntgenstruktur [133] eine 5 ns lang andauernde Molekulardynamiksimulation mithilfe von AMBER 7 (ff99-Parameter) bei einer Temperatur von  $T = 500$  K durchgeführt und alle 5 ps eine Geometrie gespeichert. Nach der Berechnung der Stoßquerschnitte erfolgte eine Zuordnung von 20 Strukturen gemäß der Übereinstimmung der Stoßquerschnitte zu jedem Ladungszustand. Eine willkürliche Verteilung der  $k$  Ladungen auf die  $n$  COOH-Gruppen der Sequenz eines jeden experimentell untersuchten Ladungszustands modelliert mögliche Verteilungen der Überschussladungen. Diese definieren die Ladungsabstände der 20 Strukturen (jeden Ladungszustands) und dienen zur Abschätzung der adiabatischen Detachmentenergien mithilfe von Gleichung (5.1) unter Verwendung bestimmter Abschirmkonstanten  $\sigma$ . Aus einer Darstellung als Histogramm wie in Abbildung 68 gezeigt ist, kann mittels Extrapolation der ansteigenden Flanke ein Wert bestimmt werden, der der experimentell bestimmten ADE analog ist. Zur Vereinfachung wurden alle Zustände als gleich wahrscheinlich betrachtet.



**Abbildung 68:** Histogramm zur Bestimmung der ADE des  $\alpha$ -Lactalbuminnonaanions nach dem verwendeten Modell (links) sowie die theoretisch bestimmten adiabatischen Detachmentenergien unterschiedlicher Abschirmkonstanten  $\sigma$  als Funktion der Ladung

Anhand dieses Modells wie in Abbildung 68 gezeigt ist, kann ein näherungsweise linearer Abfall der ADE bei zunehmender Ladung vorausgesagt werden. Eine zufrieden stellende Übereinstimmung der experimentellen und der theoretischen Werte wird verwirklicht, wenn  $\sigma$  gleich 3 - 4 gewählt wird. Rechnungen zur Bestimmung der Dielektrizitätskonstanten des  $\alpha$ -Lactalbumins unter Anwendung eines Fröhlich-Kirkwood-Dipolfluktuationsmodells ergaben

ohne der Berücksichtigung geladener Bereiche an der Außenhülle im Inneren des Proteins (und ohne dem polarisierenden Effekt des Lösungsmittels) einen Wert von  $\epsilon = 2,1$  [105]. Werden zusätzlich Ladungen und auch Zonen außerhalb des inneren Kerns berücksichtigt, muss eine Zunahme von  $\epsilon$  einkalkuliert werden, insbesondere wenn die zwitterionische Struktur des Proteins auch in der Gasphase existent bleibt. Darum können die mithilfe dieses Modells erhaltenen Resultate als realistisch eingereiht werden, wenn auch nur wenige mögliche Ladungsverteilungen postuliert und diese als gleich wahrscheinlich eingestuft wurden. Unberücksichtigt blieb ferner, dass nicht alle Elektronen mit gleicher Wahrscheinlichkeit abgelöst werden, weil beispielsweise die RCB einen solchen Prozess stärker gebundener Elektronen verhindert. Andererseits wurde in die Betrachtung miteinbezogen, dass gemäß der Sequenz (also der Anwesenheit von Glutamin- und Asparaginsäure bzw. deren endständiger COOH-Gruppen) nur bestimmte Zonen aufgeladen werden können. Dies lässt sich daher als ein Argument betrachten, weshalb nach diesen theoretischen Abschätzungen (im Vergleich zum bereits besprochenen Polyedermodell), eine dielektrische Abschirmung in einem für ein Protein sinnvollen Bereich gewählt werden muss, damit experimentelle und die mit diesem Modell erzielten Daten konsistent werden.

### 6.3.4 Vergleich mit verwandten Strukturen

Informationen, in welchem Ausmaß die PES des  $\alpha$ -Lactalbumins aus dessen Sequenz resultierender Ladungsverteilung beeinflusst werden, lässt sich dem strukturell verwandten Lysozym entnehmen. Die native Form besitzt eine fast identische Struktur, die Anzahl an COOH-Einheiten beträgt hingegen lediglich zehn. Die Sequenz des hier verwendeten Hühnerlysozyms ist in Anhang D gezeigt [134], die PES der nativen Form als Penta- bzw. Hexaanion sind in Abbildung 69 dargestellt.

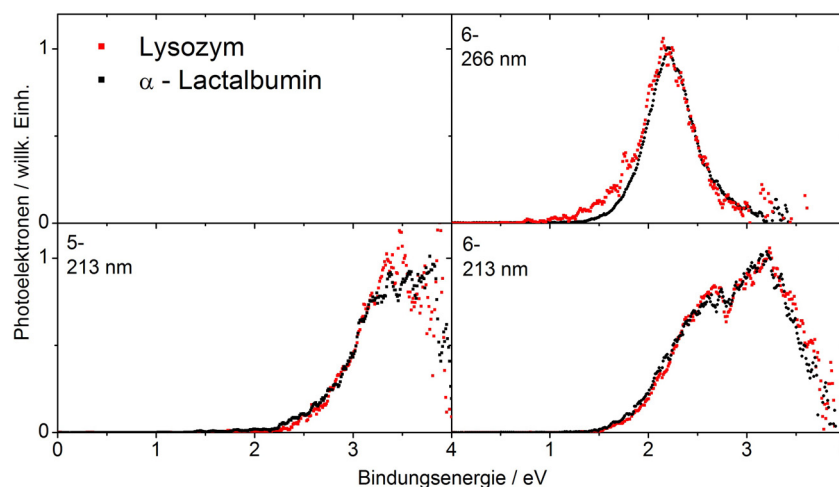
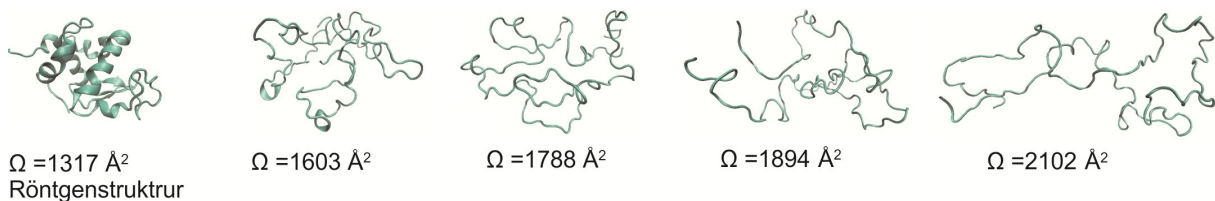


Abbildung 69: PES zweier Ladungszustände der nativen Konformationen des Lysozyms und  $\alpha$ -Lactalbumins

Die Spektren bei 213 nm können annähernd zur Deckung gebracht werden, nur die PES der Hexaanionen bei 266 nm zeigen minimale Differenzen. Als denkbare Ursache kann eine minimal erhöhte RCB des Lysozyms<sup>6-</sup> postuliert werden, die die Bande bei 2,0 eV im Bereich der RCB-Schwelle weniger intensiv erscheinen lässt, während die Ablösewahrscheinlichkeit im schwächer gebundenen Bereich kaum beeinflusst wird. Daher werden die schwächer gebundenen Elektronen, relativ zu den energetisch tieferen Zuständen, intensiver erscheinen. Die Anzahl an möglichen Ladungsverteilungen eines Penta- bzw. Hexaanions wächst bei der Anwesenheit von 10 bzw. 21 aziden COOH-Gruppen um einen Faktor von ungefähr 44 bzw. 117 (wenn zwitterionische Strukturen nicht einbezogen werden). Da andererseits die PES der beiden Proteine kaum Unterschiede aufweisen, kann nur als Fazit gezogen werden, dass entweder die dominanten Ionen kaum unterschiedliche Ladungsverteilungen beinhalten oder im Allgemeinen ähnliche mittlere Abstände der Überschussladungen bestehen. (Eine Aussage, inwiefern zwitterionische Strukturen involviert sind, kann natürlich nicht getroffen werden.)

### 6.3.5 Strukturvorschläge des teilweise denaturieren Typs

Ähnliche elektrostatische Abschätzungen könnten auch zum generellen Verständnis der  $\alpha$ -Lactalbuminkonformerfamilie B beitragen. Ein gravierendes Problem stellen allerdings die gewaltigen strukturellen Unsicherheiten dar, weshalb im Folgenden lediglich einige Strukturvorschläge gezeigt sind. Zum Vergleich ist die Röntgenstruktur [133] dargestellt.



**Abbildung 70:** Potentielle Gasphasenstrukturen der Konformerfamilie B des  $\alpha$ -Lactalbumins. Alle Strukturen wurden willkürlich ausgewählt, sind demnach nicht repräsentativ für bestimmte Ladungszustände.

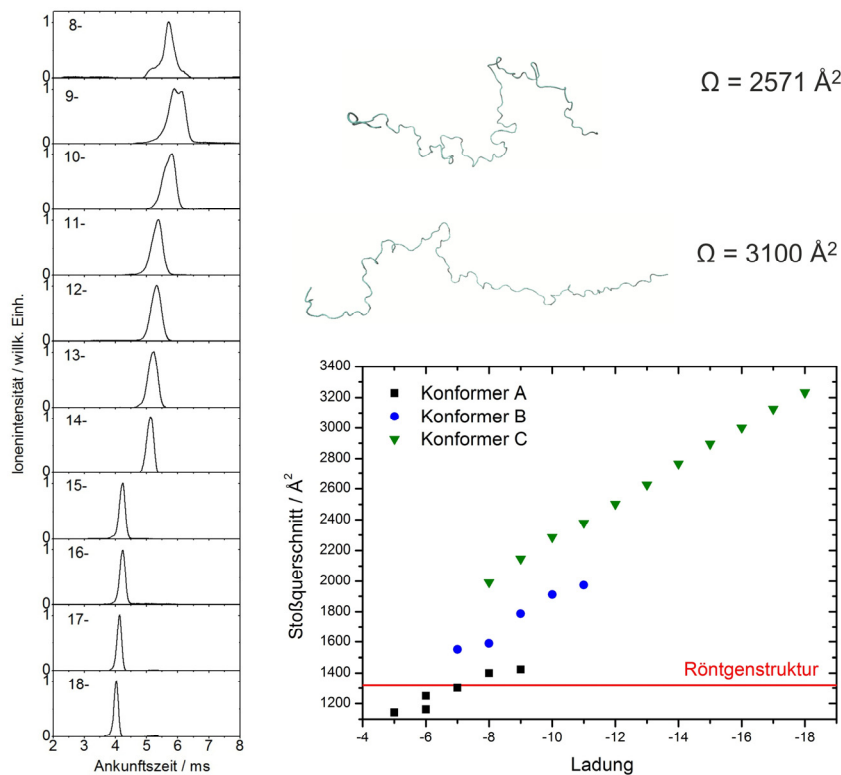
Diese Strukturen (Abbildung 70) verwirklichen schon strukturelle Merkmale von partiell denaturierten Proteinen, deren Entfaltungsprozess zwar bereits begonnen hat, aber gegebenenfalls infolge der Präsenz von Disulfidbrücken nicht vollendet werden kann, sodass lineare Konformationen nicht realisiert werden. Ein Vergleich komplementärer Lysozymkonformationen könnte auch hier von essentieller Bedeutung sein. Insbesondere das Decaanion kann hinsichtlich der Anzahl an COOH-Gruppen lediglich eine einzige Ladungsverteilung erfüllen, während das  $\alpha$ -Lactalbumin 352716 mögliche Permutationen besäße. Der gerade noch maximal nachweisbare Ladungszustand betrug jedoch 6.

## 6.4 Denaturiertes (reduziertes) $\alpha$ -Lactalbumin

Ergänzend erfolgt nun die Betrachtung des voranschreitenden Entfaltungsprozesses des  $\alpha$ -Lactalbumins. Hierzu ist allerdings das Aufbrechen der vier Disulfidbrückenbindungen von Nöten, die diesem Prozess entgegenwirken. Um diese zu lösen, wurde eine wässrige Proteinlösung mit DTT (= Dithiothreitol) versetzt und für 30 Minuten auf 60 °C erhitzt. Da die Reproduzierbarkeit der Massenspektren nicht den Anforderungen entsprach, erfolgte die Reduktion in verdünnter NaOH-Lösung.

### 6.4.1 Ankunftszeiten und Stoßquerschnitte des denaturierten $\alpha$ -Lactalbumins

Die Ankunftszeitverteilungen sowie die Stoßquerschnitte als Funktion der Ladung des reduzierten  $\alpha$ -Lactalbumins (=Konformer C) sind in Abbildung 71 dargestellt.



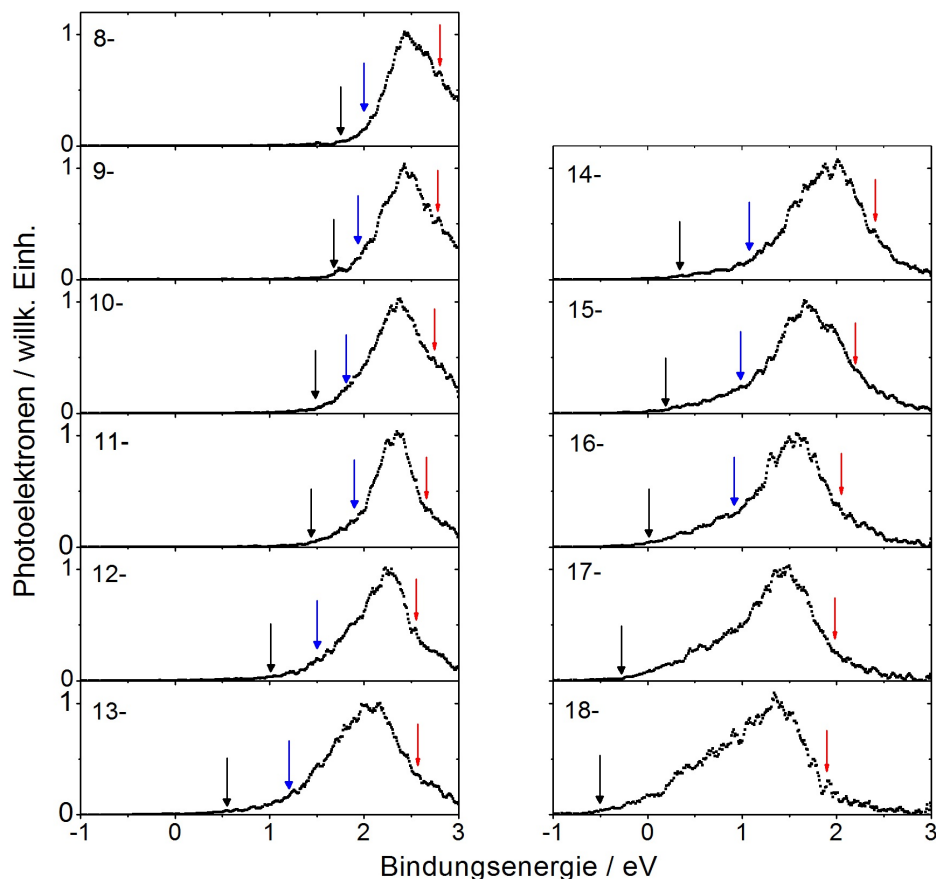
**Abbildung 71:** Ankunftszeiten (links) und Stoßquerschnitte als Funktion des Ladungszustands sowie Strukturvorschläge des entfaltenen reduzierten  $\alpha$ -Lactalbumins (= Konformer C), die nicht repräsentativ für bestimmte Ladungszustände sind. Zum Vergleich sind zusätzlich die Stoßquerschnitte der nativen Form (Konformer A) und der teilweise entfaltenen Form (Konformer B) gezeigt.

Ladungszustand 8 besitzt im Wesentlichen eine dominante Konformation, beinhaltet jedoch zusätzlich eine bei kürzeren Zeiten auftretende weniger intensive überlagerte Struktur. Ebenfalls mindestens zwei Konformationen lassen sich beim Betrachten der beiden Ladungszustände 9 und 10 beobachten. Eine zeitliche Separation ist unmöglich, weshalb die Aufzeichnung nur eines PES jeden Ladungszustands des reduzierten  $\alpha$ -Lactalbumins erfolgte. Hierbei wurde der Laserpuls zeitlich so eingestellt, dass die spektroskopische Untersuchung

bei maximaler Ionenintensität stattfand, jedes PES daher nur ein Ausschnitt der am Peakmaximum beteiligten Konformationen repräsentiert. Alle weiteren Verteilungen der Ladungszustände 11 - 18 erfüllen im Allgemeinen eine einzige Konformerenfamilie. Die experimentellen Stoßquerschnitte, die in Luft bestimmt und gemäß der Ausgleichsgeraden in Anhang B in Heliumquerschnitte umgerechnet wurden, gleichen einer linearen Zunahme als Funktion der Ladung. Allgemeine Strukturvorschläge bzw. deren zugehörige Stoßquerschnitte können Abbildung 71 entnommen werden. Der Ladungszustand 18 stimmt mit einer bereits beinahe linearen Struktur überein. Ladungszustände, die in beiden Formen des  $\alpha$ -Lactalbumins (reduziert bzw. mit intakten Disulfidbrücken) auftreten, unterscheiden sich hinsichtlich der Stoßquerschnitte grundsätzlich voneinander. Die Querschnitte der Konformerenfamilie B und C der Ladungszustände 8 - 11 differieren um ungefähr  $400 \text{ \AA}^2$ .

#### 6.4.2 Photoelektronenspektren des denaturierten $\alpha$ -Lactalbumins

In Abbildung 72 sind die PES (266 nm) des denaturierten  $\alpha$ -Lactalbumins gezeigt.



**Abbildung 72:** PES (266 nm) des reduzierten  $\alpha$ -Lactalbumins, die adiabatischen Detachmentenergien wurden auf zwei verschiedene Arten bestimmt (siehe Text) und die ermittelten Werte jeweils als Pfeil markiert.

Jeder Ladungszustand repräsentiert im Allgemeinen breite Banden. Wieder kann eine Verschiebung der Banden zu geringeren Bindungsenergien mit zunehmender Ladung erfasst

werden, die zudem verbreitert erscheinen und bei großen Ladungszuständen (17 - 18) bereits im negativen Bereich des PES beginnen. Die Verminderung der ADE mit zunehmender Ladung bzw. die Erhöhung der RCB lassen sich auf dieselbe Grundlage zurückführen, nämlich die repulsive Coulombenergie der Überschussladungen. Wird der Ladungszustand eines Moleküls erhöht, sollte folglich die RCB sowie die ADE um einen ähnlichen Betrag wachsen bzw. fallen. Gerade die großen Ladungszustände lassen sich in guter Näherung als Helices beschreiben, die große Ganghöhen besitzen. In einer helikalen Anordnung kann angenommen werden, dass der Austritt des Elektrons angesichts der repulsiven Wechselwirkung senkrecht zur Hauptachse vonstattengeht. Dann entspricht die potentielle Energie des abgelösten Elektrons an dessen Position genau dem die ADE reduzierenden Term aus Gleichung (5.1) und kann näherungsweise als RCB charakterisiert werden. Demzufolge sollte das Hinzufügen von Elektronen lediglich die im PES beobachteten Banden um einen bestimmten Betrag in Richtung kleinerer Bindungsenergien verschieben, was die geringeren Ladungszustände (8-12) ausreichend erfüllen. Eine solche „Symmetrie“ kann für große Ladungszustände (13 - 18) nicht beobachtet werden. Es werden vermehrt schwächer gebundene Elektronen abgelöst, dessen Häufigkeit mit zunehmendem Ladungszustand wächst. Eine mögliche Erklärung bestünde in einer erhöhten Flexibilität des bereits partiell zu einer linearen Kette geöffneten Systems und einer dadurch verbundenen Gegenwart vorübergehender Konformationen, die bezüglich der Coulombenergie energetisch weniger günstig wären und folglich eine geringere ADE besäßen. Ansonsten werden während des Entfaltungsprozesses eines Proteins die stabilisierenden intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen nach und nach gelöst. Dies hat eine Abnahme der ADE einer Carboxylatgruppe auf den Grenzwert des Acetations von schätzungsweise 4,25 auf 3,25 eV zur Folge. Generell werden dann mit zunehmender Ladung mehr und mehr solcher Carboxylatgruppen erzeugt. Deshalb kann dieser voranschreitende Prozess als denkbare Interpretation betrachtet werden, weshalb bei steigender Ladung niederenergetische Banden auftreten, deren Intensität kontinuierlich wächst. Infolgedessen fand eine Bestimmung der adiabatischen Detachmentenergien durch zwei verschiedene Methoden statt: Mittels einer Bestimmung der Energie der am schwächsten gebundenen Elektronen (= BE (2) Abbildung 72) sowie durch Extrapolation der im PES dominanten Bande (= BE (1) Abbildung 72). Bestimmungsmethode (1) konnte aufgrund der Form der Spektren nur bis zu einem Ladungszustand von 16 durchgeführt werden. Außerdem wurde die RCB geschätzt. Zwar sollte diese eine ortsabhängige Funktion beschreiben, aus der Bindungsenergie der in einem PES bei bestimmter Wellenlänge am stärksten gebunden Elektronen kann jedoch zumindest

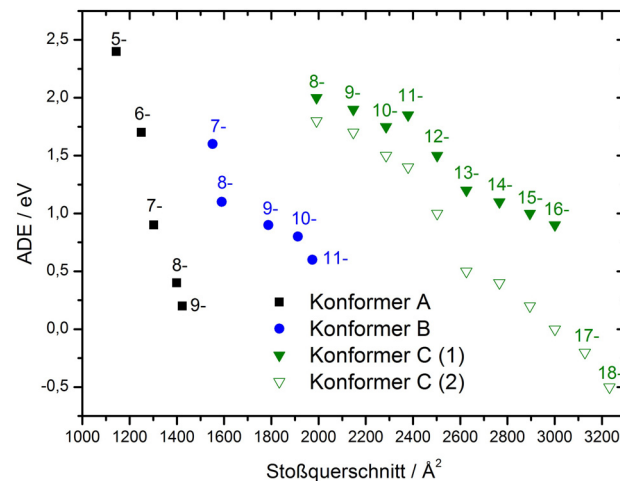
ein Minimalwert erfasst werden. Zur Berücksichtigung von Tunnelemission wurde als Kriterium der Wendepunkt (demnach immer dasselbe Merkmal, da generell nur der Verlauf als Funktion der Ladung von zentraler Bedeutung ist) der absteigenden Flanke definiert (roter Pfeil in Abbildung 72). Diese Beträge sowie die experimentell bestimmten Detachmentenergien sind in Tabelle 7 vereinigt. Hierbei wurde im Allgemeinen die Existenz von *hot bands* vernachlässigt, obwohl (bei solch ausgedehnten Systemen) auch bei Raumtemperatur bereits Schwingungszustände populierte sind. Zwar ließen sich die existenten niederenergetischen Banden auch mithilfe derer Gegenwart begründen, jedoch kann kein plausibles Argument genannt werden, weshalb diese dann nur bei größeren Ladungszuständen in Erscheinung treten. Da die Diskrepanz der beiden adiabatischen Detachmentenergien aller Wahrscheinlichkeit nach (wie beschrieben wurde) auf verminderte innere Solvatisierung der Carboxylatgruppen zurückführbar ist, werden im Folgenden zum besseren Vergleich nur die BE (1) diskutiert, wenn die BE (2) auch aus Gründen der Vollständigkeit immer mit angeführt werden.

<b>Ladung</b>	<b>BE (1) / eV</b>	<b>BE (2) / eV</b>	<b>RCB / eV</b>
8-	2,0	1,8	1,8
9-	1,9	1,7	1,9
10-	1,8	1,5	2,0
11-	1,9	1,4	2,1
12-	1,5	1	2,2
13-	1,2	0,5	2,2
14-	1,1	0,4	2,3
15-	1,0	0,2	2,5
16-	0,9	0	2,7
17-	-	-0,2	2,8
18-	-	-0,5	2,8

**Tabelle 7:** Bestimmte adiabatische Detachmentenergien und repulsive Coulombbarrieren der reduzierten  $\alpha$ -Lactalbuminanionen

Im Wesentlichen hat die Zunahme des Ladungszustands von 8 auf 16 eine Zunahme der RCB um etwa 0,9 eV zur Folge. Je nachdem welche der beiden Methoden zur Bestimmung der BE herangezogen wird, kann eine Abnahme der BE um 1,1 (1) bzw. 1,8 eV (2) abgeleitet werden. Wird die Existenz partiell nicht solvatisierter Carboxylatgruppen größerer Ladungszustände postuliert, können nur die ladungsabhängigen Änderungen von BE (1) bzw. RCB als Merkmal zunehmender Coulombwechselwirkung interpretiert werden. Aus dieser geringen Zu- bzw. Abnahme lässt sich schließen, dass bereits geöffnete Strukturen vorhanden sind (was bereits aus den experimentell bestimmten Stoßquerschnitten bekannt ist).

Auch hier könnte eine Auftragung der experimentell bestimmten ADE (bzw. BE im Falle des denaturierten Proteins) als Funktion des Stoßquerschnitts von Bedeutung sein, da hiermit direkt zum einen die Abhängigkeit der ADE von einer strukturabhängigen Größe direkt dargestellt und zum anderen strukturelle Änderungen erfasst werden können. Eine solche Auftragung ist in Abbildung 73 gezeigt.



**Abbildung 73:** ADE als Funktion des Stoßquerschnitts, beide Bestimmungsmethoden der ADE des reduzierten  $\alpha$ -Lactalbumins (Konformer C) wurden berücksichtigt

Die native Konformation (A) kann eine Erhöhung des Ladungszustands infolge geringerer Abstände der Überschussladungen am wenigsten kompensieren, die Abnahme der ADE verläuft daher hier am kräftigsten (siehe Abbildung 73). Hingegen kann bei der Betrachtung der Konformerenfamilie C nach Bestimmungsmethode (1) nur ein schwacher Abfall der Detachmentenergie beobachtet werden. Der Anstieg der BE (1) von Deca- zu Undecaanion lässt sich voraussichtlich als statistische Abweichung interpretieren. Der Verlauf der ADE des Konformerentyps B genügt einer Abnahme, die zwischen den beiden Extremfällen agiert.

Das bereits mehrfach erwähnte Auflösen der intramolekularen Bindungen während des Entfaltungsprozesses führt zu einer Abnahme der inneren Solvatisierung der auf den Carboxylaten lokalisierten Überschussladungen. Außerdem vergrößern sich die mittleren Abstände der polaren Reste, und es findet ein Wechsel von sphärischer zu helikaler oder linearer Konformation statt. Dies könnte eine allgemeine Abnahme der dielektrischen Abschirmkonstante  $\sigma$  zur Folge haben, was einer Zunahme der ADE eines gleichen Ladungszustands während des Entfaltungsprozesses entgegenwirkt. Aus einer Betrachtung der adiabatischen Detachmentenergien gleicher Ladungszustände unterschiedlicher Konformationen könnten daher wertvolle Indizien erworben werden. Lediglich die Ladungszustände 8 und 9 beinhalten alle drei Typen an Konformationen. Die Zunahme der ADE/BE(1) beim Wechsel von Typ A zu B beträgt in beiden Fällen (8-, 9-) 0,7 eV, der



Wechsel von B zu C 0,9 (8-) bzw. 1,0 eV (9-). Die Tatsache, dass sich die mittleren Abstände der Überschussladungen bei dem hier beobachteten Entfaltungsprozess vergrößern, scheint gegenüber einer potentiellen Abnahme der Abschirmkonstante zu überwiegen, zumindest im Falle von Ladungszuständen, die mehrere Konformerentypen einschließen.

Wird allerdings die Familie C betrachtet, so fällt auf, dass nach den beiden Bestimmungsmethoden der ADE die Diskrepanz der beiden Beträge linear mit steigender Ladung wächst. Die Differenz des Ladungszustands 16 beträgt 0,9 eV und erfüllt damit annähernd die Differenz isolierter und solvatisierter Carboxylatgruppen von 1,0 eV oder mehr.

### 6.4.3 Vergleich mit elektrostatischen Abschätzungen anhand einer Helix

Während die native Form des  $\alpha$ -Lactalbumins näherungsweise einer Kugel gleicht, können qualitative elektrostatische Abschätzungen zur Beschreibung des Typs C anhand einer  $\alpha$ -Helix geschehen, deren mittlere Ganghöhe mit zunehmender Ladung wächst, sodass irgendwann eine lineare Kette vorliegt. Eine typische  $\alpha$ -Helix besitzt eine Ganghöhe  $h$  von 5,4 Å, wobei eine Windung genau 3,6 Aminosäuren umfasst. Der Durchmesser der reinen Helix beträgt in etwa 5 Å, wird durch die nach außen abstehenden Reste jedoch enorm vergrößert. Jedenfalls korrespondiert der Querschnitt entlang der Hauptachse einer Helix in guter Näherung mit dem Querschnitt eines Zylinders. Der Stoßquerschnitt  $\Omega$  ergibt sich zwar aus einem Mittelwert verschiedener Projektionen, kann jedoch trotzdem näherungsweise in Korrelation mit dem Längsquerschnitt eines Zylinders entlang dessen Hauptachse mit der Länge  $d$  gebracht werden:

$$\Omega = n \cdot h \cdot d \cdot \text{const} \quad (6.2)$$

$n$  ist die Anzahl an Windungen. Die Konstante (const) entspricht einem Umrechnungsfaktor, der später genauer definiert wird. Die Länge  $l$  einer Windung des Proteinerückgrates bleibt während des Entfaltungsprozesses konstant und lässt sich berechnen als:

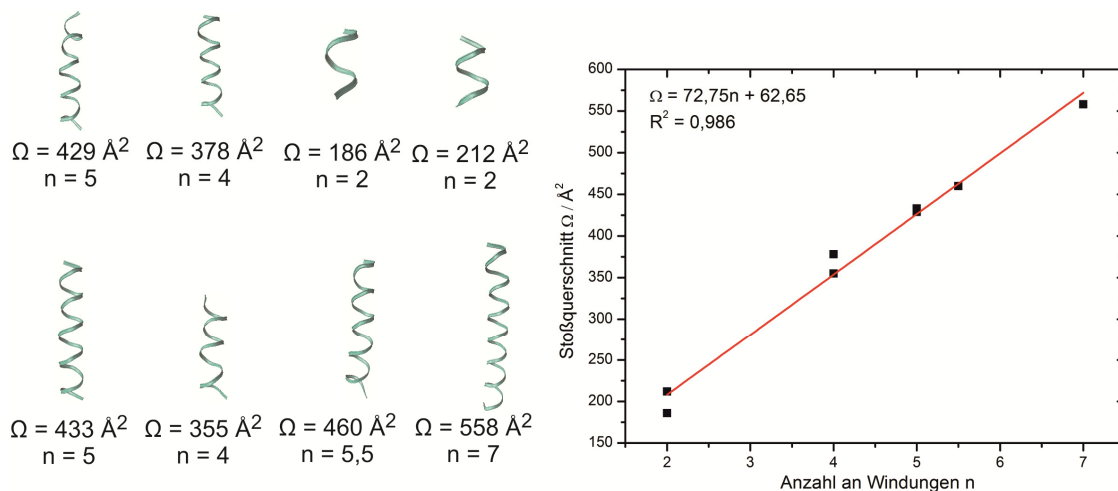
$$l = \sqrt{h^2 + \pi^2 d^2} \quad (6.3)$$

Umformen nach  $h$ , Einsetzen in Gleichung (6.2) und Auflösen nach  $d$  ergibt:

$$d = \sqrt{\left( \frac{1}{2} l^2 \pm \sqrt{\frac{1}{2} l^4 - \left[ \frac{\Omega \pi}{n \cdot \text{const}} \right]^2} \right)} \quad (6.4)$$

Nach dieser Gleichung kann nach Kalibrierung bzw. der Bestimmung der Konstanten, die den Längsquerschnitt eines Zylinders in dessen Stoßquerschnitt umrechnet, jedem Messwert  $\Omega$  die Ganghöhe  $h$  bzw. der zugehörige Durchmesser  $d$  zugeordnet werden.

Das Wachstum einer Helix (das Hinzufügen einer weiteren Windung) lässt sich als lineares System eingliedern, d.h. die Korrelation zwischen Stoßquerschnitt  $\Omega$  und der Anzahl an Windungen  $n$  verläuft linear. Aus diesem Grund kann der Stoßquerschnitt einer perfekten Helix aus der Anzahl an Windungen direkt berechnet werden und zur Ermittlung des Umrechnungsfaktors aus Gleichung (6.4) herangezogen werden. Die hierzu erforderlichen Helices wurden auf folgende Art verschafft: Das aus 74 % an  $\alpha$ -Helices unterschiedlicher Anzahl an Windungen aufgebaute Protein Myoglobin (Röntgenstruktur 2FRF.pdb [135]) wurde in seine einzelnen Helices aufgetrennt, der Stoßquerschnitt jeder Helix berechnet und als Funktion der Anzahl an Windungen aufgetragen (Abbildung 74).



**Abbildung 74:** *Verwendete Helices zur Kalibrierung (links), Stoßquerschnitt einer  $\alpha$ -Helix als Funktion der Anzahl an Windungen (rechts)*

Unter der Annahme, dass der Austausch von Aminosäuren (und damit den nach außen abstehenden Resten der Helix) den Stoßquerschnitt nur geringfügig beeinflusst, lässt sich aus dieser Auftragung eine lineare Funktion extrapolieren. Mithilfe der so erzeugten Geradengleichung kann aus der Anzahl an Windungen  $n$ , die sich aus jeweils 3,6 Aminosäuren zusammensetzen, der Stoßquerschnitt einer Helix direkt errechnet werden.

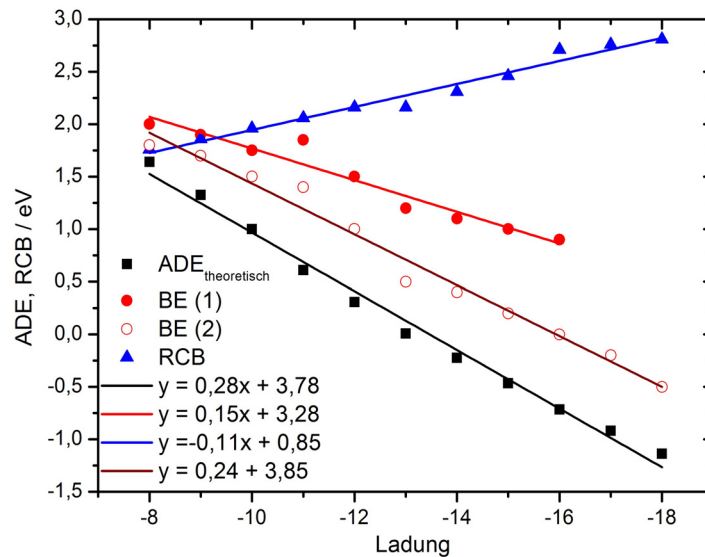
$\alpha$ -Lactalbumin ist ein aus insgesamt 123 Aminosäuren aufgebautes Protein. Wird die reduzierte Variante als Helix betrachtet, sollte das Protein aus 34,17 einzelnen Windungen bestehen. Daraus resultiert unter Verwendung der extrapolierten Beziehung ein Stoßquerschnitt von  $2548 \text{ Å}^2$  (und erfüllt ungefähr den Querschnitt des Dodecaanions). Der Querschnitt der Helix entlang deren Hauptachse beträgt ( $\Omega = ndh$ )  $923 \text{ Å}^2$ . Wird vorausgesetzt, dass das Verhältnis von Zylinderquerschnitt der Helix und dem Gesamtmolekül während dem Entfaltungsprozess in etwa konstant bleibt, dann kann die Länge der Helix eines jeden Stoßquerschnitts und generell eines jeden experimentell beobachteten Ladungszustands näherungsweise abgeschätzt werden. Die in Gleichung (6.4) erforderliche Konstante lässt sich 108

direkt aus dem Verhältnis des Stoßquerschnitts der perfekten Helix (aus der Extrapolation) und deren Längsquerschnitt (ohne Berücksichtigung der Reste) errechnen, sodass dieser Wert 2,76 beträgt. Die so berechneten Daten aller Ladungszustände sind in Tabelle 8 aufgelistet.

<i>Ladung</i>	<i>Stoßquerschnitt / Å<sup>2</sup></i>	<i>Ganghöhe / Å</i>	<i>Durchmesser / Å</i>	<i>Gesamthöhe / Å</i>	<i>Länge / Å</i>
8-	1992	4,1	5,1	140,9	567,2
9-	2147	4,5	5,1	152,8	567,2
10-	2286	4,8	5,1	163,6	567,2
11-	2379	5,0	5,0	171,0	567,2
12-	2502	5,3	5,0	181,0	567,2
13-	2626	5,6	5,0	191,1	567,2
14-	2766	5,9	4,9	203,0	567,2
15-	2895	6,3	4,9	214,3	567,2
16-	3001	6,6	4,9	223,8	567,2
17-	3128	6,9	4,8	235,6	567,2
18-	3231	7,2	4,8	245,7	567,2

**Tabelle 8:** Berechnete Ganghöhen, Durchmesser sowie Gesamthöhen der Helices jeden Ladungszustands

Für eine vorgegebene Verteilung der Überschussladungen, die üblicherweise an senkrecht zur Hauptachse der Helix abstehenden Seitenketten (der Asparagin- und Glutaminsäure) lokalisiert sind, können die Detachmentenergien aller Ladungszustände unter Anwendung der Gleichung (5.1) direkt abgeschätzt werden. Wird die Sequenz des Proteins, also die exakte Position der Glutamin- und Asparaginsäure vernachlässigt, bestünde eine energetisch günstige Verteilung der Überschussladungen in einer entlang der Hauptachse abwechselnden gegenüberliegenden Anordnung in gleichen Abständen. Die Entfernung der Überschussladungen von der Zentralachse der Helix wurde mit 5 Å einkalkuliert, diese besitzt aber infolge der großen Distanzen innerhalb der Helix ohnehin kaum einen Einfluss. Die mithilfe von Gleichung (5.1) ( $ADE = 4,25$  eV,  $\sigma = 1$ ) gerechneten minimalen adiabatischen Detachmentenergien und die experimentell bestimmten repulsiven Coulombbarrieren sowie die adiabatischen Detachmentenergien sind in Abbildung 75 als Funktion der Ladung dargestellt.



**Abbildung 75:** Abgeschätzte adiabatische Detachmentenergien der Helices als Funktion der Ladung sowie experimentell bestimmte repulsive Coulombbarrieren und adiabatische Detachmentenergien

Offensichtlich kann unter Einsatz dieses Modells eine lineare Abnahme der Detachmentenergien mit zunehmendem Ladungsstand veranschlagt werden. Verglichen mit dem Verlauf der experimentell bestimmten BE (1) bzw. RCB verläuft die Kurve jedoch wesentlich steiler. Aus dem Verhältnis der Steigungen der linearen Anpassung von BE (1) und den theoretisch abgeschätzten Beträgen lässt sich die Abschirmkonstante  $\sigma$  direkt zu etwa 1,9 bestimmen. Wird berücksichtigt, dass diese Betrachtung einen unrealistischen Extremfall darstellt, könnten die Beträge der Abschirmkonstanten  $\sigma$  von dem hier ermittelten stark differieren. Zum einen verbietet die Sequenz des Proteins eine derartig symmetrische Verteilung der Überschussladungen und zum anderen besäße z.B. eine Konformation, die eine innere Wendung (Turn) der Helix um  $180^\circ$  enthält, einen vergleichbaren Stoßquerschnitt, allerdings stark verminderte Abstände der Überschussladungen. Die Folge wäre eine geringere adiabatische Detachmentenergie. Eine Anpassung an das Experiment sollte eine größere Abschirmkonstante  $\sigma$  liefern.

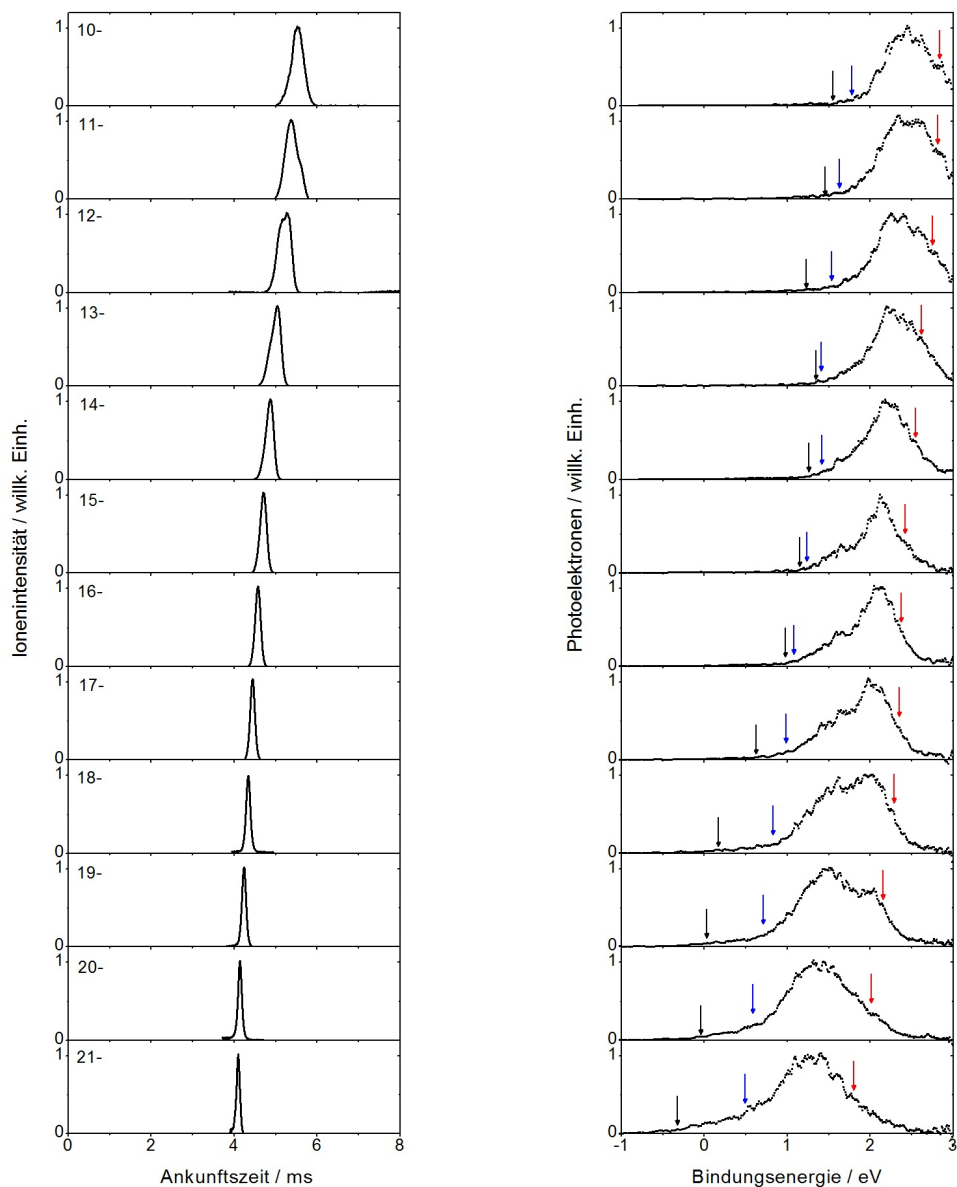
In die Überlegungen / Rechnungen nicht miteinbezogen wurde die allgemeine Tatsache, dass lediglich 40 % des nativen Proteins aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist. Ähnliche Stoßquerschnitte könnten auch realisiert werden, wenn die einzelnen Helices der Sequenz über längere Bereiche verbrückt wären, die beispielsweise aus einem denaturierten  $\beta$ -Faltblatt zustande kommen, gleichzeitig die Helices aber in kompakterer Weise (kleinere Ganghöhe als der berechneten) in Erscheinung treten. Demnach könnten gar längere Konformationen gebildet werden, die aufgrund vergrößerter Ladungsabstände geringere Detachmentenergien besäßen, sodass folglich die Abschirmkonstante  $\sigma$  als kleiner bewertet werden müsste. Daher wäre ein

Vergleich mit einem ähnlichen denaturierten Protein angemessen, das über einen größeren Anteil an  $\alpha$ -Helices in dessen nativer Erscheinungsform verfügt, wie beispielsweise das Myoglobin (Anteil an  $\alpha$ -Helices: 74 %), dessen Spektren im nächsten Abschnitt behandelt werden.

## **6.5 Myoglobin**

### **6.5.1 Ankunftszeiten und Photoelektronenspektren von Myoglobin**

Zum Einsatz kam ein aus Pferdeherzen extrahiertes Myoglobin. Es fand ausschließlich eine Untersuchung der beim Elektrosprühen vorzugsweise gebildeten Variante statt, die keine Hämgruppe beinhaltet. Insgesamt 22 Carboxylatgruppen können deprotoniert werden, die Sequenz ist in Anhang D gezeigt. Eine variierende Konzentration an Kaliumhydroxyd der verwendeten 0,1 mM Lösung (Methanol/Wasser 4:1) ermöglichte die Bildung denaturierter Ionen vieler Ladungszustände von 10 - 21. Deren Ankunftszeiten sowie die PES (266 nm) sind in Abbildung 76 gezeigt.



**Abbildung 76:** Ankunftszeiten (links) und PES (266 nm, rechts) der Myoglobinanionen. Die adiabatischen Detachmentenergien wurden auf zwei verschiedene Arten bestimmt (schwarzer Pfeil: BE (2), blauer Pfeil: BE (1)), außerdem wurden die repulsiven Coulombbarrieren abgeschätzt (roter Pfeil).

Zum Teil können asymmetrische Ankunftszeitverteilungen beobachtet werden. Konformationen, die zeitlich voneinander getrennt werden können, bestehen bei keinem untersuchten Ladungszustand. Die PES zeigen breite, stückweise recht asymmetrische Banden. Die in Kapitel 6.4 auf verminderte innere Solvatisierung zurückgeführten niederenergetischen Banden gewinnen auch hier bei größeren Ladungszuständen an Bedeutung. Deshalb fand auch hier die Bestimmung der adiabatischen Detachmentenergien auf zwei verschiedene Arten statt, aus einer Extrapolation der das PES beherrschenden Bande sowie aus einer Bestimmung der Bindungsenergie der am schwächsten gebundenen Elektronen. Außerdem fand eine Abschätzung des Minimalwerts der RCB statt (roter Pfeil).

Diese Beträge sowie die experimentell ermittelten Stoßquerschnitte, (die in Luft bestimmt und unter Zuhilfenahme der Ausgleichsgeraden in Anhang B in Heliumquerschnitte umgerechnet wurden) sind in Tabelle 9 aufgelistet.

<i>Ladung</i>	<i>Stoßquerschnitt / Å<sup>2</sup></i>	<i>BE (1) / eV</i>	<i>BE (2) / eV</i>	<i>RCB / eV</i>
-10	2528	1,8	1,6	1,8
-11	2687	1,7	1,5	1,9
-12	2814	1,6	1,3	1,9
-13	2912	1,4	1,4	2,1
-14	3053	1,4	1,3	2,2
-15	3135	1,3	1,2	2,3
-16	3233	1,1	1,0	2,3
-17	3348	1,0	0,7	2,3
-18	3453	0,9	0,2	2,4
-19	3540	0,7	0,0	2,5
-20	3671	0,6	-0,1	2,7
-21	3810	0,5	-0,3	2,9

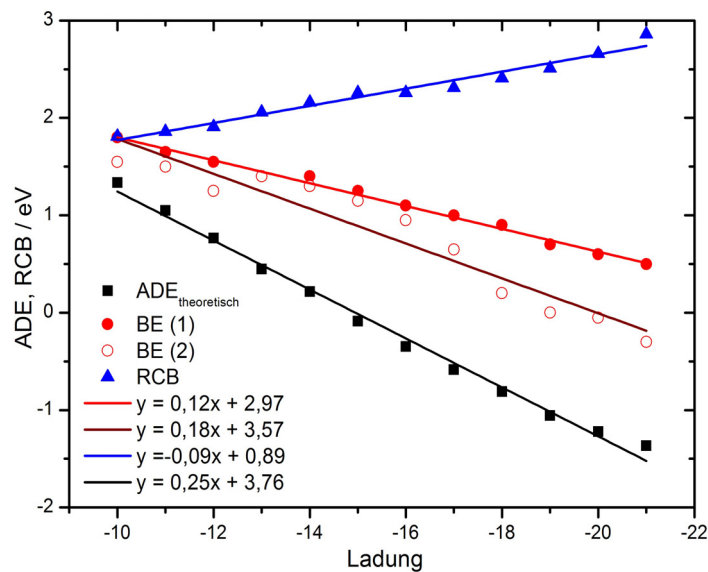
**Tabelle 9:** Experimentell bestimmte Stoßquerschnitte, adiabatische Detachmentenergien und repulsive Coulombbarrieren der Myoglobinanionen

Alle experimentell bestimmten Stoßquerschnitte entsprechen bereits teilweise gestreckten Strukturen. Der Entfaltungsprozess schreitet mit zunehmender Ladung weiter voran (was sich in einer Zunahme des Stoßquerschnitts bemerkbar macht). Die mithilfe zwei verschiedener Methoden ermittelten Detachmentenergien [BE (1) und BE (2)] weichen bei kleineren Ladungszuständen kaum voneinander ab. Größere Ladungszustände zeigen allerdings einen ausgeprägten Kontrast, was unter Umständen dem bereits diskutierten Abbau der inneren Solvatisierung einiger am Detachmentprozess beteiligter Carboxylatgruppen gerecht wird. BE (1) sowie der Minimalbetrag der RCB fallen bzw. steigen in ähnlichem Umfang. Die experimentell bestimmten Stoßquerschnitte erlauben abermals eine Betrachtung als Helix, die sich mit zunehmender Ladung einer linearen Kette nähert und nachfolgend ausführlicher erläutert wird.

### 6.5.2 Vergleich mit elektrostatischen Abschätzungen anhand einer Helix

Das aus 153 Aminosäuren aufgebaute Protein Myoglobin würde als Helix betrachtet 42,5 Windungen involvieren. Die berechneten Daten der Helices aller Ladungszustände können dem Anhang E entnommen werden. Der zur Berechnung nach Gleichung (5.1) notwendige Betrag der ADE einer Carboxylatgruppe betrug 4,25 eV, die Abschirmkonstante  $\sigma$  wurde gleich eins gesetzt. Eine zu Kapitel 6.4.3 postulierte analoge Ladungsverteilung aus einer abwechselnd gegenüberliegenden Anordnung bei zugleich maximalen Abständen der Überschussladungen entlang der Hauptachse fungierte zur Berechnung der adiabatischen Detachmentenergien. Diese Werte sind gemeinsam mit den experimentellen

Detachmentenergien und repulsiven Coulombbarrieren als Funktion der Ladung in Abbildung 77 vereinigt.



**Abbildung 77:** *Abgeschätzte adiabatische Detachmentenergien der Helices als Funktion der Ladung sowie experimentell bestimmte repulsive Coulombbarrieren und adiabatische Detachmentenergien*

Wieder lässt sich beobachten, dass der geschätzte Einbruch der Detachmentenergien mit zunehmender Ladung steiler verläuft als der Abfall oder die Zunahme der BE (1) und RCB. Aus den Verhältnissen der Steigungen von BE (1) und  $ADE_{\text{theoretisch}}$  lässt sich die Abschirmkonstante  $\sigma$  zu 2,1 bestimmen (und fällt damit im Vergleich zu dem denaturierten  $\alpha$ -Lactalbumin nur minimal größer aus). Demzufolge können keine charakteristischen Unterschiede der beiden (denaturierten) Proteine erfasst werden, obwohl der Anteil an  $\alpha$ -Helices beider Proteine stark differiert. Zwar bestehen bezüglich der Größe der Systeme extreme strukturelle Unsicherheiten, vereinfacht können die bereits geöffneten Ionen offenbar trotzdem (näherungsweise) als Helices mit Abschirmkonstanten von etwa 2 beschrieben werden. Diese Beträge sind vereinbar mit theoretisch berechneten Dielektrizitätskonstanten im Inneren eines Proteins [101-105]. Da die Beschreibung als Helix bei absolut symmetrischer Anordnung der Überschussladungen nur einen theoretischen Grenzfall darstellt, können die ermittelten Abschirmkonstanten aller Wahrscheinlichkeit nach als Minimalwert betrachtet werden.

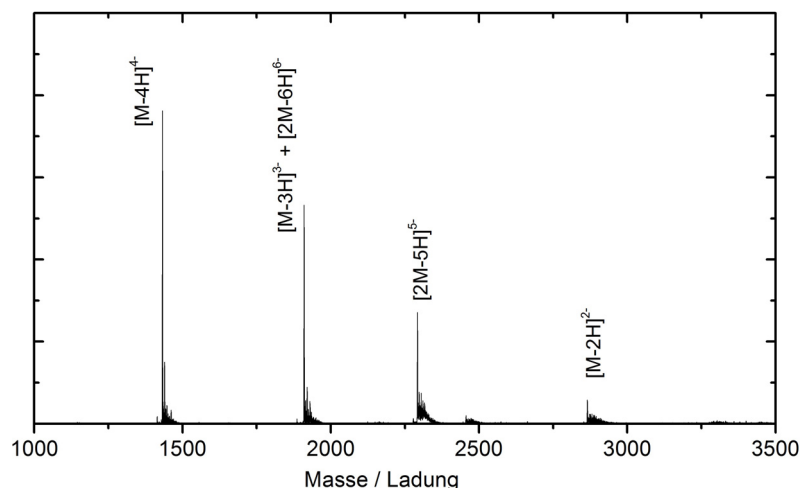
## 6.6 Insulin

Nachdem nun die strukturellen und dielektrischen Eigenschaften einzelner Proteine in der Gasphase charakterisiert wurden, geschieht nun als finale Betrachtung eine Analyse ganzer Aggregate. Sog. Fibrillen des Insulins wurden bereits häufiger in saurer Lösung und / oder erhöhter Temperatur von etwa 60° C dokumentiert. Diese lineare Aggregatbildung findet



unter der Ausbildung intermolekularer  $\beta$ -Faltblattstrukturen statt. [136,137,138,139,140]. Mithilfe von Ionenmobilitätsmessungen konnten solche Strukturen kleinerer Peptide bereits in die Gasphase überführt und anhand der einzelnen Übereinstimmungen (der Stoßquerschnitte) mit verglichenen theoretischen Strukturen Mechanismen in Bezug auf deren Bildungskinetik postuliert werden [141,142,143,144]. Messungen von PES mit der hier verwendeten Anlage bedürfen dennoch mehrfach geladener Anionen, die aus saurer Lösung kaum zugänglich sind, in der die Fibrillenbildung üblicherweise beobachtet wird. Die Anwesenheit von Dimeren und höheren Aggregaten kann hingegen auch in basischer Lösung nicht ausgeschlossen werden [145,146].

Insulin besteht aus zwei verschiedenen Peptidketten (1) und (2), die über zwei Disulfidbrücken miteinander vereinigt sind. Die Sequenz des hier verwendeten Schweineinsulins ist in Anhang D gezeigt. Auf beiden Peptidketten sitzen jeweils 3 COOH-Gruppen. Gesprüht wurde eine 0,2 mM Mischung aus Ammoniaklösung (5 %) und Methanol im Verhältnis 1:4. Ein (Orbitrap)-Massenspektrum ist in Abbildung 78 gezeigt.



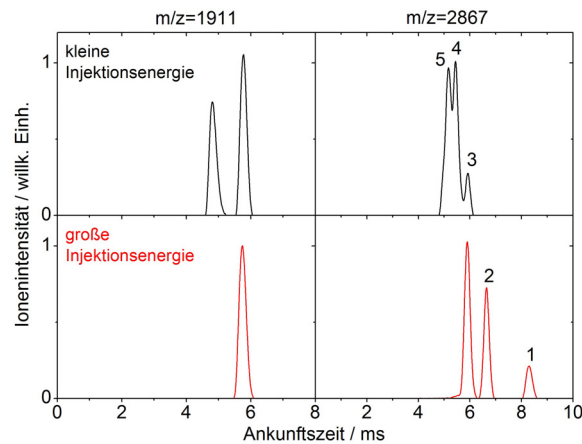
**Abbildung 78:** Massenspektrum des Insulins

Neben Monomeren der Ladungszustände 2, 3 und 4 kann auch ein Dimerpentaanion beobachtet werden. Die Analyse der Isotopenverteilung des Monomertrianions lässt außerdem auf ein zusätzliches Dimerhexaanion schließen. Im Bereich von  $m/z = 2460$  erscheinen Hinweise hinsichtlich einer Präsenz von Trimerheptaanionen. Das Signal zu Rausch Verhältnis lässt jedoch keine eindeutige Aussage zu.

### 6.6.1 Ankunftszeiten und Stoßquerschnitte der Insulinanionen

Obwohl anhand des Orbitrap-MS keine höheren Aggregate nachgewiesen werden konnten, wurden trotzdem unter besonders schonenden Injektionsbedingungen (kleine Injektionsenergie, siehe 4.3) Oligomere an der genutzten IMS-PES-Anlage beobachtet. Alle

bestimmten Luftstoßquerschnitte ließen sich mithilfe der Ausgleichsgeraden aus Anhang B in Heliumquerschnitte umrechnen. Zwei ausgewählte Ankunftszeitverteilungen massenselektierter Ionenpakete ( $m/z = 1911$  und  $2867$ ) sind in Abbildung 79 bei jeweils zwei unterschiedlichen Injektionsenergien dargestellt.



**Abbildung 79:** Ankunftszeiten der Insulinanionen bei Masse zu Ladungsverhältnissen von 1911 und 2867 bei jeweils zwei unterschiedlichen Injektionsenergien

Die Konformation bei größeren Ankunftszeiten ( $m/z = 1911$ ), die unter beiden Injektionsbedingungen erscheint, besitzt einen Stoßquerschnitt von  $695 \text{ \AA}^2$  und weicht damit minimal von dem Querschnitt der Röntgenstruktur eines Monomers von  $740 \text{ \AA}^2$  (1TRZ.pdb [147]) ab. Unter milden Injektionsbedingungen zeigt die Ankunftszeitverteilung ein Signal bei kleineren Zeiten. Der Stoßquerschnitt im Falle eines Monomers betrüge  $550 \text{ \AA}^2$  und würde demzufolge einer um 20 % kompakteren Struktur entsprechen, sodass ein Monomer quasi ausgeschlossen werden kann. Ein Dimer mit gleichem  $m/z$  würde im elektrischen Feld die doppelte Beschleunigung erfahren. Da der Stoßquerschnitt (zumindest des nativen Proteins) allerdings keinesfalls das Doppelte eines Monomers beträgt, erscheint es im Vergleich dazu bei kleineren Driftzeiten. Daher kann dieses schnellere Ionensignal in Übereinstimmung mit dem Orbitrap-MS einem Dimer zugeordnet werden, das einen Stoßquerschnitt von  $1102 \text{ \AA}^2$  besitzt.

Eine Ankunftszeitverteilung, die aus insgesamt fünf zeitlich separierbaren Ionenpaketen besteht, weisen Insulinanionen eines  $m/z$  von 2867 auf. Unter der Annahme eines Monomers erfüllt das Signal bei größten Ankunftszeiten einen Stoßquerschnitt von  $675 \text{ \AA}^2$  und genügt damit der nativen Struktur. Als Monomere betrachtet besäßen die anderen Ionen hingegen zu geringe Stoßquerschnitte, woraus auf Oligomere geschlossen werden kann. Die am wenigsten raumfüllende Variante einer Aggregatbildung entspräche einem sphärischen Wachstum. Der Stoßquerschnitt entwickelt sich hierbei proportional zu  $n^{2/3}$ . Aus dem Stoßquerschnitt kann

demzufolge im Falle einer möglichst kompakten Form der Aggregatbildung ein Erwartungswert  $\Omega_{\text{theoretisch}}$  (sphärisch) einer jeden Größe bestehend aus  $n$  Einheiten errechnet werden, wozu der Messwert des potentiellen Monomerdianions von  $675 \text{ \AA}^2$  genutzt wurde. Ferner können die Querschnitte eines linearen Wachstums geschätzt werden. Diese Vermehrung stellt eine obere Grenze dar. Hierzu wurde der Stoßquerschnitt eines Insulindimers ( $= 1190 \text{ \AA}^2$ ) berechnet und eine lineare Anpassung (siehe außerdem Abschnitt 6.4.3) durchgeführt. Um eine Kalibrierung an die experimentellen Daten zu erzielen, fand eine Verschiebung des y-Achsenabschnitts statt, sodass diese Gerade den potentiellen Wert des Monomers von  $675 \text{ \AA}^2$  beinhaltet. Außerdem lässt sich aus den Ankunftszeiten jeder denkbaren Aggregatgröße  $n$  ein Stoßquerschnitt bestimmen. Diese Werte sind in Tabelle 11 bis zu einer Größe von sechs Einheiten gezeigt.

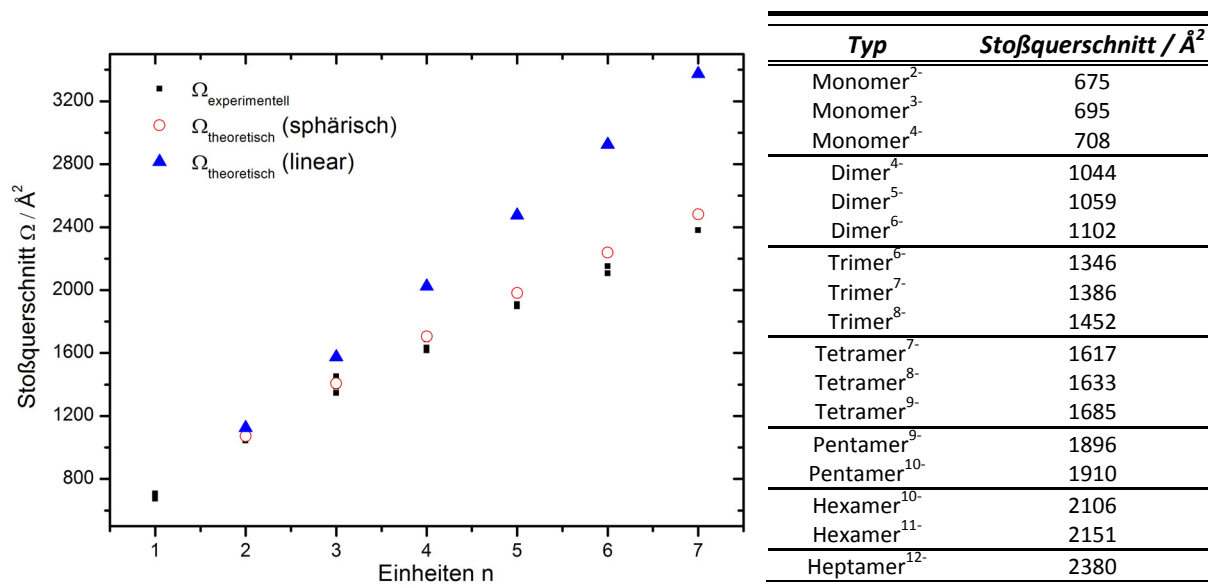
Einheiten $n$	Stoßquerschnitt / $\text{\AA}^2$					$\Omega_{\text{theoretisch}} / \text{\AA}^2$	
	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	sphärisch	linear
1	675	522	449	409	382	675	675
2	(1350)	1044	(897)	(817)	(764)	1074	1125
3	(2025)	1566	1346	(1225)	(1164)	1409	1575
4	(2700)	2088	1795	1633	(1528)	1709	2025
5	(3375)	2610	2243	2041	1910	1984	2475
6	(4050)	3132	2692	2450	2292	2242	2925

**Tabelle 10:** Stoßquerschnitte denkbarer Aggregate der Insulinanionen bei einem  $m/z$  von 2867 sowie gerechnete Querschnitte unter der Annahme eines sphärischen und linearen Aggregatwachstums, die rot eingefärbten Beträgen entsprechen der besten Übereinstimmung zwischen Experiment und Theorie.

Aufgrund des Stoßquerschnitts der nativen Form von  $675 \text{ \AA}^2$  können alle Aggregate der ersten Zeile ( $n = 1$ ) in Tabelle 10 ausgeschlossen werden. Diese Werte sind bereits grau unterlegt. Zudem lassen sich innerhalb einer Zeile (gleiche Aggregateinheit  $n$ ) bezüglich der linearen Vermehrung als Obergrenze bzw. der sphärischen Aggregatbildung als Untergrenze bestimmte Aggregate eliminieren. Als willkürliches Kriterium wurde eine Abweichung von mehr als 10 % gewählt. Diese Beträge sind in Tabelle 10 eingeklammert aufgelistet. Die Existenz eines Monomers für Peak 1 steht folglich außer Frage. Allen anderen Ionenpaketen lassen sich dagegen mehrere Einheitsgrößen  $n$  zuordnen. Eine gute Korrespondenz der theoretischen und experimentellen Querschnitte liegt vor, wenn die beobachteten Ionenpakete näherungsweise von kleinen zu großen Ankunftszeiten als sphärisches Pentamer, Tetramer, Trimer, Dimer und Monomer betrachtet werden. Mehr Gewissheit könnte nur eine genaue Analyse der exakten Isotopenverteilung eines mittels IMS zeitlich aufgetrennten Ionenpakets erzielen. Hierfür essentiell wäre ein hochauflösendes Massenspektrometer bei einer Wiederholrate im Mikrosekundenbereich (z.B. [148]). Gemäß der Gegebenheit, dass üblicherweise kleinere Einheiten in typischen ESI-MS-Experimenten beobachtet werden,

außerdem bei Vergrößerung der Injektionsenergie (siehe Abbildung 79) Fragmentation in überwiegend Monomere und andere kleinere Einheiten stattfindet, werden im Folgenden die Ionenpakete den kleinsten möglichen Einheiten  $n$  zugeteilt.

Tabelle 11 enthält die Messwerte eines jeden Ladungszustands. Alle experimentell bestimmten Stoßquerschnitte als Funktion der Aggregatgröße sowie die Erwartungswerte sphärischer und linearer Aggregate sind in Abbildung 80 vereinigt. Die Ankunftszeiten sind in Anhang F gezeigt.



Typ	Stoßquerschnitt / $\text{Å}^2$
Monomer <sup>2-</sup>	675
Monomer <sup>3-</sup>	695
Monomer <sup>4-</sup>	708
Dimer <sup>4-</sup>	1044
Dimer <sup>5-</sup>	1059
Dimer <sup>6-</sup>	1102
Trimer <sup>6-</sup>	1346
Trimer <sup>7-</sup>	1386
Trimer <sup>8-</sup>	1452
Tetramer <sup>7-</sup>	1617
Tetramer <sup>8-</sup>	1633
Tetramer <sup>9-</sup>	1685
Pentamer <sup>9-</sup>	1896
Pentamer <sup>10-</sup>	1910
Hexamer <sup>10-</sup>	2106
Hexamer <sup>11-</sup>	2151
Heptamer <sup>12-</sup>	2380

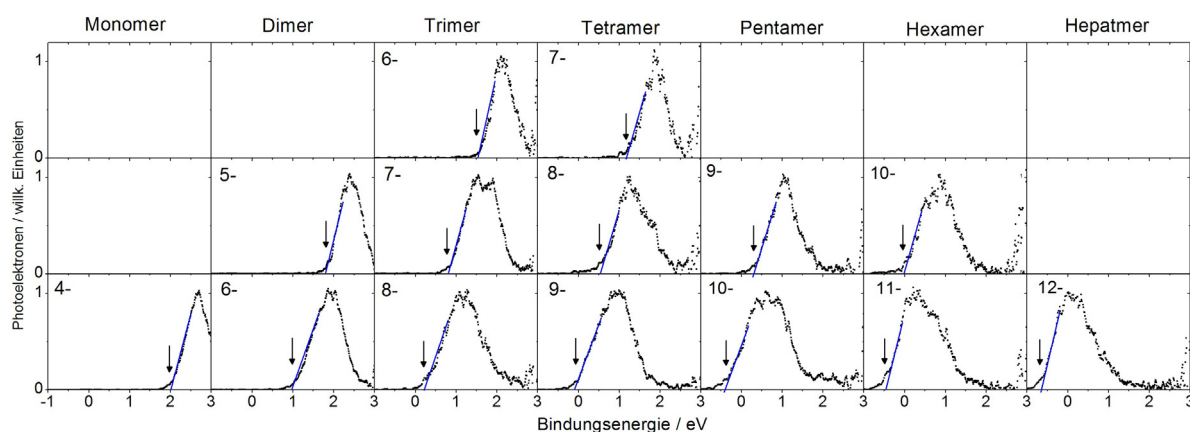
**Abbildung 80:** Experimentelle Stoßquerschnitte als Funktion der Einheiten  $n$ , sowie der Ober- und Untergrenzen **Tabelle 11:** Stoßquerschnitte der Insulinanionen

Der Verlauf der Stoßquerschnitte stimmt näherungsweise mit einem sphärischen Wachstum der Aggregate überein. Die Messwerte liegen jedoch minimal unterhalb der Erwartungskurve einer solchen Vermehrung. Wird ferner in die getätigten Überlegungen miteinbezogen, dass die nativen Proteineinheiten, insbesondere die kleineren Aggregateinheiten  $n$ , nicht sphärisch ohne Ausbildung hohler Bereiche zusammengefügt werden können, fällt diese Unstimmigkeit noch stärker ins Gewicht. Es kommen verschiedene Erklärungsmöglichkeiten in Frage: Die Berechnung der Heliumquerschnitte fand unter Zuhilfenahme einer Kalibrierkurve statt, die die experimentell bestimmten Luftquerschnitte in zugehörige Heliumquerschnitte umrechnet (siehe Anhang B). Speziell hier erfolgte dagegen eine Anpassung an die experimentellen Messdaten (Monomerdianion), sodass die in Anhang B diskutierten Fehlerquellen nicht berücksichtigt werden müssen. Als potentielle Unsicherheit kann daher die Verwendung dieses Messwerts genannt werden. Neben diesem Messfehler spielt dennoch eine andere Fehlerquelle eine folgenschwere Rolle. Wird die Ladung einer nativen Proteineinheit erhöht,

dann kann üblicherweise eine Zunahme der Stoßquerschnitte vernommen werden, beispielsweise um etwa 5 % beim Wechsel von Monomerdianion zu Monomertetraanion. Andererseits fällt die mittlere Anzahl an Ladungen pro Proteineinheit mit zunehmender Aggregatgröße ab, sodass beispielsweise die Querschnittsberechnung eines sphärischen Heptamerdodecaanions anhand eines hypothetischen 1,7fach (=12/7) geladenen Monomeranions vollzogen werden sollte. Dieses native Ion sollte im Hinblick auf den kleineren Ladungszustand einen verminderten Stoßquerschnitt besitzen. Beträgt die Abweichung des vorliegenden Stoßquerschnitts eines Proteinmonomers nur 1 %, dann entwickelt sich der Fehler mit  $\Delta\Omega(n) = \Delta\Omega^{2/3}$ , folglich entspricht die Abweichung eines Heptamers schon 3,7 %. Allerdings beträgt auch die Differenz der beiden Werte (experimentell und theoretisch) lediglich weniger als 5 %. Anhand dieser Überlegung sowie der Tatsache, dass die experimentelle Kurve ohnehin dicht unterhalb eines theoretischen sphärischen Aggregatwachstums liegt, kann hier nur ein solches stattfinden. Ein lineares Wachstum, das bis zu der Bildung von unlöslichen Fibrillen führen kann, muss folglich nicht in Betracht gezogen werden. Inwiefern die beobachteten Aggregate bereits in Lösung vorliegen oder erst beim Elektrosprühen (z.B. nach *charge residue model*) entstehen, lässt sich nicht beurteilen.

### 6.6.2 Photoelektronenspektren der Insulinanionen

Die PES (266 nm) dieser Anionen sind in Abbildung 81 dargestellt. Einige zeigten zur Aufnahme eines PES nicht genügend Intensität an Photoelektronen, sodass hierfür keine Spektren gezeigt sind.

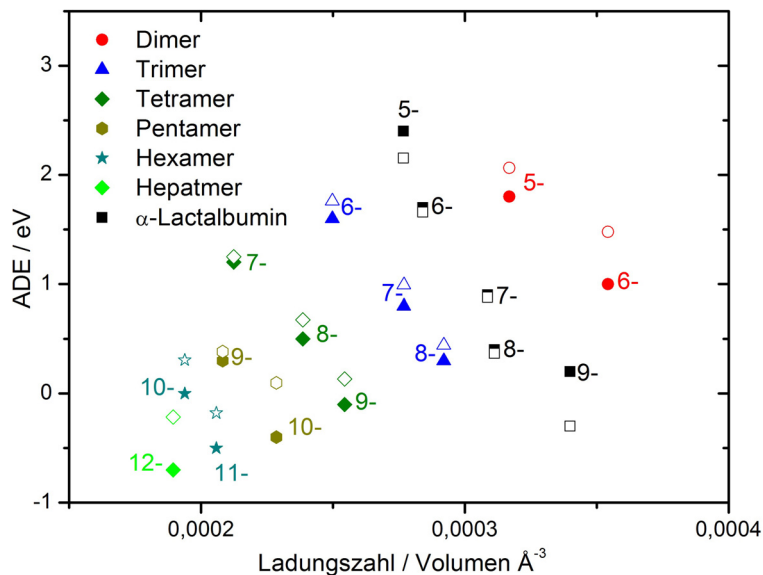


**Abbildung 81:** PES (266 nm) der Insulinanionen

Neben der Bestimmung der adiabatischen Detachmentenergien erfolgte eine Abschätzung der Detachmentenergien anhand eines elektrostatischen Modells, wie in Kapitel 6.3.3 beschrieben wurde. Die Ladungsverteilung eines Decaanions ließ sich mit einem an entgegengesetzten

Flächen zweifach überkappten Würfels verwirklichen, dessen Ecken die Ladungen tragen. Zur Abschätzung der adiabatischen Detachmentenergien von Undeca- und Dodecaanionen wurden Ladungsanordnungen in Form eines dreifach und vierfach überkappten Würfels konstruiert. Die anderen Ladungszustände konnten mit den in Kapitel 6.3.3 genannten Geometrien (trigonale Bipyramide, Oktaeder, pentagonale Bipyramide, Würfel, einfach überkappter Würfel) beschrieben werden. Die vermutlich verwandte Struktur aller Anionen in Form einer Kugel gestattet zudem die Berechnung einer Ladungsdichte (Ladungszahl / Volumen).

Alle experimentell und theoretisch berechneten Daten als Funktion der Ladungsdichten sind in Abbildung 82 vereinigt. Beiläufig sind die Daten der nativen Form des  $\alpha$ -Lactalbumins (Konformer A) dargestellt.



**Abbildung 82:** ADE als Funktion der Ladungsdichte der Insulinanionen und der nativen  $\alpha$ -Lactalbumin Konformerfamilie, theoretisch berechnete Werte sind als leere Symbole dargestellt. Auf die Darstellung des  $\alpha$ -Lactalbuminhexaanions (A) wurde verzichtet. Das Insulinmonomertetraanion liegt außerhalb des gezeigten Bereichs.

Auch hier kann eine Abnahme der ADE erfasst werden, wenn der Ladungszustand einer bestimmten Aggregatgröße steigt. Beispielsweise beträgt der Abfall der Bindungsenergie beim Wechsel von Trimerhexaanion zu Trimeroctaanion 1,3 eV.

Grundsätzlich geht der Übergang zu einer größeren Aggregatgröße  $n$  mit einer Abnahme der Ladungsdichte eines solchen Proteinkomplexes einher. Werden gleiche Ladungszustände zweier Größen  $n$  verglichen, dann besitzt (wie erwartet) die größere Aggregatnummer  $n$  auch die größere ADE. Eine Zunahme um eine einzige Einheit fällt jedoch vor allem bei bereits größeren ( $n \geq 3$ ) Systemen gering (typischerweise 0,3 - 0,4 eV) aus.

Ein Vergleich mit experimentellen Befunden der nativen Gasphasenform des  $\alpha$ -Lactalbumins ergibt weitere interessante Aspekte. Die Gegenüberstellung gleicher Ladungszustände zeigt, dass die adiabatischen Detachmentenergien einiger Insulinaggregate, verglichen mit Ionen des nativen  $\alpha$ -Lactalbumins, trotz teilweise klar geringerer Ladungsdichten kleiner ausfallen. Beispielsweise beträgt die ADE des  $\alpha$ -Lactalbuminocataanions 0,4 eV, während eine ADE von 0,3 eV des Insulintrimerocataanions mit geringerer Ladungsdichte ermittelt wurde. Noch ausgeprägtere Unterschiede können bei der Betrachtung des  $\alpha$ -Lactalbuminnonaanions und des Insulintetramernonaanions erfasst werden. Hier beziffert sich die ADE des  $\alpha$ -Lactalbumins auf 0,2 eV, die ADE des Insulinoligomeres beträgt -0,1 eV, während die Ladungsdichte des Insulinoligomeres 25 % geringer ausfällt.

Eine Betrachtung der mithilfe des elektrostatischen Modells berechneten adiabatischen Detachmentenergien führt zu dem Ergebnis, dass die Werte (bei  $\sigma = 1$ ) der Insulinoligomeranionen im Allgemeinen tendenziell oberhalb der Messwerte liegen. Andererseits zeigen die gerechneten adiabatischen Detachmentenergien des  $\alpha$ -Lactalbumins einen zum Teil gegensätzlichen Trend, ordnen sich also unterhalb der experimentellen Detachmentenergien ein oder gleichen diesen.

Diese Daten können generell nur in Einklang gebracht werden, wenn die Abschirmung von Überschussladungen des  $\alpha$ -Lactalbumins effizienter vonstattengeht ( $\sigma$  ist größer) oder die Ladungsverteilung der Insulinaggregate asymmetrischer in Erscheinung tritt. Üblicherweise werden zumindest für das Rückgrat von unterschiedlichen Proteinen ähnliche Dielektrizitätskonstanten erwartet, sodass diese erste Interpretation als weniger wahrscheinlich beurteilt werden muss und daher letztere durchaus überzeugender erscheint [101-105]. Unter Umständen werden die an der Oberfläche des Proteins ansässigen Überschussladungen in die beim Aggregieren entstehenden inneren Hohlräume eingeschlossen, sodass zwangsläufig keinesfalls Ladungsverteilungen verwirklicht werden, die unter einer Maximierung der mittleren Ladungsabstände und vor allem Lokalisierung der Ladungen an der Oberfläche des Komplexes einhergehen.

## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mithilfe einer neu entwickelten Anlage zur isomeren- oder konformerenaufgelösten Photoelektronenspektroskopie massenselektierter Multianionen erstmals Messungen an biologisch relevanten Multianionen durchgeführt werden. Hierbei standen hinsichtlich der jeweiligen Konformationen Phänomene wie Ladungslokalisierung und -delokalisierung, innere Solvatisierung von Überschussladungen sowie die aus der Polarisierung des Moleküls resultierende dielektrische Abschirmung von Überschussladungen im Vordergrund. Theoretische Methoden zur Bekräftigung der neuen Erkenntnisse fanden entweder auf quantenchemischer semiempirischer Basis oder anhand einer semiklassischen Näherung statt. Vorangegangene Molekulardynamiksimulationen wurden entsprechend zur Suche des globalen Minimums genutzt.

Allererste Messungen fanden an kleineren Oligonukleotidsträngen  $dN[(x-1)H]_x^{x-1}$  statt. Nachdem sowohl experimentelle als auch theoretische Resultate den Nukleinbasen, insbesondere dem Guanin, annähernd vergleichbare Gasphasenaziditäten wie dem HCl bescheinigten, stand hierbei vor allem die Frage im Mittelpunkt, ob negativ geladene Nukleinbasen in gasförmigen Oligonukleotidmultianionen in der Gasphase vorhanden sind. Erste Indizien lieferte ein Konformer des  $dC_4^{3-}$ . Im Gegensatz zu den mittels IMS zeitlich separierten beiden anderen Strukturen konnte eine prägnante niederenergetische Schulter nachgewiesen werden, die zu einer um 1,0 eV verminderten ADE führt. Da dieses auffällige Kennzeichen als Signatur eines Ablösens von Photoelektronen einer deprotonierten Hydroxylgruppe oder Cytosinbase gedeutet wurde, fand ein Austausch der beiden endständigen Hydroxylgruppen durch Phosphateinheiten statt. Zwar zeigte das Trianion kein zu  $dC_4^{3-}$  analoges charakteristisches Merkmal, beim Wechsel zum Tetraanion konnte dann allerdings zum einen eine Abnahme der ADE um 2,5 eV und zum anderen eine dem Trianion des  $dC_4$  verwandte niederenergetische Schulter beobachtet werden. Ein Vergleich des Photoelektronenspektrums des beinahe identischen Moleküls  $dC_6^{4-}$  erbrachte weitere Indizien, dass auch dem Tetraanion der modifizierten  $dC_4$ -Variante eine weitestgehend andere elektronische Struktur zugrunde liegt. Da hier Hydroxylate ausgeschlossen werden können, wurde die Bande schwach gebundener Elektronen als direktes Ablösen von Elektronen einer deprotonierten (negativen) Cytosinbase interpretiert. Basierend auf diesen Beobachtungen fand ein Wechsel zu größeren Systemen statt. Für Pentanukleotidtetraanionen konnten zwei verschiedene Klassen an elektronischen Strukturen bestätigt werden, die sich hinsichtlich ihrer ADE im Mittel um 1,0 eV unterscheiden. Während auch die Hexanukleotidpentaanionen



des  $dC_6$  und  $dT_6$  zwei Klassen von Anionen bezüglich ihrer elektronischen Struktur signalisierten, ließen  $dA_6$  und  $dG_6$  lediglich eine Sorte erfassen. Mithilfe wellenlängenabhängiger PES-Messungen am  $dC_6^{5-}$  konnte abgeleitet werden, dass konkurrierende Prozesse zum direkten Photodetachment zumindest im relevanten Bereich zur Extrapolation der ADE außer Acht gelassen werden können. Somit kann die allgemeine Gegensätzlichkeit der Spektren nicht in derartigen Prozessen begründet liegen. Da deprotonierte (negative) Basen als Ursache der charakteristischen niederenergetischen Bande in Betracht gezogen wurden, sollten sequenzabhängige PES-Messungen zu einem tieferen Verständnis beitragen. Hier konnte belegt werden, dass die für deprotonierte Adenin- und Guaninbasen postulierten Übergänge nur dann zum Vorschein kommen, wenn diese ausgehend vom 5-Ende an erster oder im Besonderen an letzter Position innerhalb einer Oligonukleotidsequenz vertreten sind. Die folgenden auf semiempirischen Methoden gestützten Rechnungen sollten die Hypothese deprotonierter Nukleinbasen in diesen Gasphasenmultianionen untermauern. Die Bestimmung der mittleren P-P-Abstände anhand eines Vergleichs der Stoßquerschnitte experimenteller sowie theoretischer per Molekuldynamik erzeugter Strukturen ließ nur den Rückschluss zu, dass primär ein Ablösen der Photoelektronen direkt von den Nukleinbasen der Anionen vorstattengehen muss. Zum einen muss bei signifikantem Auftreten eines Ablöses der Photoelektronen von den Phosphatgruppen die ADE zu den direkten Ladungsabständen in umgekehrter Weise proportional sein (was im Widerspruch zu den gerechneten P-P-Abständen steht), zum anderen präsentiert die aus lediglich deprotonierten Phosphatgruppen aufgebaute Klasse eine Tendenz hinsichtlich ihrer adiabatischen Detachmentenergien, die genau die Reihenfolge der Ionisationspotentiale der neutralen Basen erfüllt.

Ausgehend von diesen Beobachtungen und Überlegungen wurden anschließend aus biologischen Aspekten bedeutungsvollere Systeme vorgestellt. Die telomere Sequenz zeigte keine außergewöhnlichen Hinweise im Hinblick auf ihre elektronische Struktur. Anhaltspunkte, dass nach dem Einwirken von UV-Licht und Herausschlagen eines Elektrons das sich im Vergleich zu Referenzsequenzen ergebende positive Loch eine Stabilisierung in überdurchschnittlicher Weise erfährt, waren nicht zu finden. Keine eindeutigen Schlüsse ließen die Untersuchung und Diskussion der Quadruplexanionen zu. Ob die beobachtete Bande im PES ein Ablösen von Elektronen gestapelter Guaninbasen erfüllt, sodass der nach elektronischer Anregung vertikale Endzustand ein über alle gestapelte Guaninbasen delokalisiertes positives Loch mit einbezieht, ließe sich zukünftig anhand von Dichtefunktionalrechnungen bestätigen.

Hingegen konnten einer Duplex anlässlich ihrer im Gegensatz zum Einzelstrang besonders geringen ADE desselben Ladungszustands noch zum Teil in der Gasphase existente elektronische Kopplungsphänomene der Nukleinbasen bescheinigt werden. Diese liegen zum einen in einer GC-Wechselwirkung, die eine Verminderung des Ionisationspotentials des Guanins zur Folge hat und zum anderen in einer noch partiell beständigen  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung begründet.

Eine von Grund auf elementare Einsicht hinsichtlich der beherrschenden Detachmentmechanismen sollte die Besprechung speziell hierzu ausgewählter Peptidtrianionen liefern. Mithilfe von Kraftfeldrechnungen und einer anreihenden Abschätzung möglicher relevanter Übergänge ließ sich der zur Bestimmung der ADE bedeutungsvolle Bereich eines PES dem Lösen der Elektronen von Carboxylaten zuordnen.

Die anschließende Analyse der Proteinanionen bestätigte die bereits zahlreich erfasste Tatsache, dass sowohl ladungsinduzierte als auch thermisch aktivierte Entfaltungsprozesse in der Gasphase vorstattengehen. Je nach Voranschreiten der Proteinentfaltung konnte angesichts der Stoßquerschnitte eine Eingliederung der Konformere in gewisse Familien erfolgen. Diese entsprechen einer nativen und teilweise entfalteten Struktur sowie einer bereits denaturierten Konformation. Während das Protein Cytochrom C drei solcher Klassen offenbarte, zeigte das  $\alpha$ -Lactalbumin lediglich zwei unterschiedliche Konformertypen, was in der Gegenwart der vier Disulfidbrücken begründet liegt. Die Reduktion dieser Einheiten hatte einen wesentlichen Wandel der Gasphasenstrukturen zugunsten entfalteter Konformationen zur Folge. Daneben fand die Bestimmung der elektronischen Struktur jeder beobachteten Konformation statt und verwirklichte nun erstmals die simultane Erfassung der ADE sowie strukturelle Änderungen (durch zusätzliche Ladung oder thermische Aktivierung). Während die native Form durch zusätzliche Ladung einen prägnanten Einbruch der ADE bei gleichzeitig kaum existenter struktureller Änderung offenlegte, konnte der entfalteten Konformation eine mäßige Minderung der ADE bescheinigt werden, die synchron mit einer einflussreichen Öffnung / Entfaltung des Systems abläuft. Dieser Sachverhalt wurde anhand der im Falle offenerer Systeme allgemein vergrößerten Abstände der Überschussladungen dargelegt.

Aus einer Analyse der aus basischer Lösung gesprühten Insulinaggregate konnte ein sphärisches Wachstum abgeleitet werden. Hinweise hinsichtlich einer asymmetrischen Ladungsverteilung, die eine vergleichsweise geringe ADE als Konsequenz hat, ließen sich aus einer Gegenüberstellung der adiabatischen Detachmentenergien und Ladungsdichten der nativen  $\alpha$ -Lactalbuminkonformation gleicher Ladungszustände folgern.

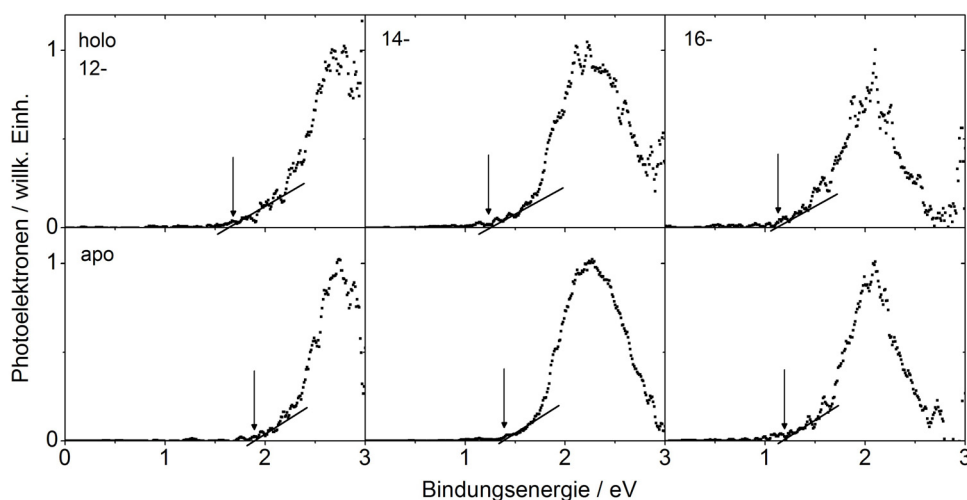
Insbesondere die PES der größeren Ladungszustände (denaturiertes  $\alpha$ -Lactalbumin, Myoglobin) werden durch weit auslaufende niederenergetische Banden registriert und besitzen eine partiell negative ADE. Unterdessen konnte keine vergleichbare Zunahme der RCB nachgewiesen werden. Als potentielle Begründung wurde eine reduzierte innere Solvatisierung der am Detachmentprozess verantwortlichen Carboxylatgruppen genannt, die als ein Resultat der voranschreitenden Entfaltung betrachtet werden können.

Ein theoretischer Vergleich mithilfe elektrostatischer Abschätzungen sollte Informationen über mögliche konformelle Differenzen im Hinblick auf die dielektrischen Eigenschaften ermöglichen. Anhand einer nativen und linearen Form des Cytochroms C erfolgte eine Abschätzung der ADE unter der Hypothese einer Abschirmkonstante  $\sigma$  gleich eins sowie der gemäß der absoluten Coulombenergie günstigsten Verteilung der Überschussladungen. Aus der postulierten Diskrepanz der experimentellen und theoretischen adiabatischen Detachmentenergien bei Verwendung einer realen Abschirmkonstante konnte als Fazit gezogen werden, dass das Elektrosprühen unter keinen Umständen lediglich die homogenste Ladungsverteilung hervorbringt. Eine anschließende elektrostatische Betrachtung der nativen  $\alpha$ -Lactalbuminkonformation als Histogramm unter Einbeziehung willkürlicher und infolgedessen gravierend weniger günstiger Ladungsverteilungen konnte mit dem Experiment nur dann abgestimmt werden, wenn der Wert der Abschirmkonstanten als drei bis vier veranschlagt wurde. Im Gegensatz dazu konnten aber mithilfe eines Kugelmodells, dessen Ladungen in Form eines bestimmten Polyeders auf der Oberfläche der Kugel lokalisiert sind, theoretische und experimentelle Daten in guter Näherung bei Gebrauch von  $\sigma$  gleich eins zur Deckung gebracht werden. Eine Helix, deren Ausdehnung entsprechend den experimentellen Stoßquerschnitten angepasst wurde, sollte der theoretischen Beschreibung der denaturierten Gasphasenproteine Myoglobin und der entfalteten Form des  $\alpha$ -Lactalbumins dienen. Eine Korrespondenz mit den experimentellen Daten ließ sich erfüllen, wenn  $\sigma$  auf einen Wert von ungefähr zwei festgelegt wurde. Zusammenfassend betrachtet differieren die zur Konsistenz experimenteller und theoretischer Daten einkalkulierten Abschirmkonstanten je nach dem postulierten Modell. Daher konnte keine zweifelsfreie Beurteilung bezüglich Differenzen zwischen nativen und entfalteten Gasphasenproteinen vorgenommen werden. Wird jedoch berücksichtigt, dass eine Ladungsverteilung in Form eines Polyeders als unrealistischer Grenzfall begriffen werden muss, lässt sich zumindest ein in allen Konformationen der untersuchten Systeme existenter Betrag der Abschirmkonstante von mindestens zwei postulieren.

## 8 Anhang

### 8.1 Anhang A

Ein weiteres Häm-beinhaltenes Protein stellt das Myoglobin dar. Im Gegensatz zu Cytochrom C ist diese Gruppe nicht kovalent an das Protein gebunden, sodass im Massenspektrum gesprühter Myoglobinlösungen zwei verschiedene Typen von Ionen erscheinen: Ionen, die weiterhin eine Hämgruppe mit sich führen sowie Klassen, die nur noch aus der Proteinkette (ohne Häm) bestehen [149,150]. Insbesondere nach der Deprotonierung beider COOH-Gruppen (große Ladungszustände) könnten Banden im PES erscheinen, die aus dem Entfernen eines Elektrons aus dem Hämssystem resultieren. Daher sind in Abbildung 83 die PES dreier Ladungszustände beider Klassen dargestellt, die als holo (Myoglobin mit Häm) bzw. apo (Myoglobin ohne Häm) bezeichnet werden.



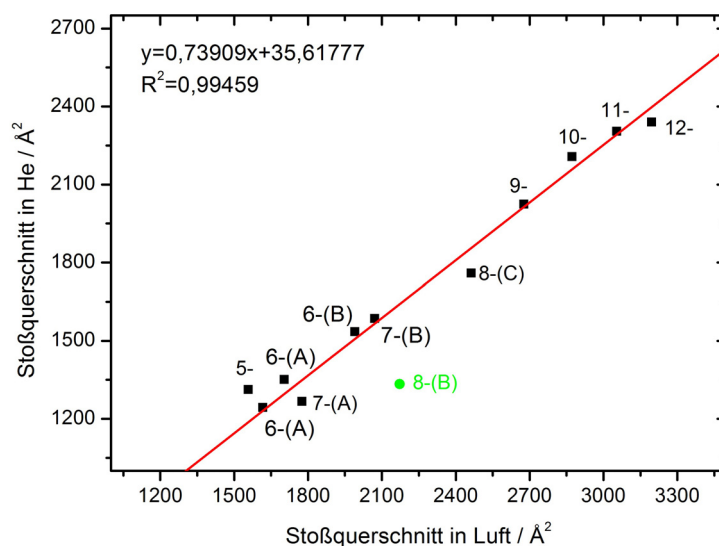
**Abbildung 83:** PES (266 nm) der Myoglobinanionen 12-, 14- und 16- der beiden Klassen (holo mit Häm) bzw. apo (ohne Häm)

Die allgemeine Form der Spektren beider Arten kann als identisch betrachtet werden. Aus der ansteigenden Flanke lässt sich die ADE (als Pfeil angedeutet) jeden Ladungszustands extrapolieren. Die Differenz der adiabatischen Detachmentenergien gleicher Ladungszustände beider Klassen beträgt lediglich 0,1 - 0,2 eV. Dieser Umstand könnte angesichts potentiell schwach gebundener Elektronen des Häms erklärt werden. Eine andere Struktur des Proteins als Ursache wäre jedoch ebenso denkbar. Außerdem ist unbekannt, in welchem Verhältnis die Detachmentwahrscheinlichkeiten des Häms bzw. Proteins zueinander stehen. Zudem lässt sich innere Solvatisierung dieser Gruppe besonders bei niedrigeren Ladungszuständen (kompaktere Struktur) nicht ausschließen. Eine konkrete Aussage, ob nun signifikantes Detachment von Elektronen (von der Hämgruppe) stattfindet, kann mithilfe dieser Messungen demnach nicht getroffen werden. Die Spektren erscheinen jedoch als ungefähr identisch,

sodass diese Hämeinheit zur Diskussion von Photoelektronenspektren in guter Näherung vernachlässigt werden kann.

## 8.2 Anhang B

Mit der hier verwendeten Anlage konnte keine befriedigende Transmission von Proteinanionen bei mit Helium gefüllter Driftzelle beobachtet werden. Dies liegt vermutlich in einem weniger schonenden Übergang von der ersten differentiellen Pumpstufe (1. Teil des Uhrglastrichters, siehe Kapitel 3.2) in die Driftzelle begründet. Wird lediglich die von der Desolvatationskapillare einströmende Luft als Puffergas genutzt, beträgt die Druckdifferenz zwischen den beiden Pumpstufen in etwa 0,1 - 0,2 mbar. Wird die Driftzelle dagegen mit Helium geflutet, muss zur Gewährleistung der Reinheit des Stoßgases eine Druckdifferenz von mindestens 1,0 mbar bestehen. Unter Umständen könnten Strömungseffekte den reibungslosen Übergang in die Driftzelle stören. Andere Ursachen können nicht ausgeschlossen werden. Jedenfalls fand die Bestimmung der Stoßquerschnitte von Proteinanionen in einer mit Luft gefüllten Driftzelle statt. Da Literaturwerte der Cytochrom C-Anionen (in Helium) verfügbar sind [151], wurden diese Beträge gegen ihre korrespondierenden experimentell bestimmten Luftquerschnitte aufgetragen und eine Ausgleichsgerade extrapoliert (siehe Abbildung 84). Daten, die weit außerhalb der Geraden liegen (grün in Abbildung 84), wurden nicht berücksichtigt. Aller Wahrscheinlichkeit nach konnten in beiden Experimenten unterschiedliche Konformationen beobachtet werden, beispielsweise infolge abweichender Injektionsbedingungen.



**Abbildung 84:** Ausgleichsgerade zur Umrechnung der Stoßquerschnitte von Luftquerschnitten in Heliumquerschnitte

Wie anhand anderer Experimenten schon hinreichend belegt wurde, verläuft die Korrelation der beiden Stoßquerschnitte in guter Näherung linear [152]. Eine problematische Größe beim Übergang von Helium zu Puffergasen mit größeren Atomradien stellt die Polarisierbarkeit des Puffergases dar. Von der Ladung des Analyten induzierte Dipolmomente auf dem Puffergas bewirken neben der van der Waals Wechselwirkung ein  $r^{-4}$ -abhängiges attraktives Potential. Diese attraktive Wechselwirkung hat zur Folge, dass ein Ion eines höheren Ladungszustands im Vergleich zu einem geringer geladenen Ion gleicher Struktur einen größeren Stoßquerschnitt besitzt. Formell kann dies mit einer Zunahme des Stoßradius begründet werden. Sollten diese Effekte in nennenswertem Maße in Erscheinung treten, müsste die Auftragung in Abbildung 84 folglich nicht linear verlaufen. Da gerade die großen Ladungszustände größere Stoßquerschnitte besitzen, sollte bei der hier gewählten Auftragung die Steigung der Kurve abnehmen (da die Luftquerschnitte in stärkerem Maße anwachsen als die Heliumquerschnitte). Dennoch konnte anhand unterschiedlicher Ladungszustände der denaturierten Proteinkationen von Ubiquitin (76 Aminosäuren), Cytochrom C (124 Aminosäuren) und Myoglobin (153 Aminosäuren) belegt werden, dass die Korrelation der Stoßquerschnitte in Stickstoff und Helium über einen großen Bereich linear verläuft und der Fehler weniger als 3 % beträgt [152]. Demzufolge kann diese Ausgleichsgerade relativ exakt für größere oder kleinere biologische Systeme angewandt werden. In welchem Ausmaß sich der Fehler beläuft, ist nicht bekannt. Die Standardabweichung der gemessenen Stoßquerschnitte beträgt 1-2 %. Aufgrund attraktiver Wechselwirkungen zwischen dem Puffergas Luft und den Analyten kann der reale Fehler daher stärker ausfallen. Wird jedoch berücksichtigt, dass diese Ausgleichsgerade nur bei Proteinen zum Einsatz kommt, deren Stoßquerschnitt während dem Übergang von nativer zu linearer Konformation schätzungsweise verdreifacht wird, könnte auch bei einem Fehler von gar 10 % immer noch sicher zwischen nativer und entfalteter Konformation oder deren Zwischenstufen unterschieden werden.

### 8.3 Anhang C

Ankunftszeiten und PES des  $\alpha$ -Lactalbumins bei Detachmentwellenlängen von 266 (schwarz) und 213 nm (blau):

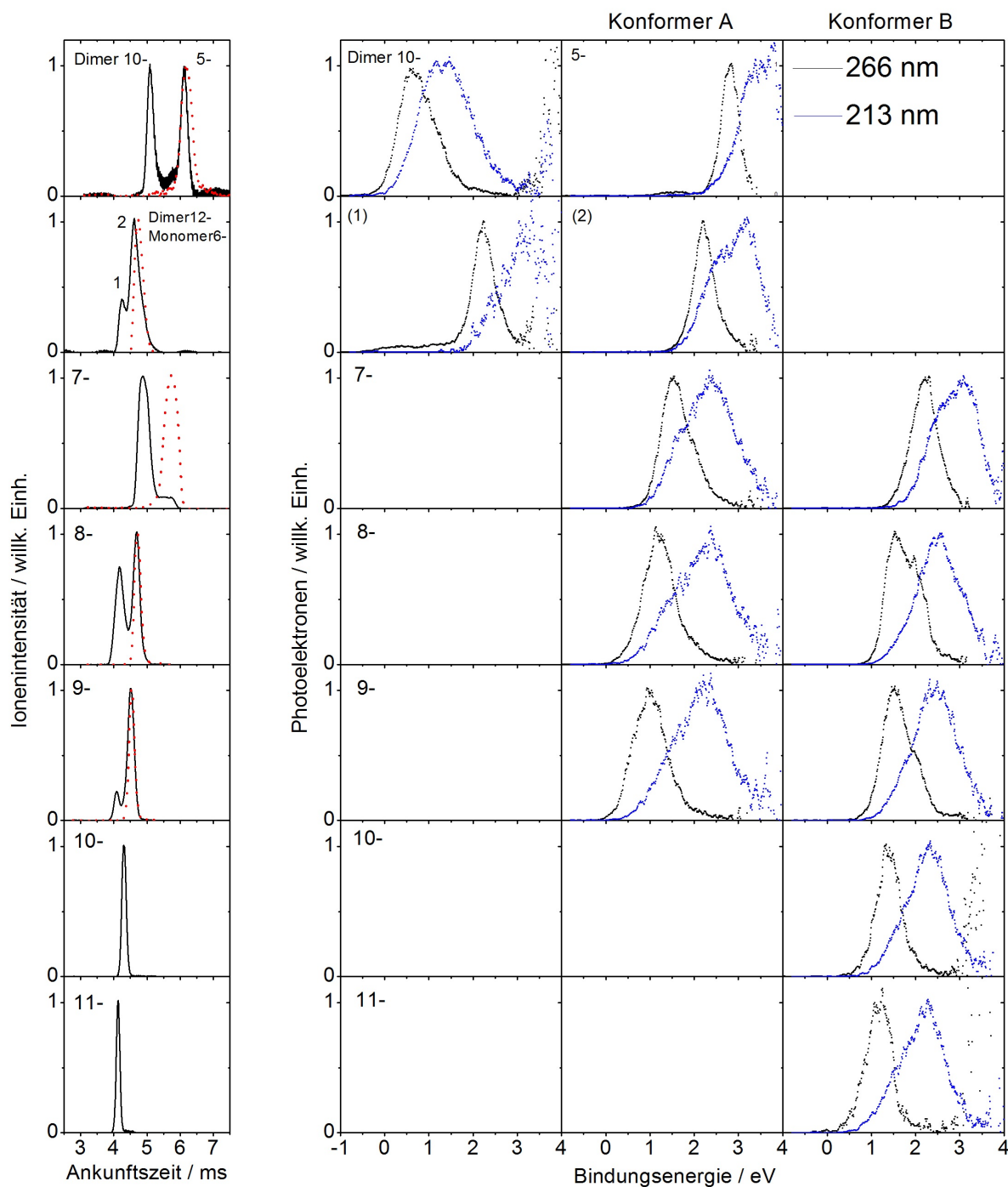


Abbildung 85: Ankunftszeiten (links) und PES (266 und 213 nm, rechts)

Die niederenergetische Bande des nativen Hexaanions (1) konnte bei Verwendung einer Detachmentwellenlänge von 213 nm nicht beobachtet werden. Dieser Sachverhalt liegt wahrscheinlich in einem zu geringen Photodetachmentsignal begründet (Die Leistung der 5. Harmonischen (213 nm) beispielsweise beträgt in etwa lediglich 10 - 20 % der 4.

Harmonischen (266 nm)). Hätte eine Bestimmung der adiabatischen Detachmentenergien bei 213 nm in gleicher Weise stattgefunden, wie in Abschnitt 6.3.2 vorgenommen wurde, lägen die Werte durchschnittlich etwa 0,2 eV oberhalb dieser Werte (266 nm). Die allgemeinen Tendenzen wie beispielsweise ein schwächerer Abfall der ADE des strukturell offeneren Konformerentyps B blieben allerdings bestehen. Bei Molekülen eines solchen Ausmaßes lässt sich eine kontinuierliche elektronische Zustandsdichte postulieren, die mit zunehmender Bindungsenergie stark anwächst. Wird eine Detachmentwellenlänge verwendet, die eine Erfassung eines größeren Bereichs der elektronischen Zustandsdichte ermöglicht, erscheinen die am schwächsten gebundenen Elektronen mit geringerer relativer Intensität (siehe beispielsweise  $\alpha$ -Lactalbumin 11- in Abbildung 85). Findet die Bestimmung der ADE dann mittels Extrapolation einer Geraden statt, können die am schwächsten gebundenen Elektronen nicht mit einbezogen werden. Daher sollte zur Bestimmung der Bindungsenergie grundsätzlich eine Wellenlänge genutzt werden, die nur ein Nachweis von Photoelektronen mit kinetischen Energien knapp oberhalb der RCB-Schwelle zulässt, weshalb in Kapitel 6.3.2 die adiabatischen Detachmentenergien aus den 266 nm-Spektren bestimmt wurden.

#### 8.4 Anhang D

Sequenz des Hühnerlysozyms, Aminosäuren mit sauren Seitenketten sind rot unterlegt:

KVFGRC**E**LAAAMKRHGL**D**NYRGYSLGNWVCAAK**F**ESNFNTQATNRNT**D**GST**D**YGI  
LQINSRWWCN**D**GRTPGSRNLCNIPCSALLSS**D**ITASVNC**A**KKIV**S**DGNGMNAWVAW  
RNRCKGT**D**VQAWIRG**C**RL-**COOH**

Sequenz des Pferdemyoglobins, Aminosäuren mit sauren Seitenketten sind rot unterlegt:

GL**S**DGEWQQVLNVWGKV**E**ADIAGHGQ**E**VLIRLFTGHP**E**TLEK**F**DKFKHLK**T**E**A**EMK  
A**S**EDLKKHGTVVLTALGGILKKKG**H**E**A**ELKPLAQSHATKHKIPIK**Y**L**E**FIS**D**AIHVL  
HSKHPG**D**FG**A**DAQGAMTKAL**E**LF**R**NDIAAK**Y**K**E**LG**F**Q**G**-**COOH**

Sequenzen der beiden Peptidketten des Schweineinsulins, Aminosäuren mit sauren Seitenketten sind rot unterlegt:

Kette 1: G**I**VE**Q**CCT**S**IC**S**LY**Q**LE**N**YCN-**COOH**

Kette 2: FVN**Q**HLCG**S**HL**V**E**A**LYLVCG**E**RG**F**FF**Y**TPKA-**COOH**



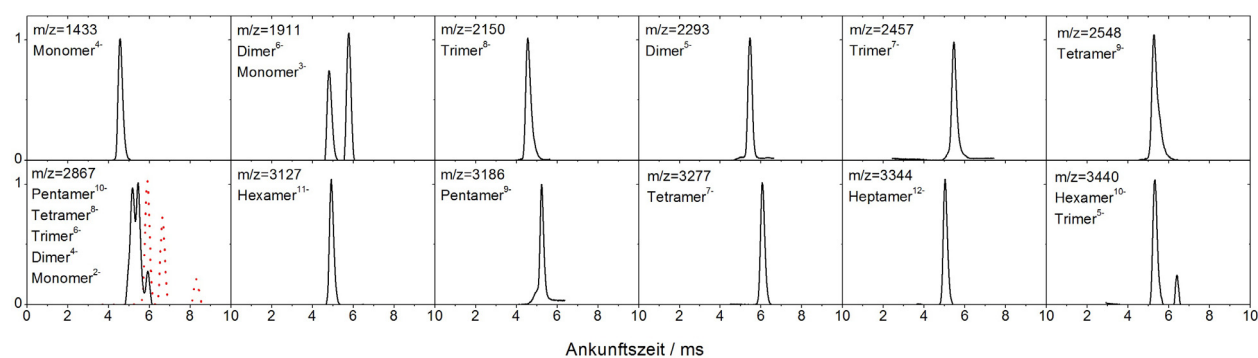
## 8.5 Anhang E

Ladung	Stoßquerschnitt / Å <sup>2</sup>	Ganghöhe / Å	Durchmesser / Å	Gesamthöhe / Å	Länge / Å
10-	2528	4,2	5,1	179,8	705,5
11-	2687	4,5	5,1	192,1	705,5
12-	2814	4,8	5,1	202,0	705,5
13-	2912	4,9	5,0	209,8	705,5
14-	3053	5,2	5,0	221,1	705,5
15-	3135	5,4	5,0	227,8	705,5
16-	3233	5,6	5,0	236,0	705,5
17-	3348	5,8	5,0	245,6	705,5
18-	3453	6,0	4,9	254,7	705,5
19-	3540	6,2	4,9	262,3	705,5
20-	3671	6,4	4,9	274,1	705,5
21-	3810	6,7	4,8	286,8	705,5

**Tabelle 12:** Berechnete Ganghöhen, Durchmesser sowie Gesamthöhen der Helices jeden Ladungszustands des Myoglobins

## 8.6 Anhang F

Ankunftszeiten der Insulinanionen



**Abbildung 86:** Ankunftzeiten der Insulinanionen bei verschiedenen m/z

## Publikationsliste

- 1) M. Vonderach, O. T. Ehrler, P. Weis und M. M. Kappes, „Combining ion mobility spectrometry, mass spectrometry and photoelectron spectroscopy in a high transmission instrument”, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1108
- 2) O. Hampe, T. Karpuschkin, M. Vonderach, P. Weis, Y. Yu, L. Gan, W. Klopper und M. M. Kappes, „Heating a bowl of single-molecule-soup: structure and desorption energetics of water-encapsulated open-cage [60] fullerene anions in the gas phase”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 9818
- 3) M. Vonderach, O. T. Ehrler, K. Matheis, T. Karpuschkin, E. Papalazarou, C. Brunet, R. Antoine, P. Weis, O. Hampe, M. M. Kappes und P. Dugourd, „Probing electrostatic interactions and structural changes in highly charged protein polyanions by conformer-selective photoelectron spectroscopy“, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 15554
- 4) M. Vonderach, O. T. Ehrler, K. Matheis, P. Weis und M. M. Kappes, „Isomer-selected photoelectron spectroscopy of isolated DNA oligonucleotides: phosphate and nucleobase deprotonation at high negative charge states”, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 7830
- 5) O. Hampe, S. Klyatskaya, T. Karpuschkin, M. Vonderach, P. Weis, M. Ruben und M. M. Kappes, „Mass spectrometric characterization of a dinuclear terbium phthalocyaninato complex”, *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, in press

## Lebenslauf

Vor- und Zunahme	Matthias Vonderach
Geburtstag	10.06.1983
Geburtsort	Waldshut
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Sep. 2008 - Jul. 2012	Promotion und wissenschaftlicher Angestellter am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. M. M. Kappes
Okt. 2003 - Aug. 2008	Chemie-Studium an der Universität Karlsruhe Abschluss: Diplom Diplomarbeit: <i>Ionenmobilitätsmessungen an Clusterionen</i> unter der Leitung von Prof. Dr. M. M. Kappes
Sep. 2002 - Jun. 2003	Zivildienst bei der Caritas Werkstätte Gurtweil
1999 - 2002	Wirtschaftsgymnasium Waldshut Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1993 - 1999	Realschule Tiengen
1989 - 1993	Grundschule Griefen

## Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Leute beigetragen. Mein Dank geht an:

- Herrn Prof. Dr. M. M. Kappes für die interessante Aufgabestellung, hilfreiche Unterstützung und die vielen produktiven Diskussionen
- PD Dr. Patrick Weis für die experimentelle und theoretische Einführung sowie die stetige Hilfestellung bei apparativen Schwierigkeiten
- Dr. Oli. T. Ehrler für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Hilfe insbesondere im Bereich der Photoelektronenspektroskopie
- PD Dr. Oliver Hampe für die Unterstützung und die erfolgreiche Zusammenarbeit im Bereich der Proteine
- Mark - Oliver Winghart der an einigen Experimenten im Rahmen seines Vertiefungspraktikums beteiligt war
- Alle aktuellen und ehemaligen Bürokollegen für die angenehme Atmosphäre
- Prof. Philippe Dugourd, Rodolphe Antoine, Luke Macaltese, Fabien Chirot, Claire Brunet for the successful collaboration
- Prof. Ron Namaan, Tal Markus and Nir Eliyahu for the very nice visit in Israel
- Danke an Herrn Klaus Stree, Holger Halberstadt, Regina Fischer, Sebastian Kleinhans und Frank Imhoff sowie die Mitarbeiter der Werkstatt für die schnelle Lösung technischer, elektronischer und sonstiger Schwierigkeiten sowie die reibungslose Ausführung technischer Arbeiten
- Frau Wagner für die Erledigung vieler organisatorischer Dinge

Und nicht zuletzt alle anderen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die nette Atmosphäre und reichlich Unterstützung

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] J. B. Fenn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3871
- [2] F. Hillenkamp, M. Karas, *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 71
- [3] K. Biemann, I. A. Papayannopoulos, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 370
- [4] D. F. Hunt, J. R. Yates, J. Shabanowitz, S. Winston, C. R. Hauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 6233
- [5] J. M. Wells, S. A. McLuckey, *Biol. Mass Spectrom.* **2005**, *5*, 148
- [6] J. Ni, S. C. Pomerantz, J. Rozenski, Y. Zhang, J. A. McCloskey, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1989
- [7] Z. Guan, N. A. Yates, R. Bakhtiar, *J. Am. Soc. Mas. Spectrom.* **2003**, *14*, 605
- [8] D. E. Clemmer, Robert R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10141
- [9] C. S. Hoaglund, S. J. Valentine, C. R. Sporleder, J. P. Reilly, D. E. Clemmer, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2236
- [10] P. D. Schnier, D. S. Gross, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6747
- [11] F. Misaizu, N. Hori, H. Tanaka, K. Komatsu, A. Furuya, K. Ohno, *Eur. Phys. J. D* **2009**, *52*, 59
- [12] K. Tang, A. A. Shvartsburg, H. Lee, D. C. Prior, M. A. Buschbach, F. Li, A. V. Tolmachev, G. A. Anderson, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3330
- [13] M. Vonderach, *Diplomarbeit* **2008**, Universität Karlsruhe
- [14] J. M. Weber, I. N. Ioffe, K. M. Berndt, D. Löffler, J. Friedrich, O. T. Ehrler, A. S. Danell, J. H. Parks, M. M. Kappes, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8585
- [15] X. Yang, X. B. Wang, E. R. Vorpagel, L. S. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 17588
- [16] J. Gidden, M. T. Bowers, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12829
- [17] C. M. Chen, J. R. Wiley, E. S. Chen, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2008**, *27*, 506
- [18] J. D. D. Martin, J. W. Hepburn, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 8139
- [19] R. C. Lumt, J. J. Grabowski, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8619
- [20] T. Z. Markus, S. S. Daube, R. Naaman, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13897
- [21] R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 2154
- [22] B. S. Kinnear, D. T. Kaleta, M. Kohtani, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9243
- [23] R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3494
- [24] B. S. Kinnear, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7907

- [25] B. S. Kinnear, M. R. Hartings, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5660
- [26] K. Matheis, L. Joly, R. Antoine, F. Lepine, C. Bordas, O. T. Ehrler, A. R. Allouche, M. M. Kappes, P. Dugourd, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15903
- [27] E. A. Mason, E. W. McDaniel, *Transport Properties of Ions in Gases*, John Wiley and Sons, New York, **1988**
- [28] H. E. Revercomb, E. A. Mason, *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 970
- [29] T. Wyttenbach, G. von Helden, J. J. Batka, D. Carlat, M. T. Bowers, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 275
- [30] A. Shvartsburg, M. F. Jarrold, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *261*, 86
- [31] A. Einstein, *Ann. Phys.* **1905**, *14*, 164
- [32] X. B. Wang, C. F. Ding, L. S. Wang, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 3351
- [33] L. S. Wang, C. F. Ding, X. B. Wang, J. B. Nicholas, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 2667
- [34] X. B. Wang, C. F. Ding, L. S. Wang, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *307*, 391
- [35] X. B. Wang, L. S. Wang, *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 4497
- [36] X. B. Wang, L. S. Wang, *Nature* **1999**, *400*, 245
- [37] D. A. Case, D. A. Pearlman, J. W. Caldwell, T. E. Cheatham, J. Wang, W. S. Ross, C. L. Simmerling, T. A. Darden, K. M. Merz, R. V. Stanton, A. L. Cheng, J. J. Vincent, M. Crowley, V. Tsui, H. Gohlke, R. J. Radmer, Y. Duan, J. Pitner, I. Massova, G. L. Seibel, U. C. Singh, P. K. Weiner, P. A. Kollman, *AMBER 7* **2002**, University of California, San Francisco
- [38] L. Verlet, *Phys. Rev.* **1967**, *159*, 98
- [39] J. Reinhold, *Quantentheorie der Moleküle*, 2. Aufl., Teubner, 2004
- [40] T. Koopmanns, *Physica* **1934**, *1*, 104
- [41] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902
- [42] J. J. P. Stewart, *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1173
- [43] M. Vonderach, O. T. Ehrler, P. Weis, M. M. Kappes, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1108
- [44] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64
- [45] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240
- [46] B. E. Winger, K. J. L. Wahl, R. R. O. Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 536
- [47] B. A. Thomson, J. V. Iribarne, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4451

- [48] S. A. Shaffer, K. Tang, G. A. Anderson, D. C. Prior, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1813
- [49] E. C. Lynn, M. Chung, C. Han, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 2129
- [50] T. Kim, K. Tang, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4162
- [51] K. Tang, A. V. Tolmachev, E. Nikolaev, R. Zhang, M. E. Belov, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5431
- [52] H. D. Zeman, *Rev. Sci. Instrum.* **1977**, *48*, 1079
- [53] P. H. Dawson, *Quadrupole Mass Spectrometry and its Applications*, American Institute of Physics, Woodbury, **1995**
- [54] J. H. Gross, *Mass Spectrometry*, 1. Aufl., Springer, Berlin, **2004**
- [55] P. Kruit, F. H. Read, *J. Phys. E* **1983**, *16*, 313
- [56] O. Cheshnovsky, S. H. Yang, C. L. Pettiette, M. J. Craycraft, R. E. Smalley, *Rev. Sci. Instrum.* **1987**, *56*, 2131
- [57] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 430
- [58] D. Balbeur, J. Widart, B. Leyh, L. Cravello, E. De Pauw, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 938
- [59] D. Clemmer, M. F. Jarrold, *J. Mass. Spectrom.* **1997**, *32*, 577
- [60] X. B. Wang, L. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2339
- [61] J. Gidden, M. T. Bowers, *Eur. Phys. J. D* **2002**, *20*, 409
- [62] J. Gidden, J. E. Bushnell, M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5610
- [63] X. B. Wang, K. Ferris, L. S. Wang, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 25
- [64] L. M. Branscomb, *Phys. Rev.* **1966**, *148*, 11
- [65] W. D. Smith, T. T. Chen, J. Simons, *Chem. Phys. Let.* **1974**, *27*, 499
- [66] K. Matheis, *Dissertation* **2010**, Universität Karlsruhe
- [67] J. M. L. Pecourt, J. Peon, B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10370
- [68] J. M. L. Pecourt, J. Peon, B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9348
- [69] F. Lepine, C. Bordas, *Phys. Rev. A* **2004**, *69*, 53201
- [70] E. E. B. Campbell, R. D. Levine, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *51*, 65
- [71] J. U. Andersen, E. Bonderup, K. Hansen, *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 6518
- [72] J. U. Andersen, E. Bonderup, K. Hansen, *J. Phys. B: At., Mol. Opt. Phys.* **2002**, *35*, R1
- [73] O. T. Ehrler J.P. Yang, A. B. Sugiharto, A. N. Unterreiner, M. M. Kappes, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 184301

- [74] J. B. Wills, F. Pagliarulo, B. Baguenard, F. Lepine, C. Bordas, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *390*, 145
- [75] V. Gabelica, F. Rosu, T. Tabarin, C. Kinet, R. Antoine, M. Broyer, E. De Pauw, P. Dugourd, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4706
- [76] Y. H. Jang, W. A. Goddard, K. T. Noyes, L. C. Sowers, S. Hwang, D. S. Chung, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 344
- [77] N. S. Kim, P. R. LeBreton, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3694
- [78] X. B. Wang, E. R. Vorpagel, X. Yang, L. S. Wang, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 10468
- [79] J. Lin, C. Yu, S. Peng, I. Akiyama, K. Li, L. K. Lee, P. R. LeBreton, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4627
- [80] X. Li, K. H. Bowen, M. Haranczyk, R. A. Bachorz, K. Mazurkiewicz, J. Rak, M. Gutowski, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 174309
- [81] M. Haranczyk, M. Gutowski, X. Li, K. H. Bowen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 4804
- [82] M. Haranczyk, M. Gutowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6585
- [83] B. F. Parsons, S. M. Sheehan, T. A. Yen, D. M. Neumark, N. Wehres, R. Weinkauff, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 3291
- [84] W. E. Wright, V. M. Tesmer, K. E. Huffman, S. D. Levene, J. W. Shay, *Genes Dev.* **1997**, *11*, 2801
- [85] G. B. Morin, *Exp. Gerontol.* **1997**, *32*, 375
- [86] L. Petraccone, E. Erra, V. Esposito, A. Randazzo, A. Galeone, G. Barone C. Giancola, *Biopolymers* **2005**, *77*, 75
- [87] J. T. Davis, G. Spada, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 296
- [88] B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 631
- [89] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7063
- [90] I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6406
- [91] E. S. Baker, S. L. Bernstein, V. Gabelica, E. De Pauw, M. T. Bowers, *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *253*, 225
- [92] M. P. H. Lee, G. N. Parkinson, P. Hazel, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10106
- [93] A. Calzolari, R. D. Felice, E. Molina, *Sol. State. Com* **2004**, *131*, 557
- [94] G. W. Collie, G. N. Parkinson, S. Neidle, F. Rosu, E. De Pauw, V. Gabelica, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9328
- [95] Y. Wang, D. J. Patel, *Curr. Biol.* **1994**, *2*, 1141



- [96] H. J. Wagenknecht, *ChiuZ* **2002**, *5*, 318
- [97] J. Gidden, A. Ferzoco, E. S. Baker, M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15132
- [98] E. S. Baker, M. T. Bowers, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1188
- [99] J. Gidden, E. S. Baker, A. Ferzoco, M. T. Bowers, *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *240*, 183
- [100] A. W. Colson, B. Besler, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 9787
- [101] X. Song, *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 9358
- [102] G. N. Patargias, S. A. Harris, J. H. Harding, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 235103
- [103] T. Simonson, C. L. Brooks, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8452
- [104] W. C. Guest, N. R. Cashman, S. S. Plotkin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 6286
- [105] J. W. Pitera, M. Falta, W. F. van Gunsteren, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2546
- [106] D. S. Gross, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 883
- [107] D. S. Gross, P. D. Schnier, S. E. R. Cruz, C. K. Fagerquist, E. R. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 3143
- [108] C. Jinfeng, R. D. Topsom, *J. Mol. Struct.* **1988**, *168*, 141
- [109] A. J. Gianola, T. Ichino, R. L. Hoenigman, S. Kato, V. M. Bierbaum, W. C. Lineberger, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 11504
- [110] R. F. Guniona, M. K. Gilles, M. L. Polak, W. C. Lineberger, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1992**, *117*, 601
- [111] M. M. Ner, J. F. Liebman, S. A. Kafafi, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5937
- [112] B. K. Janousek, K. J. Reed, J. I. Brauman, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3125
- [113] H. K. Woo, X. B. Wang, K. C. Lau, L. S. Wang, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 7801
- [114] L. N. Domelsmith, L. L. Munchausen, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4311
- [115] L. Klasinc, B. Kovac, H. Gusten, *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 289
- [116] Z. Tian, X. B. Wang, L. S. Wang, S. R. Kass, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1174
- [117] L. Joly, R. Antoine, A. R. Allouche, M. Broyer, J. Lemoine, P. Dugourd, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8428
- [118] R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, G. Breaux, F. C. Hagemeister, D. Phippen, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8996
- [119] R. Marchese, R. Grandori, P. Carloni, S. Raugei, *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *5*, e1000775
- [120] A. R. McKay, M. E. Sanz, C. R. S. Mooney, R. S. Minns, E. M. Gill, H. H. Fielding, *Rev. Sci. Instrum.* **2010**, *81*, 123101
- [121] R. Gleiter, E. Heilbronner, V. Hornung, *Angew. Chem. internat. Edit.* **1970**, *9*, 901

- [122] F. O. Talbot, T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 074310
- [123] I. Compagnon, A. R. Allouche, F. Bertorelle, R. Antoine, P. Dugourd, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 3399
- [124] R. Antoine, P. Dugourd, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 16494
- [125] Y. Mao, Mark A. Ratner, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6503
- [126] K. B. Shelimov, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10313
- [127] Y. Mao, M. A. Ratner, M. F. Jarrold, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 10017
- [128] E. R. Badman, S. Myung, D. E. Clemmer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1493
- [129] N. Mirkin, J. Jaconcic, V. Stojanoff, A. Moreno, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2008**, *70*, 83
- [130] K. B. Shelimov, D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2240
- [131] N. Tanaka, T. Yamane, T. T. Ssukihara, T. Ashida, M. Kakudo, *J. Biochem.* **1975**, *77*, 147
- [132] S. J. Valentine, J. G. Anderson, A. D. Ellington, D. E. Clemmer, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3891
- [133] A. C. Pike, K. Brew, K. R. Acharya, *Structure* **1996**, *4*, 691
- [134] R. Diamond, *J. Mol. Biol.* **1974**, *82*, 371
- [135] D. M. Copeland, A. S. Soares, A. H. West, G. B. R. Addo, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1413
- [136] R. Jansen, W. Dzwolak, R. Winter, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1344
- [137] V. Sluzky, A. M. Klibanov, R. Langer, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 895
- [138] Q. Hua, M. A. Weiss, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21449
- [139] M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. R. Sawaya, J. S. Wall, D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 18990
- [140] J. Haas, E. V. Martinez, A. Bögehold, D. Matthes, U. Hensen, A. Pelah, B. Abel, H. Grubmüller, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1816
- [141] T. Wyttenbach, M. T. Bowers, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 511
- [142] S. L. Bernstein, Ni. F. Dupuis, N. D. Lazo, T. Wyttenbach, M. M. Condrón, G. Bitan, D. B. Teplow, J. E. Shea, B. T. Ruotolo, C. V. Robinson, M. T. Bowers, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 326
- [143] C. Bleiholder, N. F. Dupuis, T. Wyttenbach, M. T. Bowers, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 172

- [144] D. E. Clemmer, S. J. Valentine, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 257
- [145] W. Kadima, M. Roy, R. W. K. Lee, N. C. Kaarsholm, M. F. Dunn, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8963
- [146] J. Goldman, F. H. Carpenter, *Biochemistry* **1974**, *13*, 4566
- [147] E. Ciszak, G. D. Smith, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1512
- [148] R. Kemper, N. F. Dupuis, M. T. Bowers, *Int. J. Mass spectrum.* **2009**, *287*, 46
- [149] J. A. Loo, A. B. Giordani, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 186
- [150] A. A. Enyenihi, H. Yang, A. J. Ytterberg, Y. Lyutvinskiy, R. A. Zubarev, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 1763
- [151] D. E. Clemmer, Collision cross section database,  
[http://www.indiana.edu/Bclemmer/Research/cross%20section%20database/Proteins/protein\\_cs.htm](http://www.indiana.edu/Bclemmer/Research/cross%20section%20database/Proteins/protein_cs.htm)
- [152] M. F. Bush, Z. Hall, K. Giles, J. Hoyes, C. V. Robinson, B. T. Ruotolo, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9557