

# ECD and ETD

## Electron Capture Dissociation and Electron Transfer Dissociation “diretto” “indiretto”

Sorgenti ad impatto elettronico (EI)  
Molecole in fase gassosa se colpite da elettroni emessi da un filamento incandescente ed accelerati (**elettroni ad alta energia**) si ionizzano ma, solitamente, oltre che ad ionizzarsi si rompono. Durante questo processo, inseguito alla collisione elettrone/molecola, si generano elettroni a bassa energia.

(low energy)  $\bullet e^-$



$M^{(n+)}$

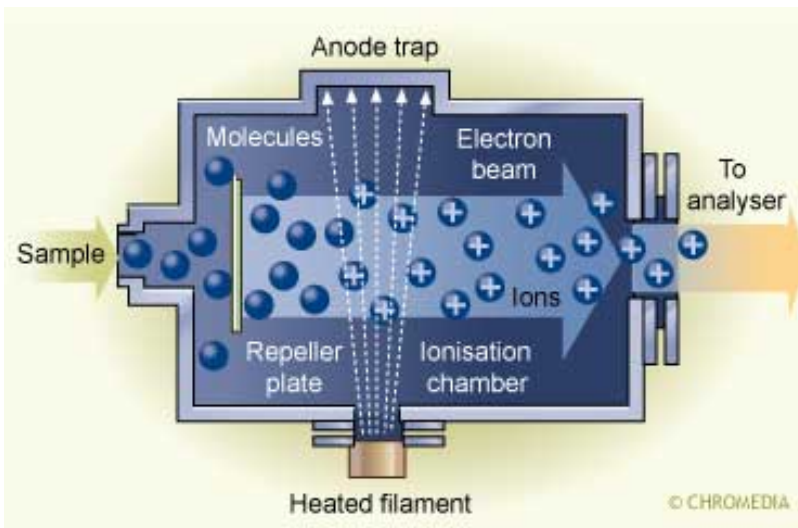


$M^{(n-1)+\bullet}$

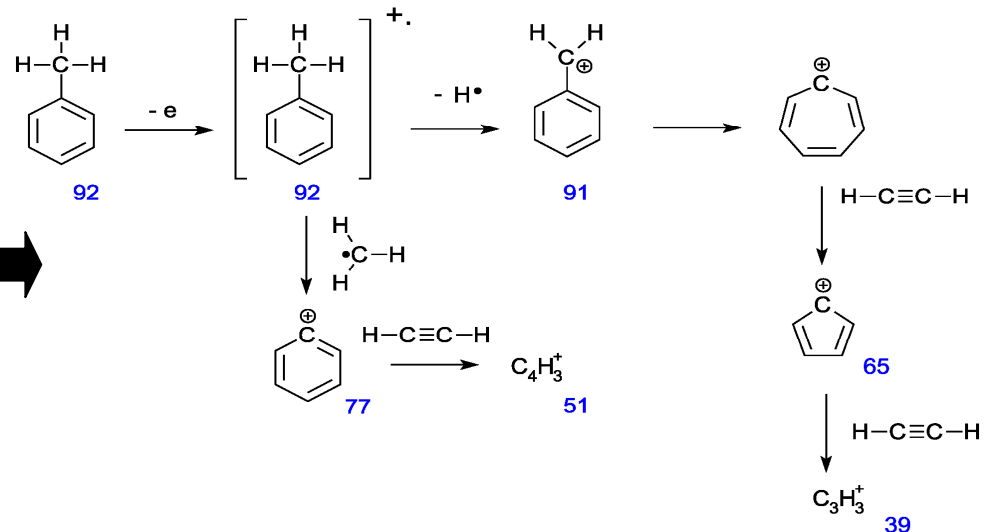


FRAGMENTATION

La frammentazione di tipo ETD sfrutta **elettroni a bassa energia** veicolati da anioni radicalici. Meccanismo diverso rispetto alle rotture provocate da elettroni ad alta energia nelle sorgenti EI.



Esempio di ionizzazione/frammentazione derivante da una sorgente EI



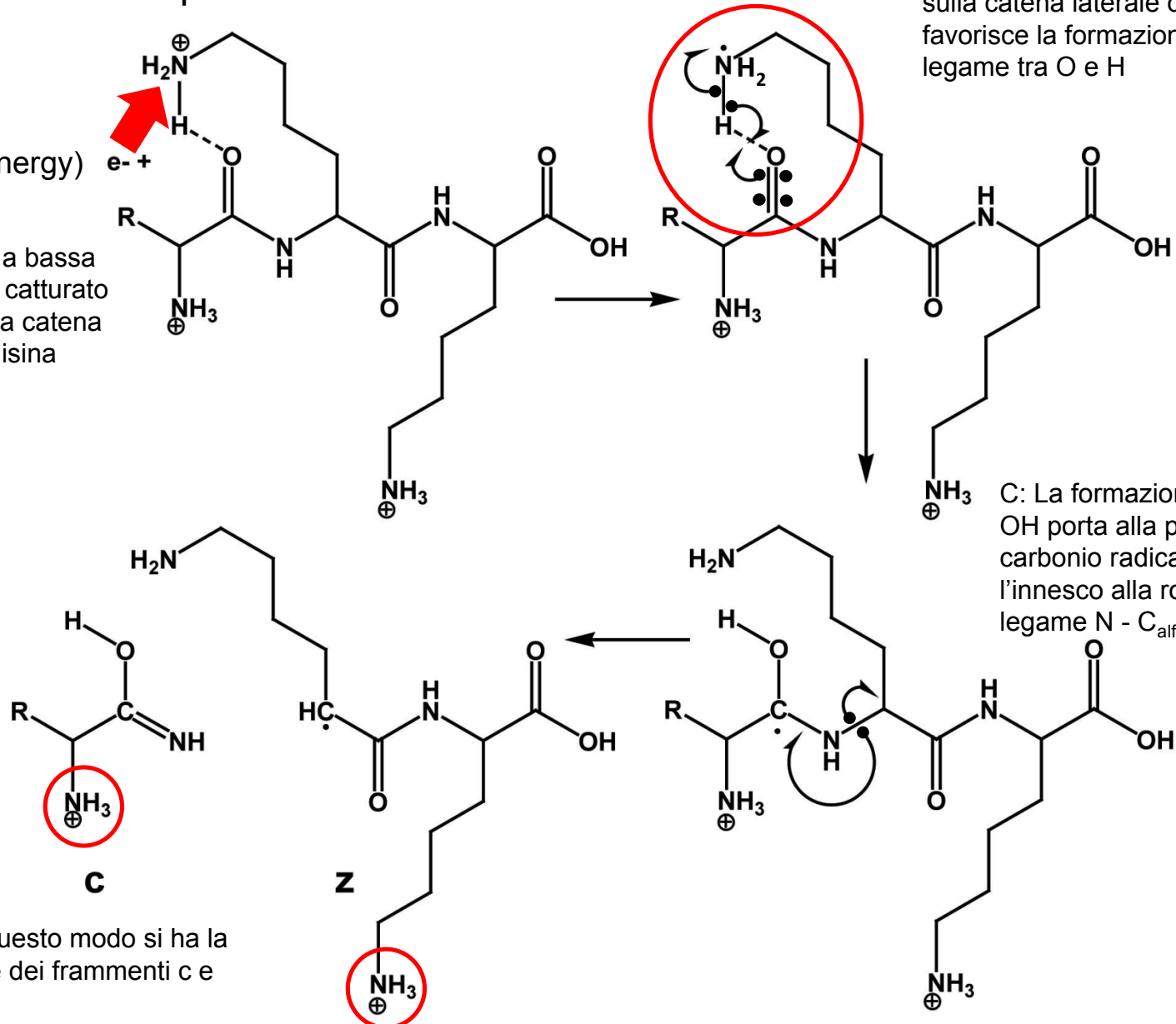
# ECD/ETD fragmentation process

Principalmente K

B: La presenza dell'elettrone sulla catena laterale della lisina favorisce la formazione di un legame tra O e H

(low energy)  $e^- +$

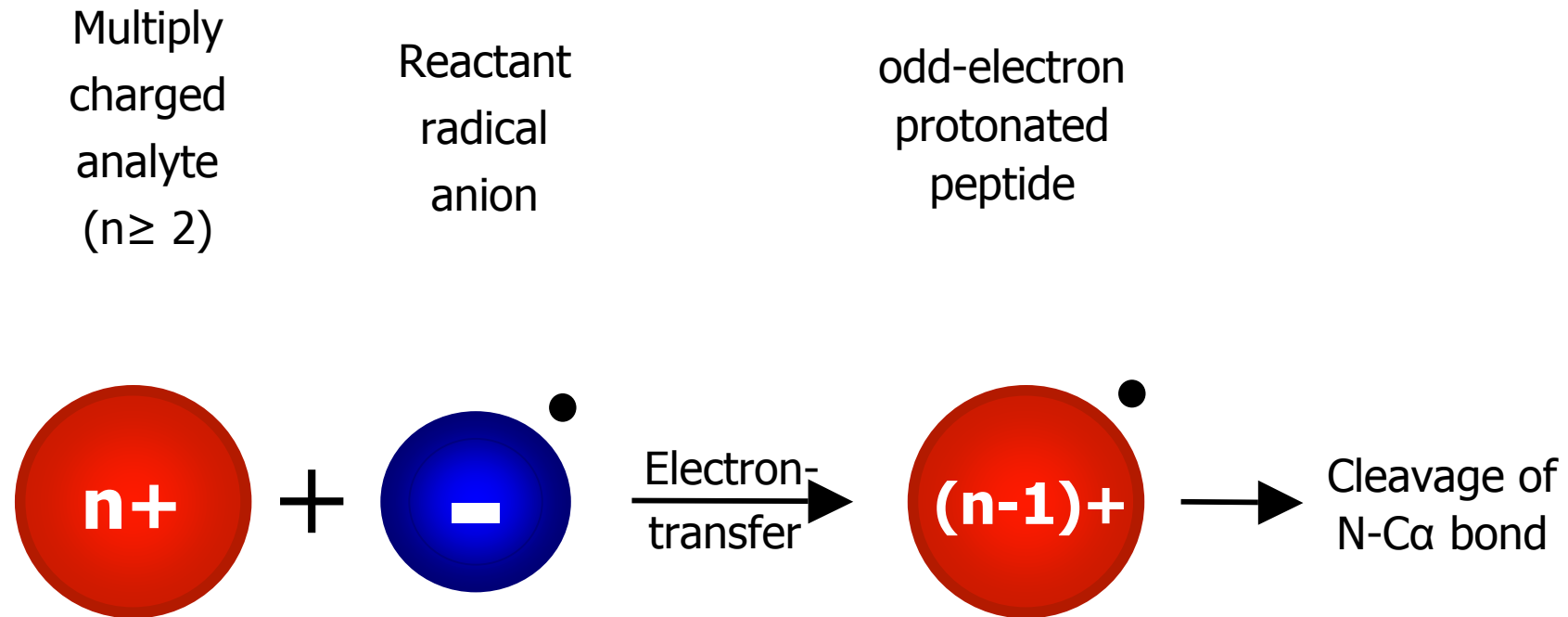
A: L'elettrone a bassa energia viene catturato dall'azoto della catena laterale della lisina



C: La formazione del gruppo OH porta alla presenza di un carbonio radicalico che da l'innescò alla rottura del legame N - C<sub>alfa</sub>

D: ...e in questo modo si ha la formazione dei frammenti c e z.

# ECD/ETD fragmentation process



Prerequisite: multiply charged precursor ions,  $n \geq 2$  !  
ETD is not applicable to 1+ or negatively charged ions

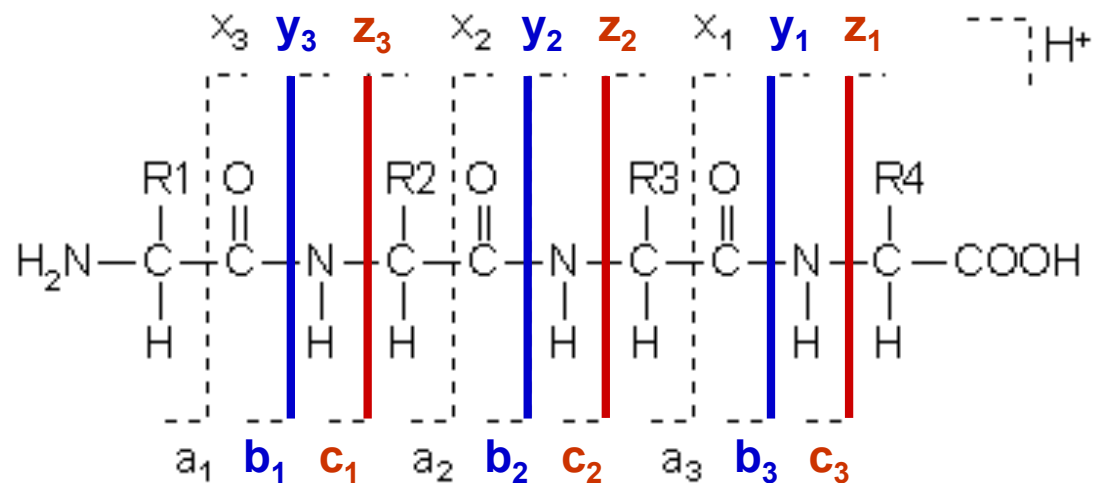
# ETD versus CID

## ETD

- electron transfer surpasses internal heating
- rapid bond cleavage (no energy dissipation)
- random fragmentation of peptide backbone
- **leaves labile bonds like from PTMs intact**
- N-C $\alpha$  bond cleavage yields **c- and z-ion**
- preferable charge state  **$z > 2$**

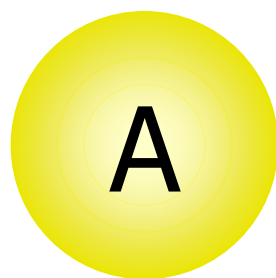
## CID

- via several collisions with Helium
- precursor ion is internally heated
- **preferences for weak bond cleavages (labile bonds like from PTMs)**
- nearby selected amino acids (E, D, P) backbone cleavage is preferred
- **b- and y-ions** (and internal fragments)
- best fragment spectra from **2+ ions**



# Electron Capture Dissociation - ETD

Electron Carrier



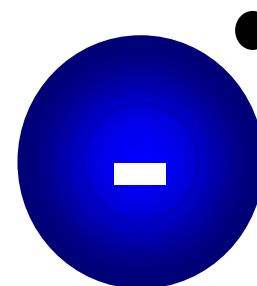
+

$e^-$



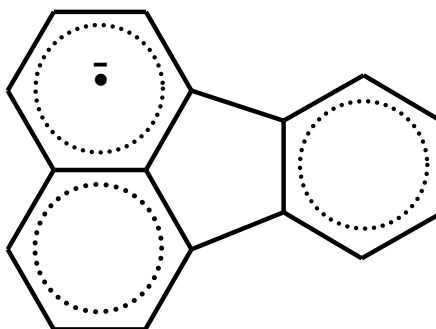
→

Reactant Anion



$m/z = 202$

(Idrocarburi aromatici)



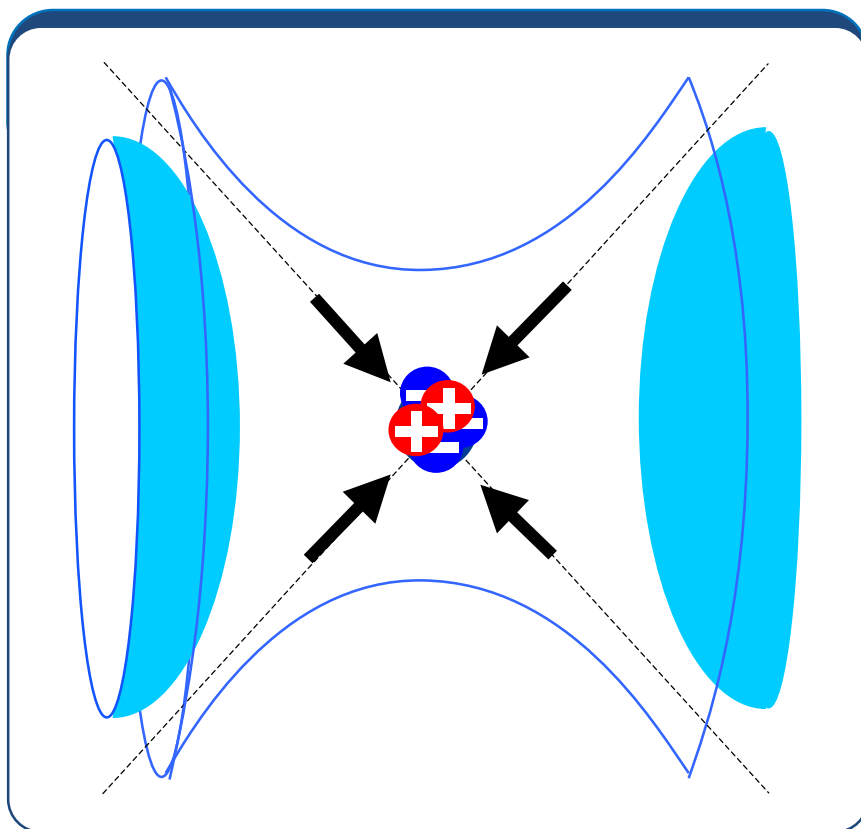
Flouranthene  
Radical Anion

$C_{16}H_{10}^{\bullet-}$



## ETD in Non-linear Paul Trap (conventional Ion Trap – IT)

Dual injection and storage of ions of both polarities **peptide cations** & **reactant anions**



Ions (both cations (analyte) and anions (reactant)) are stored inside the trap

Cations and anions are pushed towards the center of the trap

Direct ETD reaction as soon as anions enter the trap

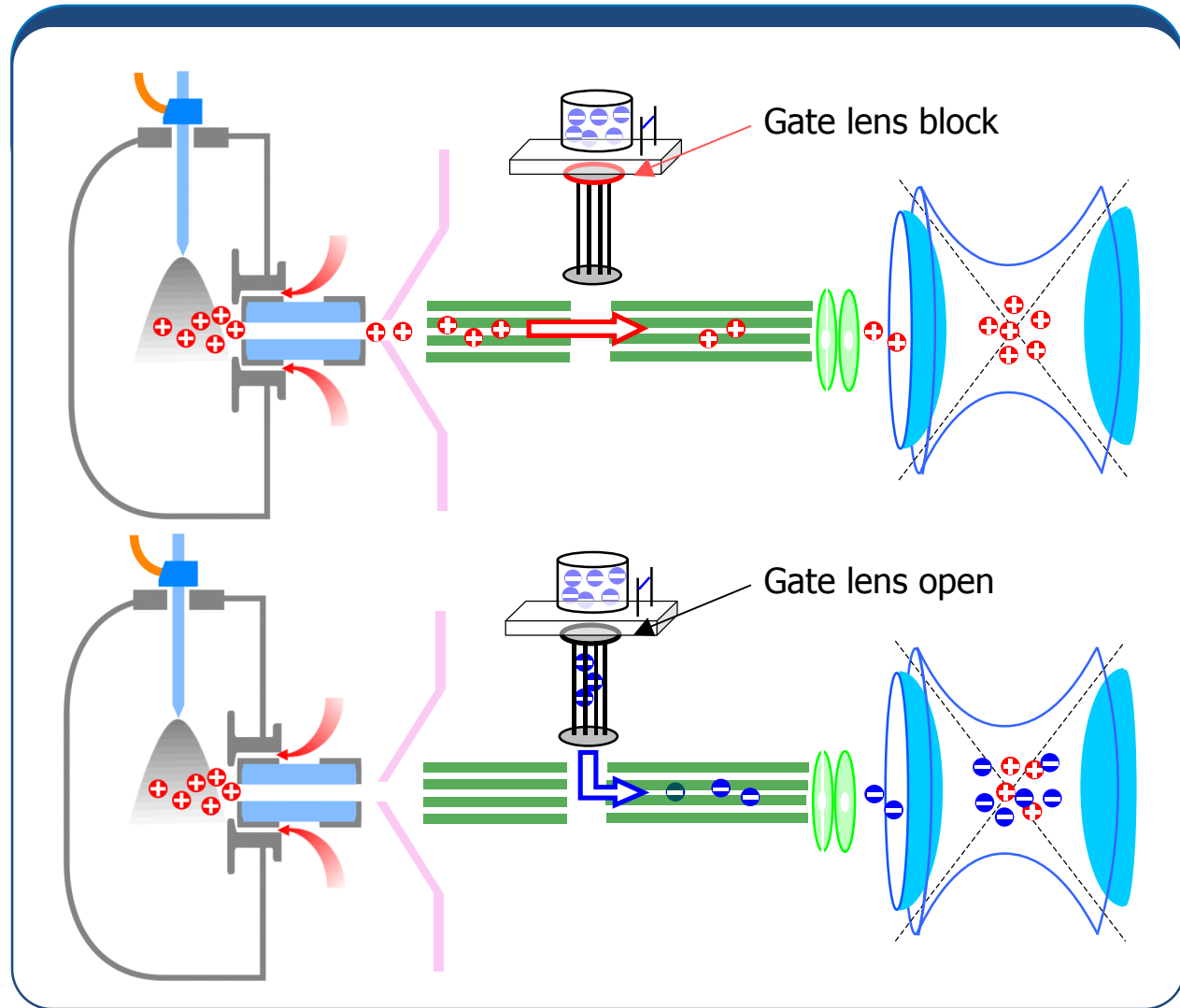
Better cross sections for ion-ion-reactions in 3D trap due to compression into the same globular volume



highly efficient ETD reaction

# ETD – ions path

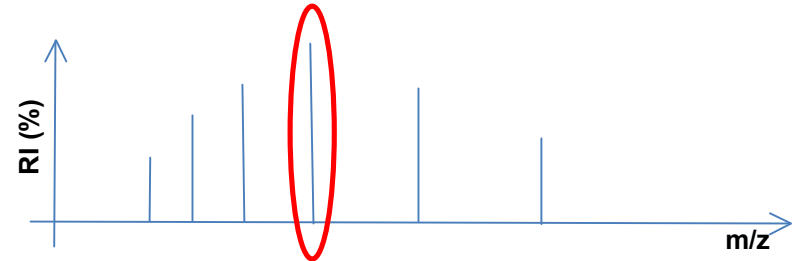
1. ESI ion accumulation (positive mode)
2. Precursor ion isolation
3. nCI ions accumulation
4. ETD fragmentation
5. scan



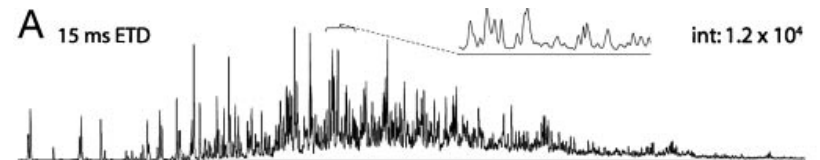


# ETD – protein sequencing (TOP down proteomics)

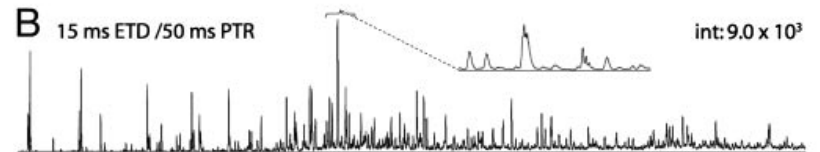
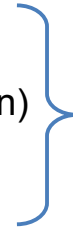
- Protein
- Multiple charge state precursor selection



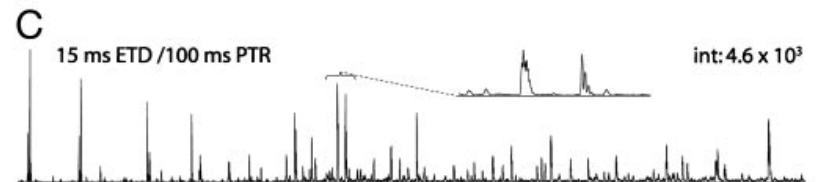
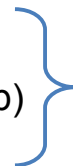
- Fragmentation by ETD => highly charged fragments difficult to interpret – low resolution => no charge state determination



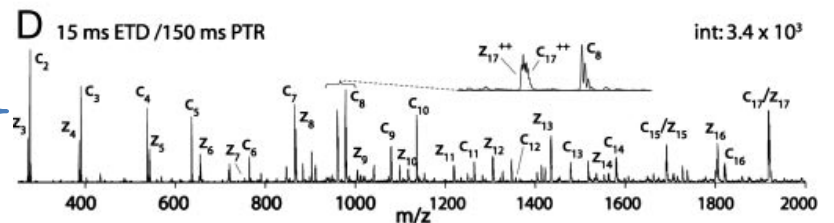
- Charge state reduction by PTR (proton transfer reaction)



- Singly charged fragment of N- C-terminal portion (m/z detectable depending on the m/z range of the ion trap)



- Sequence assignement



**E** MQIIFVKTTLTGKTIITLVEVSSDTIDNVKSKIQDKEGIPPD  
 QQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLMLRRLRGG

## ETD – protein sequencing

ARFTYILPRMKYTEDAATGRRTIYPKTTFREDSARTGVTRHYILPFKVCMQERDSA

A N

AR 2+

ARF 2+

ARFT 2+

ARFTY 2+

ARFTYI 2+

.....

9+ RFTYILPRMKYTEDAATGRRTIYPKTTFREDSARTGVTRHYILPFKVCMQERDSA

8+ FTYILPRMKYTEDAATGRRTIYPKTTFREDSARTGVTRHYILPFKVCMQERDSA

8+ TYILPRMKYTEDAATGRRTIYPKTTFREDSARTGVTRHYILPFKVCMQERDSA

8+ YILPRMKYTEDAATGRRTIYPKTTFREDSARTGVTRHYILPFKVCMQERDSA

8+ ILPRMKYTEDAATGRRTIYPKTTFREDSARTGVTRHYILPFKVCMQERDSA

.....

Dato l'elevato numero di cariche, tutti questi frammenti rientrano nello spettro di massa (range dello strumento), ma non sono interpretabili se io uso analizzatori come le trappole che sono a bassa risoluzione e che quindi non riescono a distinguere stati di carica maggiori di 3+ (0.33 distanza tra i picchi della distribuzione isotopica). Il fatto che tutti questi segnali rientrino nel mio spettro complica l'interpretazione dello spettro. Lo spettro può essere notevolmente migliorato se io abbasso, mediante reazioni di proton transfer nella trappola - aggiungendo una sorta di "base" -, la carica della molecola isolata. Questo fa sì che tutti quelli ioni con m/z sopra il range della massa non vengano ad essere presenti nello spettro e rimangono in questo modo in pratica solo quei segnali m/z relativi ai frammenti c e z più piccoli, ovvero relativi alle estremità. Per una trappola ionica, con range m/z pari a 3000 e ipotizzando un peso aa medio di 100 significa poter leggere approssimativamente 30 aa all'N-terminale e 30 aa al C terminale, ipotizzando di andare a leggere frammenti monocarichi. Se leggo frammenti bicarichi, posso arrivare a circa 60 aa. (60 x 100 = 6000 peso del peptide. Se è monocarico il suo m/z sarà approssimativamente 3000.