

Massenanalyse von Biomolekülen im pico-Liter Maßstab.



Makrotropfen vor Frankfurter Römer

Massenspektrometrie (MS) ist eine Standard-Analysemethode zur Bestimmung der **Masse** von Molekülen. Anhand von Bruchstücken können darüber hinaus wichtige **Strukturinformationen** gewonnen werden. Bis vor etwa 15 Jahren war die MS aber nicht in der Lage, größere Biomoleküle nachzuweisen, weshalb sie in der Biologie oder Biochemie nur eine geringe Rolle spielte. Dies änderte sich schlagartig mit der Einführung zweier neuer MS-Verfahren, die unter den Namen **Elektrospray Ionisation (ESI-MS)** bzw. **Matrix-Assistierte Laser Desorption / Ionisation (MALDI-MS)** bekannt sind. Ihre Bedeutung wird schon dadurch unterstrichen, dass im Jahre 2002 **zwei Nobelpreise für Chemie** in dieses Gebiet gingen: an **John Fenn** für die Entwicklung von ESI-MS und an **Koichi Tanaka** für die Einführung der Laserdesorptions-MS von großen Peptiden.

Bei ESI befindet sich das Biomolekül in einer Lösung, welche in ein hochgeladenes Spray überführt wird, aus dessen Tröpfchen am Ende einer längeren Transformationskette Ionen hochgeladen in die Gasphase gelangen und dort mit konventionellen Analysatoren untersucht werden können. Bei MALDI-MS, dem von Karas und Hillenkamp entwickelten, heute am häufigsten angewandten Laserdesorptionsverfahren, werden die Analytmoleküle in eine geeignete kristalline Matrix eingebaut und aus dieser durch UV-Laserdesorption in die Gasphase überführt. Beide Verfahren haben Stärken und Schwächen, die hier nicht erörtert werden können.

Eine besondere Aufgabe für die MS, die gerade in jüngster Zeit zunehmend in den Vordergrund tritt, ist der **Nachweis spezifischer, nichtkovalent gebundener Komplexe**. Diese sind in der Chemie der lebendigen Natur von größter Bedeutung, da hier viele Prozesse über molekulare Erkennung, d.h. über spezifische Komplexbildung ablaufen. Das Wirken von Enzymen, die Signalübertragung und die Umsetzung der Erbinformation sind Beispiele hierfür. Spezifische Komplexe in Lösung zeichnen sich dadurch aus, dass für ihre Entstehung die Moleküle in spezifischen Konformationen vorliegen, wodurch die Komplexpartner wie „Schlüssel und Schloss“ zusammenpassen. Diese Konformationen in Lösung sind in der Regel von mehreren Lösungsmiteileigenschaften wie pH-Wert, Salzkonzentration, Ionenstärke, Polarität etc. abhängig. Sie sind oft sehr verschieden von der des „nackten“ Moleküls in der Gasphase. Unspezifische Komplexe sind „irgendwie“, d.h. nicht spezifisch, gebunden. Will man die biochemischen Prozesse molekular verstehen oder gezielt beeinflussen ist der Nachweis von spezifischen, nichtkovalent gebundenen Komplexen eine wichtige Voraussetzung.

Viele Arzneimittel sind hochselektive Liganden, durch die bestimmte Einzelschritte in der Chemie der menschlichen Zelle bzw. von Bakterien und Viren beeinflusst oder sogar inhibiert werden. Im übertragenen Sinne wird dann das Schloss von einem „abgebrochenen Fremd-Schlüssel“ blockiert.

Massenspektrometrie setzt voraus, dass die Ionen sich in der Gasphase befinden. Deshalb ist eine der wichtigsten Forderungen an eine Komplex-MS, dass die nachgewiesenen Komplexe schon in Lösung vorliegen und nicht erst in der Gasphase durch nachfolgende Prozesse erzeugt werden.

Die bislang beste Methode um spezifische, nichtkovalente Komplexe nachzuweisen ist zweifellos ESI-MS, da bei MALDI oft unspezifische Komplexe nachgewiesen werden.

Vor einigen Jahren wurde von uns ein **alternatives** Verfahren entwickelt, mit dem Ionen durch **Laserdesorption direkt aus der Lösung** nachgewiesen werden. Die Desorption findet durch Einkopplung von gepulster Energie in die Flüssigkeit statt, üblicherweise durch Laseranregung von OH-Schwingungen. So treten die in einer wässrigen Lösung enthaltenen Ionen bei Laserintensitäten von einigen MW/cm² ins Vakuum aus. Der Prozess ist keine Verdampfung, sondern eine schnelle Laserablation, bei der die Flüssigkeit

explosionsartig aufgebrochen wird. Dabei findet eine Neutralisation der ursprünglich solvatisierten Ionen statt, die aber zum Glück nicht vollständig ist. Die übriggebliebenen Ionen (Lucky survivors) können ins Vakuum gelangen und dort nachgewiesen werden.

Flüssigkeit und Vakuum vertragen sich in der Regel überhaupt nicht: Im Vakuum verdampft eine Flüssigkeit eruptionsartig, wobei das Vakuum zusammenbricht. Wir verwendeten deshalb als Flüssigkeit einen **Mikroflüssigkeitsstrahl** ($\varphi \approx 10 \mu\text{m}$), der das Vakuum mit einer Geschwindigkeit von etwa 60 m/s durchquert und dann an einer Kühlfalle ausgefroren wird. Diese von **M. Faubel (MPI Göttingen)** entwickelte „liquid beam“-Technik hat den Vorteil großer Einfachheit, aber leider auch den Nachteil großer Materialverschwendung, da mit dem gepulsten Laser nur etwa der 10^{-5} te Teil analysiert wird. Für die Analyse von Biomolekülen ist der Probenverbrauch viel zu groß.

Versuche mit der von uns erstmals an einem Mikroflüssigkeitsstrahl eingesetzten LILBID-Laserdesorptionsmethode (Laser Induced Liquid **B**eam Ion **D**esorption) ergaben, dass damit der schonende Nachweis spezifischer, nichtkovalent gebundener Biokomplexe möglich ist.

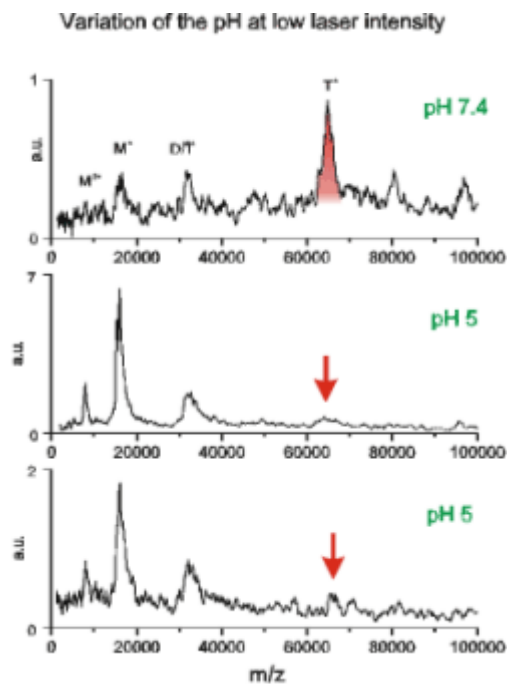


Abb. 1a) pH-Abhängigkeit

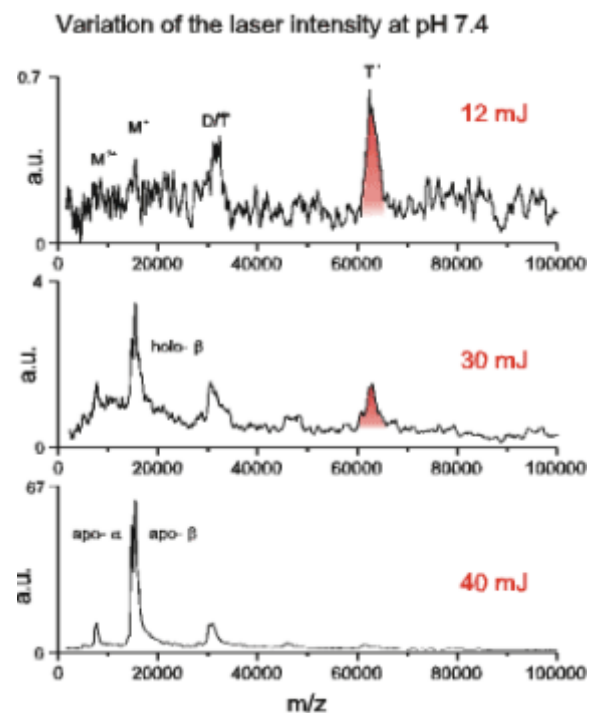


Abb. 1b) Spektrum bei unterschiedlichen Pulsenergien des Desorptionslasers

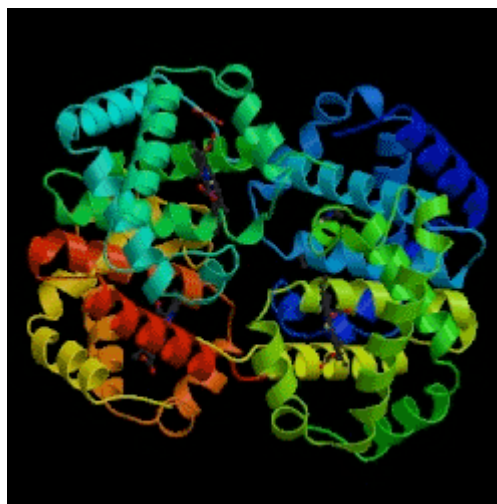


Abb. 2) Hämoglobin Röntgenbeugungsstruktur (PDB)

Abb. 1a) zeigt ein Massenspektrum von Hämoglobin ($m/z \approx 65\,000$) (Abb. 2.), welches sowohl im

Massenspektrum als auch in Lösung nur bei neutralem pH-Wert (7,4) vorkommt. Durch Erhöhung der Laserleistung (Abb. 1b) kann der Komplex überdies einfach in seine konstituierenden α und β Proteine zerlegt werden (Thermolyse).

Weitere Beispiele unter .

In der jüngst von uns entwickelten LILBID-Variante (**L**aserinduced **L**iquid **B**ead **I**on **D**esorption) werden gepulste **Mikrotröpfchen** ($\varphi \approx 50 \mu\text{m}$) eingesetzt. Dadurch reduziert sich der Probenverbrauch gegenüber dem Mikroflüssigkeitsstrahl um etwa 5 Größenordnungen.

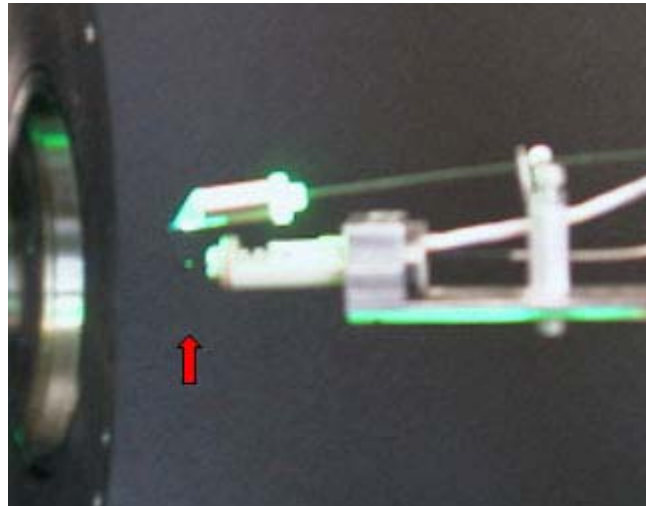


Abb. 3) Gepulster Piezo-Tröpfengenerator ($f=1\text{-}2000\text{Hz}$). Ein einzelnes Tröpfchen wird von einem grünen Laserpuls ($t_{\text{puls}} \approx 5 \text{ ns}$) angeblitzt.

In einem einzelnen Tröpfchen - sein Volumen von 50 pico-Liter entspricht in etwa dem zehnten Teil des Volumens einer menschlichen Zelle - beträgt somit bei einer Konzentration von 10^{-6} M beim Analyten die noch nachweisbare Stoffmenge

einige Hundert amol (10^{-18} mol)

Abb. 4a) zeigt ein Wassertropfen in 30-facher Vergrößerung 100 ns, nachdem es von oben von einem **IR Desorptions-Laserpuls** getroffen wurde, Abb. 4b) porträtiert es 1000 ns später (beide Male wurde es von einem grünem Laser angeblitzt). Die nachgewiesenen Ionen stammen aus der Gasfront an der Spitze, welche diffus leuchtet. Den expandierenden Gaspuls erkennt man in Abb. 4b) an der sackartigen Flüssigkeitslamelle, die bei späteren Zeiten in noch kleinere Mikrotröpfchen zerfällt.



Abb. 4a) Bild eines Wassertropfens 100 ns nach dem Desorptions-Laserpuls



Abb. 4b) Bild eines Wassertropfens 1000 ns nach dem Desorptions-Laserpuls

Ein LILBID-Massenspektrum eines typischen Aminoglycosid Antibiotikums zeigt Abb. 5). Das Molekül ist bis

zu dreifach geladen, die höheren Ladungszustände sind aber durch Gegenionen auf +1 erniedrigt. Es werden keine Fragmente beobachtet (was erstaunlich ist, da der Zucker viele OH-Absorbergruppen aufweist).

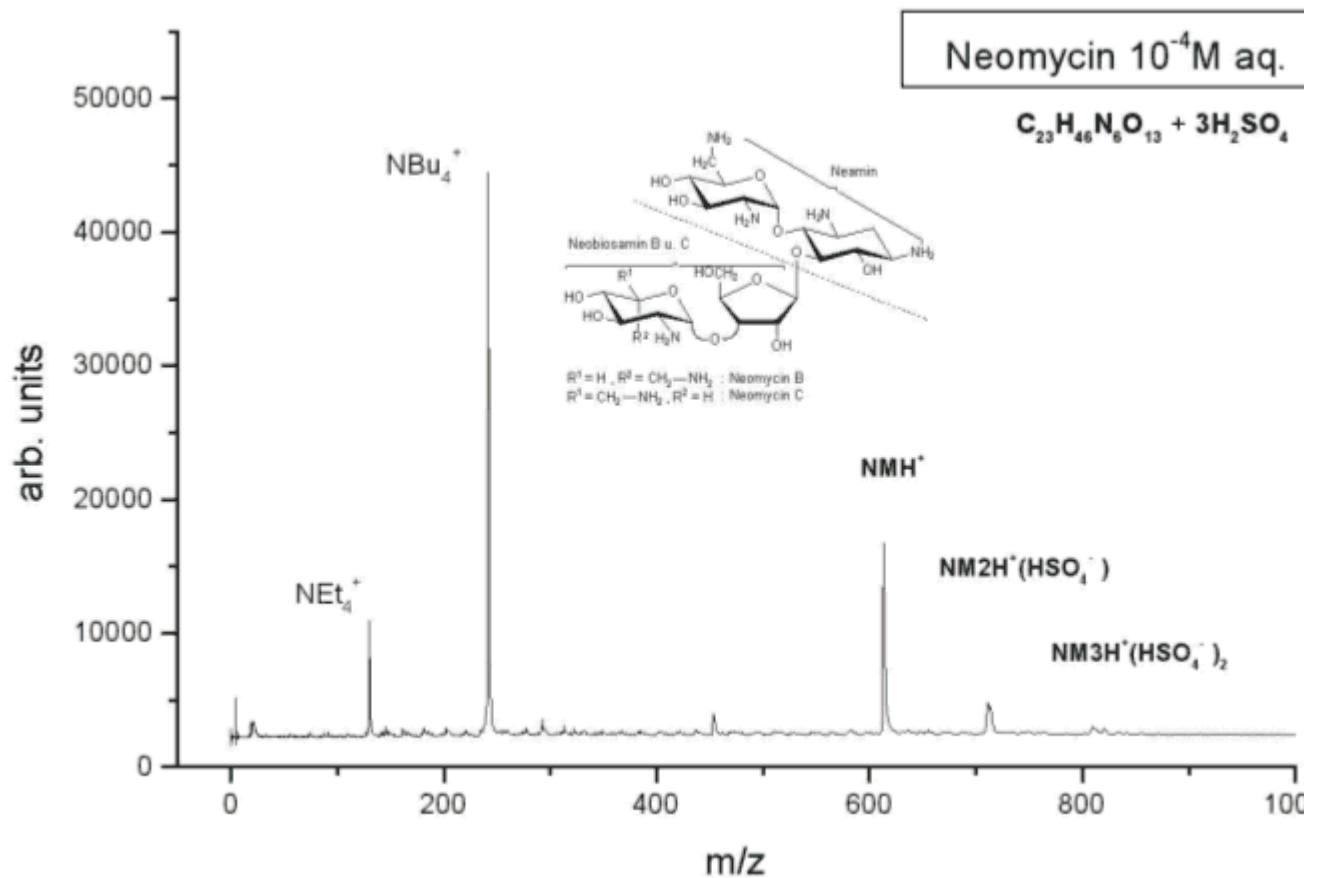


Abb. 5) Kationenspektrum vom Neomycin in wässriger Lösung (50 Tröpfchen)

Das LILBID-Massenspektrum eines typischen Biomoleküls zeigt Abb. 6). Es zeigt die Ionenverteilung von Hühner-Eiweiß-Lysozym, welches in vier Ladungszuständen nachgewiesen wird.

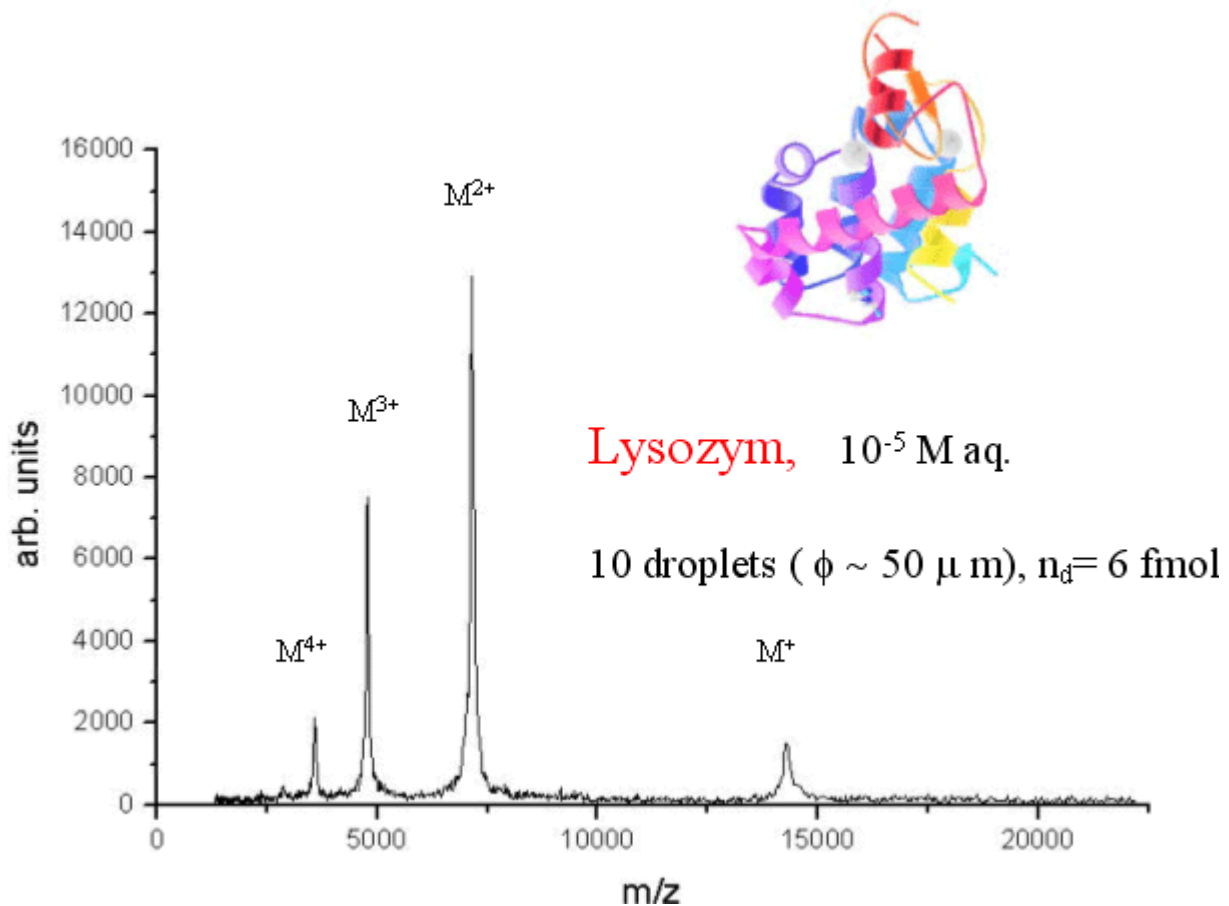


Abb. 6) Kationenspektrum von Hühner-Eiweiß-Lysozym.

Ausblick:

Mit verbesserter Massenauflösung soll das Bindungsverhalten kleiner Liganden an Biomolekülen untersucht werden. Ziel ist der zukünftige Einsatz von **LILBID-MS** als schnelle Screeningmethode für kombinatorisch hergestellte Molekülbibliotheken.

Einen Einblick in die weiteren Forschungsthemen unseres Arbeitskreises erhalten Sie hier:



Ansprechpartner:

Prof. Dr. Bernd Brutschy

brutschy@chemie.uni-frankfurt.de

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie

Universität Frankfurt/M

Marie-Curie Straße 11

D-60439 Frankfurt/M