

Vollantrag auf Einrichtung eines LOEWE-Schwerpunktes an der Justus-Liebig-Universität Gießen (Federführung)
„AmbiProbe – Massenspektrometrische *in-situ*-Analytik für die Problembereiche Gesundheit, Umwelt, Klima und Sicherheit“

Projekt A.3: Laser- und Elektrospray- basierte Methoden der *in-situ*-Ionenerzeugung

Projektleiter: Bernhard Spengler¹ und Wolf-Dieter Lehmann²

¹ Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Justus-Liebig-Universität Gießen

² Molekulare Strukturanalytik, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg

Zusammenfassung

Ziel:

Entwicklung neuer Ionenquellen für den *in-situ*-Betrieb mit **erweitertem Informationsgehalt**

Methoden:

Einsatz von elektrospraybasierten Ionisationsprozessen, dynamischem Isotopenaustausch und enzymatischem Schnellabbau zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit und der Aussagekraft der erzeugten Daten.

Innovativer Aspekt:

- Online-Deuterierung zur Strukturklärung
- Elektrospray-Nachionisation für transportierte Neutralteilchen
- *in-situ* enzymatischer Abbau

Verknüpfung mit anderen Schwerpunkt-Projekten:

Bereich B (Transport), Projekt C3 (*in-situ*-Strukturaufklärung)

Ziele

Der Einsatz von MALDI und ESI-Ionenquellen in mobilen *in-situ*-Massenspektrometern erfordert eine Adaption an die besonderen Bedingungen, die durch die räumliche Trennung von Analyt-Mobilisierung, Transfer, (Nach-)Ionisation und Massenanalyse entstehen. Durch die räumliche Trennung ergeben sich zudem neue Möglichkeiten, die den Informationsgehalt der *in-situ*-Analyse erheblich steigern können.

Als Massenanalysatoren bei vor-Ort-Analysen werden in der Regel Ionenfallen oder TOF-Analysatoren eingesetzt werden (siehe Projekt C1), also Systeme mit niedriger oder mittlerer Massenauflösung. Für die vor-Ort-Analyse muss nach Möglichkeiten zur Erhöhung der Spezifität der analytischen Aussage gesucht werden, um die begrenzte Spezifität massenspektrometrischer Daten zu kompensieren.

Neben der Gesamtzahl der austauschbaren Protonen liefert auch die Austauschgeschwindigkeit wertvolle strukturelle Informationen. Die Kinetik des Austausches hängt dabei von der Azidität der jeweiligen Wasserstoff-Positionen, sowie bei größeren Systemen (Proteinen) auch von der räumlichen Zugänglichkeit und Umgebungs-Hydrophilie der individuellen Positionen ab [Wales 2006] (siehe auch Abbildung 1).

Vorarbeiten

H/D-Austausch liefert eine Aussage über Zahl der im Analyt-Molekül vorhandenen aziden, also im Säure-Base-Gleichgewicht austauschbaren, Protonen [Spengler et al. 1993]. Die Kenntnis der Zahl austauschbarer Protonen erhöht die Spezifität von analytischen Zuordnungen erheblich. Diese Zahl ist auch mit Systemen niedriger und mittlerer Auflösung bestimmbar. MS/MS Spektren von Molekülen mit H/D-ausgetauschten Wasserstoff-Positionen erweitern diese Spezifität auf Substruktur-Einheiten des Analyten.

Grundlage für das Konzept des schnellen H/D-Austausches ist die Beobachtung, dass bei ESI ein instantan wirksamer Austausch von aziden Protonen der Analyten erfolgt, wenn die Ionenbildung in einer ESI-Quelle mit D₂O-Atmosphäre erfolgt [Takats 2003a, Takats 2003b]. Die zusätzliche analytische Information lässt sich in die bestehenden Auswertungsstrategien der zu entwickelnden *in-situ*-Massenspektrometrie integrieren. Es wurde gezeigt, dass diese H/D Zusatzinformation auch im Verfahren der Kompositions-basierten Sequenzierung von Proteinen zu Spezifitätsgewinn und schnellerer Strukturaufklärungen führt [Spengler 2004].

Zusatzinformation zur Zahl der C-Atome kann über Isotopen-spezifische MS/MS Spektren erhalten werden (Lehmann 1998). Diese Art der MS/MS Analyse führt zu Fragmenten-Isotopenmustern mit diskreten, statistisch definierten Intensitätsverhältnissen, welche die Information über das C-Atom-Verhältnis zwischen Molekülen und Fragmenten enthalten.

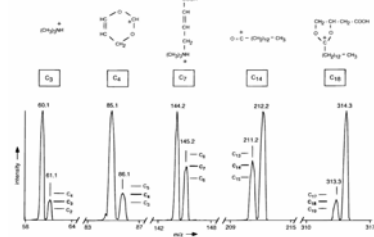


Abbildung 2. Isotopen-spezifische MS/MS Analyse am Beispiel des M+1 Isotomers des [M]⁺ Ions von myristoyl-Carnitin (21 C Atome) mit nanoESI-MS/MS. Das Subkollektiv der M+1 Spezies besteht aus Molekülen, die jeweils 1 Atom ¹³C enthalten. Dieses verteilt sich bei der Fragmentierung statistisch auf die entstehenden Fragmente (Ion/Neutralfragment) entsprechend dem C-Verhältnis zwischen Molekülen und Fragment. Dadurch entstehen bei den Fragmenten Isotopen-Verhältnisse, die nur diskrete Werte annehmen können, entsprechen den Verhältnissen der C-Atome zwischen Precursor- und Fragmenten (Lehmann 1998).

Literatur

Spengler, B., F. Lützenkirchen, R. Kaufmann (1993) On-target Deuteration for Peptide Sequencing by Laser Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, **28**, 1482-1490.

Spengler, B. (2004) De Novo Sequencing, Peptide Composition Analysis and Composition-based Sequencing: A new Strategy Employing Accurate Mass Determination by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 703-714.

Takats Z, Nanita SC, Schlosser G, Vekey K, Cooks RG (2003a) Atmospheric Pressure Gas-Phase H/D Exchange of Serine Octamers. *Anal. Chem.* **75**, 6147-6154.

Takats Z, Schlosser G, Vékey K (2003) Hydrogen/deuterium exchange of electrosprayed ions in the atmospheric interface of a commercial triple-quadrupole mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.* **228**, 729-741.

Lehmann, W. D. (1998) Isotope-selective tandem mass spectrometry: a new tool for elucidation of fragmentation pathways. *J. Mass Spectrom.* **33**:164-172; 1998.

Einleitung

Für die *in-situ*-Ionenerzeugung werden in der Regel nieder- oder mittel-auflösende Massenanalysatoren wie Ionenfallen, Quadrupol- oder TOF-Systeme verwendet. Die mit diesen Systemen erzielbare Strukturinformation soll erweitert werden durch:

- differentiellen H/D Austausch zur Bestimmung der Zahl der austauschbaren H-Atome sowie zur Unterscheidung zwischen schnell und langsam austauschbaren H-Atomen.
- Ausdehnung des H/D Austauschs auf Fragmentionen erzeugt durch CID.
- Einbeziehung von schnellen enzymatischen Methoden bei der Probenpräparation (z. B. Behandlung mit immobilisierten Proteasen oder Phosphatasen).

Methoden

Im Rahmen des Projektes sollen die Möglichkeiten der Elektrospray-basierten Nachionisation von transportierten Neutralteilchen eingesetzt werden, um die *in-situ*-Analytik zu optimieren. Dazu werden desorbierte und transportierte Analyt-Moleküle oder -Partikel in einen ESI-Spray eingekoppelt.

Schneller, reversibler Protonen/Deuteronen-Austausch (H/D-Austausch) in der Gasphase soll instrumentell entwickelt und evaluiert werden.

Der H/D-Gasphasenaustausch im Ionisierungs-Raum einer ESI oder Sekundär-ESI-Quelle soll technisch so entwickelt werden, dass er schnell an- und abgeschaltet werden kann (Sekunden-Bereich). Im MS- und MS/MS-Modus sollen jeweils Spektren mit und ohne H/D-Austausch registriert und differentiell ausgewertet werden. Die Auswertung beinhaltet dann die Bestimmung der durch den H/D-Austausch verursachten Massenverschiebung.

Die H/D-Austausch-Spektrometrie wird die Aussagekraft der Analytik mit Ionenfallen und Flug-zeit-MS-Systemen erheblich erhöhen. Darüber hinaus wird das Austauschsystem auch für die zu entwickelnde Hochauflösungs-MR-TOF-MS eingesetzt werden.

Arbeitspakete

- AP 1: Entwicklung ESI-basierter Nachionisationsmethoden
 AP 2: Charakterisierung und Optimierung der ESI-Nachionisation
 AP 3: Entwicklung eines ESI-Sprayraumes für H₂O / D₂O-Schaltung
 AP 4: Studium des H/D-Austauschverhaltens von Peptiden, Phospholipiden, Kohlenhydraten
 AP 5: Entwicklung eines enzymatischen Schnellabbaus

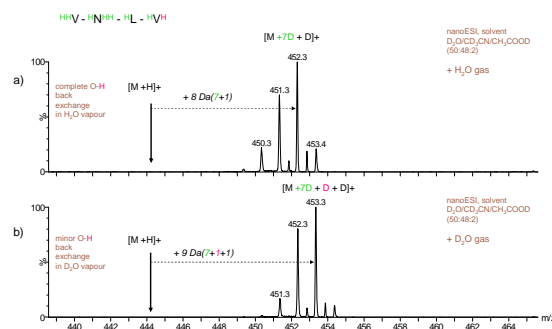


Abbildung 1. Positiv-Ionen NanoESI Survey Spektren des Peptides VNLV aufgenommen aus komplett deuteriertem Lösungsmittel; a) normale Bedingungen; b) Spray in D₂O Atmosphäre. Der Massenshift von +8 Da in a) zeigt, dass das Peptid 7 N-gebundene H-Atome enthält; der Massenshift in von +9 Da in b) zeigt, dass das Peptid zusätzlich ein O-gebundenes H-Atom enthält. (H(grün): Amin und Amid-gebundene H Atome, langsam austauschbar; H(rot): Sauerstoff- gebunden H Atome, schnell austauschbar). Die Gas-Stöße im Spray-Raum bewirken eine Equilibrierung der schnell austauschbaren H-Atome mit H-Atomen der Gas-H₂O Moleküle.

Arbeitsplan	1. Jahr	2. Jahr	3. Jahr
A3 - H/D-Austausch, ESI-Nachionisation			
Entwicklung ESI-Nachionisation	■		
Charakteris. und Optim. ESI-Nachionisation	■	■	
Entwicklung schaltbare H/D-Austauschquelle		■	
Studien Austauschverhalten von Substanzkl.	■	■	■
Entwicklung schneller enzymatischer Abbau		■	
Methoden- und Anwendungstests			■