LOEWE-Schwerpunkt AmbiProbe

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 D.2: Identifizierung, Abwehr und Nutzung bioaktiver Naturstoffe

Projektleiter: Andreas Römpp

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

Zusammenfassung

Ziel:
Demonstration der Fortschritte des Schwerpunktes anhand realer Anwendungsfälle

Methoden:
Zusammenführung der Ergebnisse aus den Projektbereichen A bis D

Innovativer Aspekt:
Kombination der neu entwickelten in-situ Methoden mit komplementären Hochleistungs-Analysenmethoden

Verknüpfung mit anderen Schwerpunkt-Projekten:
A1, A3, B1, C1, C2, D3, D1

Einleitung

Im Rahmen dieses Projektes werden die Ergebnisse der Projektbereiche A bis D zusammengeführt, um die Fortschritte des Schwerpunktes anhand realer Anwendungsfälle zu demonstrieren. Als Beispiel dienen dabei zum einen Mykotoxine in Nahrungsmitteln und zum anderen Peptide und Proteine, die als Biomarker für Krebserkrankungen dienen können [Chen 2008, Römpp 2007]. Mykotoxine sind hochtoxische Verbindungen, die ein bedeutendes Risiko für den Verbraucher darstellen. Eine schnelle und zuverlässige Detektion z. B. bereits während der Ernte oder während der Weiterverarbeitung ist deshalb von entscheidender Bedeutung. Biomarker ermöglichen die frühzeitige Diagnose von Erkrankungen und erlauben eine angepasste und dadurch effizientere Therapie.

Ziele

Besonders in der Anfangszeit ist bei diesen Anwendungen noch eine breite Unterstützung bzw. Absicherung durch etablierte analytisch-chemische Methoden notwendig. Dadurch soll eine fundierte Basis zur späteren Einordnung und Integration der *in-situ*-Ergebnisse geschaffen. werden

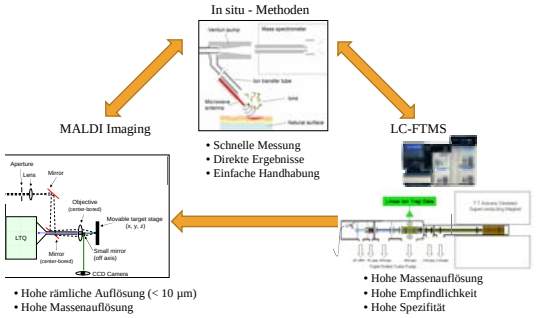
Es ist wichtig zu betonen, dass beide Ansätze komplementäre Informationen liefern. Die off-line-Methoden liefern detailierte Informationen über die Zusammensetzung der Probe mit hoher Nachweisempfindlichkeit und ermöglichen die Identifizierung unbekannter Verbindungen, erfordern aber einen wesentlich höheren Zeitaufwand. Die *in-situ*-Methoden liefern andererseits Ergebnisse in Echtzeit mit hoher Zeitauflösung, möglicherweise begrenzt auf eine limitierte Anzahl von Analyten. Die Kombination dieser beiden Verfahren führt zu einer Informationsfülle, die mit herkömmlichen Methoden nicht erreichbar wäre.

Durch die systematische Einbeziehung einer hohen Massengenauigkeit (Projekt C2) kann die Spezifität der Messungen und damit die Zuverlässigkeit der Identifizierung wesentlich verbessert werden (insbesondere unter Einbeziehung der CBS/MBC-basierten Software aus Projekt C3). Des weiteren erlaubt die Kombination mit bildgebender Massenspektrometrie mit hoher räumlicher Auflösung eine detailierte Untersuchung der Gewebeproben und unterstütz dadurch wesentlich die biologische Interpretation der in-situ-Ergebnisse.

Methoden

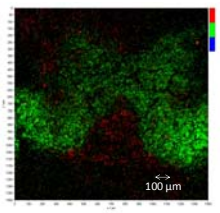
Zur Ergänzung der neuentwickelten in-situ-Messmethoden wird die Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) verwendet. Die chromatographische Auftrennung führt besonders bei komplexen biologischen Proben zu einer wesentlich verbesserten Sensitivität und Sleektivität der Analyse. Zusätzlich kommen Methoden der bildgebenden Massenspektrometrie zum Einsatz, die

In beiden fällen werden modernste Hochleistungs-Hybridmassenspektrometer, bestehend aus einer linearen Ionenfalle und einem Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer, verwendet [Römpp 2005]. Diese Kombination erlaubt eine hochgenaue Bestimmung der Molekülmasse, bei gleichzeitiger hochempfindlicher Detektion der Fragmentionen.



Vorarbeiten

Mit Hilfe bildgebeneder Massenspektrometrie können Gewebeschnitte mit einer räumlichen Auflösung von 10 µm charakterisiert werden. Die graue und weiße Substanz des Rückenmarks (Maus) kann anhand verschiedener Lipidsignale unterschieden werden (links). Die genaue Sequenz von Peptiden kann mit Hilfe der LC-FTICRMS auch für nicht-sequenzierte Species identifiziert werden. Mit Hilfe weiterführender Fragmentierungsmethoden können auch isobare Aminosäuen wie Leucin und Isoleucin unterschieden werden.



Mäuserückenmark, 10 µm Auflösung: Überlagerung von m/z721 (weiße Substanz) und m/z 772 (graue Substanz)

Electron capture dissociation (ECD) zur Unterscheidung von Leucin und Isoleucin in einem Froschpeptid

(potentielle) Anwendungsgebiete

• Froschpeptide
Identifizierung bioaktiver (z.B. antibiotischer) Peptide im Hautsekret verschiedener Froscharten

• ANP/AM-2 -> Kummer, SFB 842
Charakterisierung der Fragmente des Peptides AM-2 in Herzmuskel und Lungengewebe (in Kooperation mit dem SFB 842)

• Acetylcholin
Nachweis und Quantifizierung von Acetylcholin direkt von Gewebeschnitten (in Kooperation mit dem SFB 842)

• Mycotoxine: Cyclopeptide
Identifizierung cyclischer Peptide mit toxischer Wirkung

• Anthocyane
Direkt aus Gewebe(schnitten) verschiedener Organe eines Rattenmodells

• Lipide für REIMS/JeDI
Lipidverteilungen sind wichtige Marker bei in-situ-Messmethoden , eine detailierte Untersuchung der räumlichen Verteilung in Gewebeproben (SMALDI) bildet die Grundlage zur Absicherung und Bewertung der Ergebnisse

• Identifizierung unbekannter Verbindungen ???

Literatur

Römpp, A., L. Dekker, I. Taban, G. Jenster, W. Boogerd, H. Bonfrer, B. Spengler, R. Heeren, P. S. Smitt and T. M. Luider (2007b). "Identification of leptomeningeal metastasis-related proteins in cerebrospinal fluid of patients with breast cancer by a combination of MALDI-TOF, MALDI-FTICR and nanoLC-FTICR MS." Proteomics 7(3): 474-481.

Römpp, A., I. M. Taban, R. Mihalca, M. C. Duursma, T. H. Mize, L. A. McDonnell and R. M. A. Heeren (2005). "Examples of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry developments: from ion physics to remote access biochemical mass spectrometry." European Journal of Mass Spectrometry 11(5): 443-456.

Langsdorf, M., A. Ghassempour, A. Roempp and B. Spengler (to be submitted). "Characterization of peptides from the skin secretion of the tree frog Hyla savignyi by composition-based de novo sequencing using positive and negative ion mass spectrometry."

D2 - Methodenanwendung												
Charakterisierung von Mykotoxinen												
Charakterisierung von Peptiden in Hautsektreten												
In-situ-Messung Mykotoxine												
Integration und biologische Auswertung												