

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 1 : Validierung feldtauglicher Analyseverfahren

Michael Karas

Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt

LOEWE-Schwerpunkt AmbiProbe

## Zusammenfassung

**Ziel:** Charakterisierung und Validierung der zu entwickelnden feldtauglichen Verfahren, Unterstützung der einzelnen Arbeitsgruppen im Hinblick auf die physikochemischen Prozesse bei Probenmobilisierung, -transfer und insbesondere Ionisierung, Optimierung der Analyseverfahren im Hinblick auf qualitative und quantitative Aussagen.

**Methoden:** Durchführung von Laboruntersuchungen mit State-of-the-Art und hochleistungsmassenspektrometrischen Verfahren mit dem Schwerpunkt MALDI-MS und MS/MS, wenn erforderlich in Kombination mit chromatographischer Probentrennung

**Innovativer Aspekt:** Entwicklung von laborbasierten MALDI-MS Analyseverfahren mit minimaler Probenaufbereitung

**Verknüpfung mit anderen Schwerpunkt-Projekten:** allgemein

## Einleitung

Die Entwicklung neuer analytischer Verfahren, insbesondere für den Bereich In-situ/feldtauglicher Analyse, erfolgt zunächst unter dem Aspekt der direkten Identifizierung bekannter und neuer chemischer Zielverbindungen, d.h. einer qualitativen Fragestellung. Voraussetzung dafür ist bei der direkten Untersuchung komplexer (biologischer) Proben eine hohe Nachweisempfindlichkeit und Selektivität des Mobilisierungs-, Transfer- und insbesondere des Ionisierungsverfahrens für die relevanten Analytverbindungen. Allerdings müssen sich alle neu entwickelten Verfahren an wesentlichen analytischen Qualitätskriterien orientieren, insbesondere dem *Limit of Detection* (LOD) und der Möglichkeit, sichere quantitative Aussagen zu machen (dynamischer Bereich und dem *Limit of Quantification* (LOQ)).

## Ziele

Die Arbeiten der Projektpartner sollen von Anfang an intensiv und kritisch begleitet und unterstützt werden. Auf der Basis des veröffentlichten State-of-the-Art sollen für die durch In-situ-Analyse adressierten Problemstellungen Referenzuntersuchungen im Labor an Routine- und Hochleistungs-massenspektrometer durchgeführt werden, a) mit minimaler Probenaufarbeitung mittels MALDI-MS und b) nach Extraktion und HPLC-Trennung mit MALDI- oder ESI-MS und MS/MS. Diese Arbeiten werden auch Aussagen über die physikochemischen Eigenschaften der In-situ-Verfahren erlauben und werden dazu genutzt werden, Aussagen über den analytischen Nutzen und die analytischen Leistungsdaten der neuentwickelten Verfahren zu gewinnen.

## Methoden

### Massenspektrometrie

- MALDI TOF MS (3x)
- MALDI TOF/TOF MS, ABI 4800
- MALDI LTQ Orbitrap



- Routine-, Hochdurchsatz- und Hochleistungsgerät
- MS, MS/MS (PSD), MS<sup>n</sup> (CID, HCD) und Präzisionsmassenbestimmung

- ESI-MS-Systeme (LCQ, oTOF/ABI Mariner, ABI QTrap 2000)
- nanoHPLC, APCI
- GC-QMS

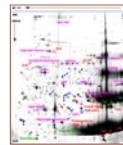
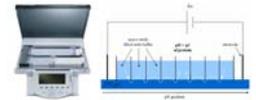
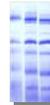
### Nano-rpHPLC

- Herstellung von Nano-Säulen
- MALDI spotting
- KapillarHPLC-Systeme
- Routine-µHPLC



### Proteomics-Arbeitswerkzeuge

- 2D-Trennungen
- 1D-PAGE / Nano-rpHPLC
- IEF / Nano-rpHPLC



### 2D-elektrophoret. Proteintrennungen

- 2D-PAGE
- Native PAGE (Proteinkomplexe)
- doubleSDS-PAGE (Membranproteine)



### Probenvorbereitung / Verdauroboter



- Proteinquantifizierung
- Ettan DIGE
- iTRAQ



## Vorarbeiten

Die Forschungsarbeiten im AK Karas erfolgen unter den folgenden Zielrichtungen :

- Proteomics : Verbesserung der Methodik für Membranproteine
- neue Kombinationen von gelelektrophoretischen Verfahren mit MALDI-PMF
- Einsatz alternativer Enzyme zum Proteinverdau
- Detektion neuer Proteinkomponenten in mitochondrialen Membranproteinkomplexen durch (4D-PAGE : BN1, BN2, dSDS / MALDI-TOF/TOF) (1,2)

- MALDI : Vertiefung des Verständnisses der physikalisch-chemischen Prozesse
- Entwicklung neuer MALDI Matrices (3)



- neue Einsatzfelder für MALDI
- direkte Analyse bakterieller Kulturüberstände / Suche nach neuen antibiotisch wirksamen Substanzen (Surfactine, zyklische Peptide)
- Einsatz von MALDI für *Small Molecules*

## Literatur

High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes\*  
Iku Wittig, Michael Karas, and Hermann Schagger<sup>1</sup>  
*Molecular & Cellular Proteomics* 6:1215-1225, 2007.

Identification of Two Proteins Associated with Mammalian ATP Synthase\*  
Björn Meyer<sup>1</sup>, Iku Wittig<sup>1</sup>, Elisabeth Trillhoff<sup>1</sup>, Michael Karas<sup>1</sup>, and Hermann Schagger<sup>1</sup>  
1690 *Molecular & Cellular Proteomics* 6,10 © 2007

12200-12205 | PNAS | August 26, 2008 | vol. 105 | no. 34  
4-Chloro-α-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix  
Thomas W. Isenhardt<sup>1</sup>, Wolf-Dieter Lehmann<sup>1</sup>, and Michael Karas<sup>1\*</sup>

## Arbeitspakete

1. Bewertung und Unterstützung der Einzelprojekte  
Durchführung von Labormessungen für Fragestellungen verschiedener Einzelprojekte im Hinblick auf LOD und LOQ mit dem Schwerpunkt MALDI (→ wg. Toleranz der Technik und möglicher Anknüpfung an In-situ-Methoden) an ausgewählten Beispielen (zyklische Peptide, Mycotoxine, niedermolekulare Schadstoffe, proteotypische Peptide)
- Erste Schritte zu quantitativen Analysen, Nachweisgrenzen, Definition von Kalibrierstandards, Herstellung von Referenzproben,
- Optimierung von feldtauglichen analytischen Ansätzen (z.B. Matrix, Lsgsm.)
2. Charakterisierung der Stärken und Schwächen der neuentwickelten In-situ Verfahren im Hinblick auf die wichtigen analytischen Leistungsdaten, insbesondere Nachweisgrenzen (LOD und LOQ), Reproduzierbarkeit und Robustheit
3. Validierung der neuentwickelten analytischen Methoden und Protokolle im Vergleich zu Labormethoden (konventionelle MS, HPLC/MS und MS/MS)
4. Erstellung einer Leistungsmatrix - Analytische Methode/Problembereich/Analytische Leistungsparameter - zur Beurteilung des Nutzen und der Konkurrenzfähigkeit der neuentwickelten Verfahren

## Arbeitsplan

D1 - Validierung	1. Jahr	2. Jahr	3. Jahr
Bewertung Einzelprojekte			
Charakterisierung neue Methoden			
Validierung analytischer Protokolle			
Erstellung Leistungsmatrix			