

MASSENSPEKTROMETRIE IN DER BIOANALYTIK (SYMB)

Prof. Dr. Michael Karas
Institut für Pharmazeutische Chemie
Marie-Curie-Str. 9-11
60439 Frankfurt
E-Mail: karas@iachem.de

ÜBERSICHT DER HAUPTVORTRÄGE UND FACHSITZUNGEN
(Hörsaal HV)

Hauptvorträge

SYMB 1.1	Fr	10:30	(HV)	Bildgebende und hoch auflösende Massenspektrometrie in der Bioanalytik , Bernhard Spengler
SYMB 1.2	Fr	11:00	(HV)	Biomoleküle - Laserdesorbiert aus Mikrotröpfchen , Bernd Brutschy
SYMB 1.3	Fr	11:30	(HV)	Mechanismen und spezielle Anwendungen der MALDI-MS mit gepulsten Infrarotlasern , <u>Klaus Dreisewerd</u>
SYMB 1.4	Fr	12:00	(HV)	Analyse der Protein Phosphorylierung mittels Massenspektrometrie , <u>Wolf Dieter Lehmann</u>
SYMB 1.5	Fr	12:30	(HV)	LTQ Orbitrap - Ein neues Hybrid Massenspektrometer aus Linearer Ionenfalle und Orbitrap - Aufbau und Leistungsdaten , <u>Kerstin Strupat</u> , Alexander Makarov, Eduard Denisov, Alexander Kholomeev, Stevan Horning, Oliver Lange, Wilko Balschun,

Fachsitzungen

SYMB 1	Massenspektrometrie in der Bioanalytik	Fr 10:30–13:00	HV	SYMB 1.1–1.5
--------	--	----------------	----	--------------

Fachsitzungen

– Hauptvorträge –

SYMB 1 Massenspektrometrie in der Bioanalytik

Zeit: Freitag 10:30–13:00

Raum: HV

Hauptvortrag

SYMB 1.1 Fr 10:30 HV

Bildgebende und hoch auflösende Massenspektrometrie in der Bioanalytik — ●BERNHARD SPENGLER — Institut fuer Anorganische und Analytische Chemie, Justus-Liebig-Universitaet Giessen, Schubertstr. 60, D-35392 Giessen, Germany

Bildgebende massenspektrometrische Verfahren gewinnen zunehmend an Bedeutung. Im Bereich der Bioanalytik spielt hierbei die MALDI-Massenspektrometrie eine grosse Rolle. Die räumliche Verteilung von Proteinen, Peptiden oder anderen Biomolekülen wird als Graustufen- oder Falschfarbendargestellt. Von jedem einzelnen Rasterpunkt der Probe wird ein Massenspektrum aufgenommen und hinsichtlich interessierender Analytsignale bildlich ausgewertet. Die Untersuchung biologischer Gewebe oder einzelner Zellen erfordert eine der Fragestellung angepasste laterale Auflösung. Bislang eingesetzte Verfahren des so genannten MALDI Imaging sind auf eine laterale Auflösung von etwa 25 bis 50 Mikrometer beschränkt. Spezielle hochauflösende Optiken erlauben eine Auflösung bis in den Bereich von 0.5 Mikrometer, erfordern aber einen erheblichen Entwicklungsaufwand im Bereich der Probenvorbereitung und Matrixapplikation. Im Ergebnis lassen sich derzeit nutzbare laterale Auflösungen im Bereich von etwa 3 Mikrometer realisieren. Eine andere Limitierung bekannter Systeme liegt in der analytischen Interpretierbarkeit der erzeugten Daten. Das Massenaufklärungsvermögen eingesetzter Flugzeitmassenspektrometer reicht in der Regel nicht aus, um aus den MS-Daten eines Verteilungsbildes direkt auf die Identität oder Struktur der abgebildeten Substanzen zu schliessen. Neuere Entwicklungen gehen daher dahin, das bildgebende Verfahren mit hochauflösender FT-ICR-Massenspektrometrie zu verknüpfen. Die Möglichkeiten und Grenzen dieser Verfahren, sowie erste Ergebnisse werden zusammengefasst.

Hauptvortrag

SYMB 1.2 Fr 11:00 HV

Biomoleküle - Laserdesorientiert aus Mikrotröpfchen — ●BERND BRUTSCHY — Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, JW Goethe-Universität, Marie-Curie-Str. 9-11, 60439 Frankfurt

Mass spectrometry (MS) of biomolecules was revolutionized by electrospray ionization MS (ESI) and matrix-assisted laser desorption/ionization MS (MALDI), honored by the Nobel Prize in 2002. Both methods have specific advantages and draw-backs and are now widely applied in biology, biochemistry and pharmacology. Since some years an alternative laserdesorption method is being developed in our group called LILBID-MS (laser induced liquid beam/bead/blob ion desorption)[1], which tries to combine some of the advantages of the above methods.

Here ions are desorbed/ablated from micro droplets ($\phi = 50 \mu\text{m}$, $V = 65 \text{ pl}$) into vacuum by resonant excitation of vibrations in the solvent by means of a ns-pulsed IR OPO-laser ($\sim 3 \mu\text{m}$).

LILBID proved to be a highly sensitive and soft method which is relatively tolerant to salt and buffers. It allows the investigation of biomolecules in native solution at very low analyte consumption, typically at femto- to attomolar (10^{-18}) or even lower amount. The duty cycle of the method is 1. Not only noncovalently bonded biomolecules are detectable at relatively low charge state, but also specific noncovalently bonded biomolecular complexes [2]. For their specificity (molecular recognition) most often a specific native environment (buffer, pH, solvent) is mandatory, which can be realized in the droplets. The method is applicable to a wide range of biomolecules from smaller peptides and aminoacids, to isolated RNA and DNA. The latter may be targeted by specific ligands (antibiotics and inhibitors). But also large hydrophobically bound membrane proteins such as cytochrome-C-oxidase (COX 125 kD) may be detected. A further advantage of this methods is that it allows to test the binding strength of a complex qualitatively by varying the intensity of the laser. Thus by thermolysis, larger complexes like COX can be systematically fractionalized into its molecular subunits.

The talk will give an overview of the experiment, discuss some results and presents a possible mechanism for the ion formation.

[1] W. Kleinekofort, J. Avdiev, B. Brutschy: A new method of laser desorption mass spectrometry for the study of biological macromolecules *Int. J. Mass. Spectr. Ion Proc.* 152 (1996) 135-142

[2] N. Morgner, H.-D. Barth, B. Brutschy: A new way to detect noncovalently bonded complexes of biomolecules from liquid micro-droplets by laser mass spectrometry

accepted for publication in *Australian Journal of Chemistry*, Volume 59, No 1 (2006)

Hauptvortrag

SYMB 1.3 Fr 11:30 HV

Mechanismen und spezielle Anwendungen der MALDI-MS mit gepulsten Infrarotlasern — ●KLAUS DREISEWERD — Institut fuer Medizinische Physik und Biophysik, Westfaelische-Wilhelms Universitaet Muenster, Robert-Koch-Str. 31, 48149 Muenster

Im Gegensatz zur etablierten UV-MALDI-MS mit Ultraviolet-Lasern, bei der pro Laserimpuls typischerweise nur einige wenige Monolagen an Material abgetragen werden, geht die Infrarot (IR-)MALDI-MS mit einer Ablation von Material im Bereich von Mikrometern bis zu einigen zehn Mikrometern in der Tiefe einher. Photomechanische Prozesse koennen bei der IR-MALDI eine wesentliche Rolle spielen. In dem Vortrag werden Studien zur photoakustischen Analyse des Ablationssprozesses vorgestellt, welche den Uebergangsbereich zwischen akustischem Confinement und reinem thermischen Confinement dokumentieren. Durch den Vergleich der photoakustischen Signale mit den MALDI-Ionensignalintensitaeten lassen sich Rueckschluesse auf den Ionisationsmechanismus gewinnen. Der funktionelle Zusammenhang wird durch Nanosekunden-zeitaufgeloeste Fotografie des expandierenden MALDI-Plumes und durch Nachionisationsexperimente weiter bestaetigt.

In der Anwendung fuehrt die IR-MALDI zur Erzeugung besonders kalter Analytionen. Wegen der Energieeinkopplung ueber Schwingungsfreiheitsgrade ist es zudem moeglich, fluessige Matrices wie Glycerol vorteilhaft einzusetzen. Hierdurch ergeben sich eine Reihe von spannenden Anwendungsmoeglichkeiten. Ausgewaehlte Beispiele zur Analyse von grossen Proteinen und zur Kopplung der Methode mit chromatographischen Verfahren werden vorgestellt.

Hauptvortrag

SYMB 1.4 Fr 12:00 HV

Analyse der Protein Phosphorylierung mittels Massenspektrometrie — ●WOLF DIETER LEHMANN — Central Spectroscopy, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg

Mass Spectrometry has evolved as the key technology in the practice of finding and characterizing new protein phosphorylation sites. The set-up of a multidimensional analytical method optimized for structural and quantitative protein phosphorylation analysis is described. Liquid chromatography-element mass spectrometry (LC-ICP-MS) or laser ablation ICP-MS with 31-P detection is used as an initial screening method to determine the presence and relative quantity of phosphoproteins, e.g. in cytosolic protein fractions, or in isolated proteins. Phospho-specific chemoaffinity enrichment procedures applied at the phosphoprotein or phosphopeptide level are necessary for molecular characterization of sites with low stoichiometry of phosphorylation. The pinpointing of phosphorylation sites is best done with electrospray tandem mass spectrometry in the positive ion mode, which allows reliable sequencing of phosphopeptides. The specific fragmentation features of phosphopeptide cations and anions are described. Applications of these techniques to the analysis of reference phosphoproteins (ovalbumin, protein kinase A) and to proteins with previously unknown phosphorylation sites is demonstrated.

Hauptvortrag

SYMB 1.5 Fr 12:30 HV

LTQ Orbitrap - Ein neues Hybrid Massenspektrometer aus Linearer Ionenfalle und Orbitrap - Aufbau und Leistungsdaten

— •KERSTIN STRUPAT, ALEXANDER MAKAROV, EDUARD DENISOV, ALEXANDER KHOLOMEEV, STEVAN HORNING, OLIVER LANGE und WILKO BALSCHUN — Thermo Electron Bremen, Hanna-Kunath-Str. 11, 28199 Bremen

The Orbitrap mass analyzer is an electrostatic trap that has been demonstrated to provide high resolving power, mass accuracy and high space charge capacity with pulsed ion sources. When interfaced to continuous ion sources however it proved to be more challenging when trying to combine these features with wide mass range, high sensitivity and dynamic range. This work describes a novel hybrid mass spectrometer

where limitations of earlier schemes were successfully overcome. The entire instrument operates in LC/MS mode with nominal mass resolving power 60,000 (1 spectrum/sec) and maximum resolving power in excess of 100,000 (FWHM). Automatic gain control is used to provide user-controlled ion population thus ensuring high accuracy of mass measurements: ± 2 ppm using internal standards and ± 5 ppm with external calibration. More importantly, the instrument provides very high dynamic range of mass accuracy. Rapid and automated data-dependent MS/MS allows the instrument to operate in real time, with up to 3 MS/MS high-mass accuracy spectra per second. These analytical parameters are seamlessly combined with MSⁿ capability of the LTQ mass spectrometer. Examples of applications include analysis of pharmaceutical and proteomic samples using LC/MS(n) and demonstrate high sensitivity and specificity of the instrument.