

## Spannende Filme aus dem Labor:

### Mit der Massenspektrometrie enzymatisch-aktive Proteine bei der Arbeit beobachten

*Dr. Thomas Letzel*

*Analytische Forschungsgruppe am Competence Pool Weihenstephan, TU München, Freising-Weihenstephan*

#### **Analytik in Routine und Forschung**

Wer kennt das nicht! Analytik zu betreiben ist eine tolle und abwechslungsreiche Sache, kann manchmal aber auch eintönig werden, vor allem dann, wenn es sich um den vielfachen Nachweis von denselben Substanzen in immer den gleichen Matrices handelt. In dem Bereich der Quantifizierung von Analyten in Realproben ist es allerdings zweckmäßig immer das Gleiche zu machen, um so möglichst geringe Varianzen zu erhalten und dadurch die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen.

Entwickelt man auf der anderen Seite, wie es in Hochschulen häufig der Fall ist, ausschließlich neue Technologien und Anwendungen, so ist es von primärem Interesse, Methoden weiterzuführen beziehungsweise zu optimieren, die Reproduzierbarkeit ist hier zunächst zweitrangig. Dies heißt im extremsten Fall aber auch, dass kein Analysevorgang wie der andere ist. Problematisch wird es allerdings, wenn die Bedingungen dann nicht mehr nachvollziehbar sind, was im akademischen Forschungslabor leider oft genug vorkommt. Daher wäre es von unschätzbarem Wert eine Analysemethode zu haben, die Nachlässigkeiten solcher Art etwas abmildert, später aber trotzdem in der eingangs erwähnten Routine eingesetzt werden kann, zum Beispiel durch etwas Kamera-ähnliches.

#### **Massenspektrometrie (MS)**

Die Massenspektrometrie ist solch eine Technik. Zwar sollten Sie auch bei der MS die detaillierten Geräteeinstellungen oder Randbedingungen kennen und in Ihrem Laborjournal vermerken, allerdings bleibt die spezifische Information auch ohne bekannte Parameter erhalten, was bei Detektionsarten wie Fluoreszenz, Radioisotopennachweis und UV-Vis häufig nicht der Fall ist.

Deshalb wäre es ein sehr praktikabler Vorschlag, dem forschenden Nachwuchs beispielsweise ein Single-Quadrupol-Massenspektrometer zur Verfügung zu stellen, denn dieses gibt vielfältige Information, verzeiht Fehler und Nachlässigkeiten, lehrt - durch die variable Nutzung - Analytik zu verstehen, ist robust und mittlerweile auch günstig genug, um preislich mit anderen Detektionstechniken mithalten zu können und ist Kamera-ähnlich.

## Massenspektrometrie als Kamera für getrennte Moleküle

Die Flüssigphasen-gekoppelte Massenspektrometrie (FP-MS) hat in den letzten Jahren nicht nur in Stückzahlen immens zugelegt, sondern hat ebenso ihr großes Potential bewiesen. Auch deshalb spielt die FP-MS Technik mittlerweile eine entscheidende Rolle in der quantitativen und qualitativen Analyse von polaren, nichtflüchtigen, labilen Molekülen.

Die Massenspektrometrie wird dabei, wie angedeutet, als 'Filmkamera' eingesetzt, das heißt Bilder werden in sehr kurzen Zeitabständen aufgenommen und anschließend als Sequenzen dargestellt. Ein Beispiel ist der Nachweis von Substanzen nach ihrer chromatographischen Abtrennung von Matrix oder Verunreinigungen (Abbildung 1). Dabei wird jeweils die entsprechende Masse (zu Ladung) des Analyten über eine bestimmte Zeit aufgezeichnet und anschließend als Signal im Chromatogramm wiedergegeben. Das stellt sich so dar, als ob Sie ununterbrochen auf mehrere Türen schauen würden und abwarten bis sich eine öffnet. Tut sie es, so können der Zeitpunkt, die Öffnungsdauer sowie der Öffnungswinkel dieser Tür bestimmt werden. Die dann auf dem Computer gespeicherten Bilder (Daten) können nun immer wieder aufgerufen, die Szenen abgespielt und sogar ‚korrigiert‘ werden. Tatsächlich zeigen die Detektoren im realen Einsatz noch weitaus größere Flexibilität.

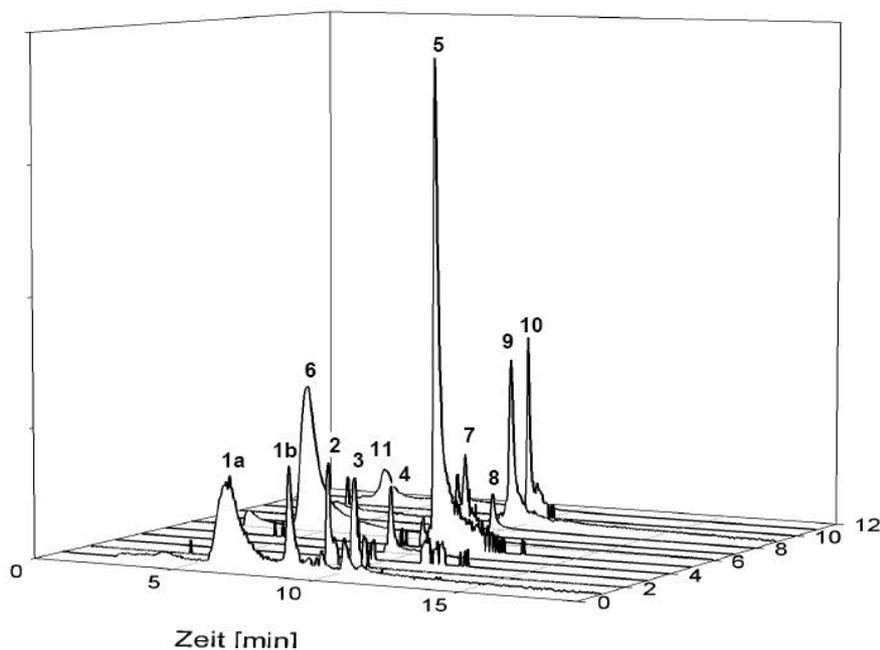


Abbildung 1: Extrahierte Ionenchromatogramme bekannter (polyphenolischer) Substanzen in Rotwein, aufgezeichnet mit der Kamera eines Flugzeit-Massenspektrometers.

Die Nummern entsprechen folgenden Substanzen (bzw. Türen): 1a) Catechinhydrat; 1b) Epicatechin; 2) Dihydroquercetin; 3) Myricitrin; 4) Myricetin; 5) Kämpferol; 6) Phenylethylamin; 7) Phloridizin; 8) Quercetin; 9) Resveratrol; 10) Isorhapontin/Rhapontin; 11) Spermidin

## Massenspektrometrie als Kamera für enzymatische Reaktionen

In jüngster Zeit wird die massenspektrometrische Detektion auch ohne vorherige chromatographische Trennungen zur direkten Beobachtung von chemischen<sup>[1][2]</sup> oder biologischen<sup>[3]-[8]</sup> Reaktionen eingesetzt. Da es sich bei den Reaktionslösungen meistens um komplexe Mischungen handelt (Ausgangssubstanzen, Übergangs- und Endprodukte der Reaktion usw.), füllt sich die gefilmte Szene im Massenspektrometer sehr schnell mit unterschiedlichen Begebenheiten (besser gesagt  $m/z$ -Werten).

Hervorzuhebende Beispiele sind dabei die massenspektrometrischen Studien von enzymatisch aktiven Proteinen mit deren Hilfe in den letzten Jahren schon mehrere biologische Fragen geklärt bzw. enzymatische Systeme untersucht werden konnten.<sup>[9]-[20]</sup> Und dies dürfte in Anbetracht der ‚Einfachheit‘ dieser analytischen Systeme erst der Anfang gewesen sein.

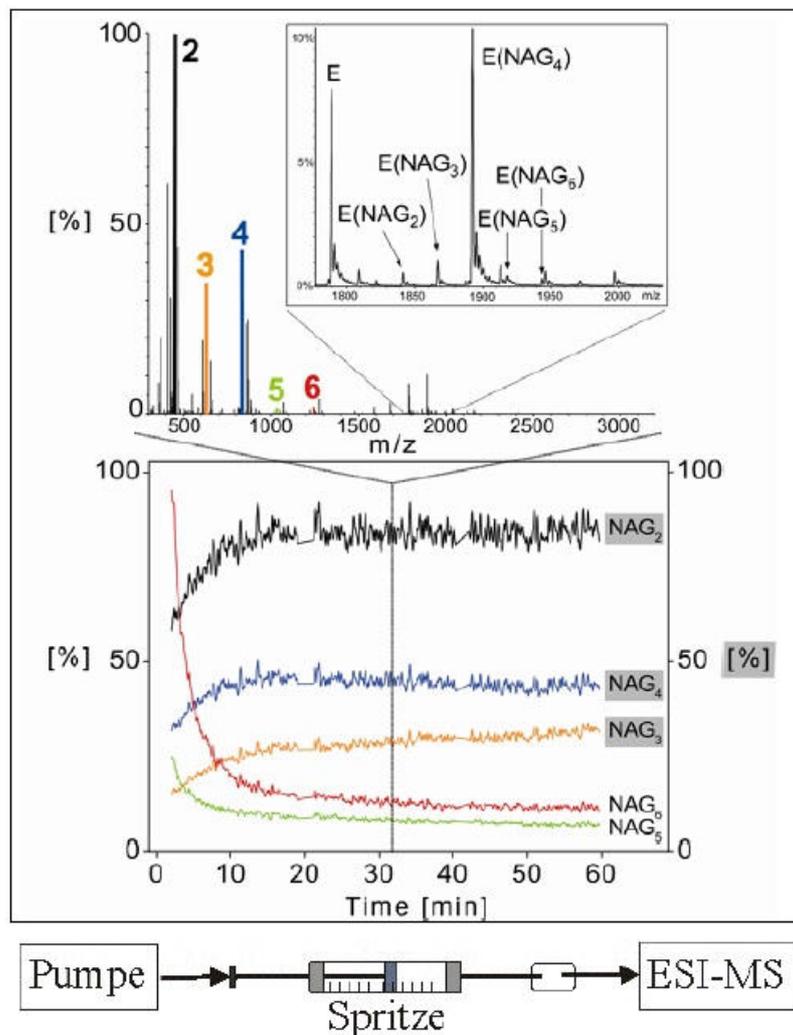


Abbildung 2: Substratabbau durch das Hühnereiprotein Lysozym. Zu sehen ist der ‚Film‘ der Hydrolyse mit Ausgangssubstanz (NAG<sub>6</sub>), sowie den Produkten (NAG<sub>4</sub>, NAG<sub>3</sub>, NAG<sub>2</sub>). Herausgehoben ist eine Szene des Films mit dem ‚Gesamtgeschehen‘: die farbig markierten, bekannten Substanzen, das Enzym Lysozym (E) und mehrere Beispiele von Enzymkomplexen. Im unteren Bereich ist das analytische System dargestellt.

Ein Beispiel für solch ein einfaches System ist die Direktinjektion einer Reaktionsmischung in das Massenspektrometer. Die Enzyme werden dabei mit deren Ausgangssubstanzen sowie anderen Substanzen unter MS-kompatiblen Lösungsbedingungen gemischt und dann in niedrigen Flussraten (meistens mit weniger als  $0.01 \text{ mL min}^{-1}$ ) direkt in das Massenspektrometer eingebracht. Die gemessenen Reaktionsdaten können auch hier sehr anschaulich mit der Beschaffenheit alter Kinofilme auf klassischen Filmrollen verglichen werden. Das Massenspektrometer trennt alle (als Ionen) in das Gerät gelangende Moleküle der Masse (zu Ladung) nach auf und macht dabei simultan von allen Ionen ein Bild, beispielsweise nach jeweils einer Sekunde. Dieses Bild wird auch Spektrum genannt und ein Beispiel kann der Abbildung 2 entnommen werden. Abertausende von aneinander gereihten Bildern ergeben so einen Film, den man sich auch ansehen kann und der für Massenspektrometriker oft spannender ist als jeder Krimi.

Die Darstellung des Gesamtbildes von Spektren (bzw. des Gesamtgeschehens im Film) über die beobachtete Zeit kann man nun auf einzelne Substanzen bzw. Handlungen in den Szenen reduzieren (beispielsweise auf die Ausgangssubstanzen der eben benannten Lysozym-Reaktion Enzym E,  $\text{NAG}_6$  und  $\text{NAG}_5$  sowie die Endprodukte  $\text{NAG}_4$ ,  $\text{NAG}_3$  und  $\text{NAG}_2$ ). Zum leichteren Verständnis bleiben wir beim Beispiel des Filmes: Nehmen wir an, es wird die Heimkehr eines Analytikers (alternativ: einer Analytikerin) nach erfolgtem Tageswerk in seine/ihre Wohnung analysiert. Das gefilmte Gesamtgeschehen zeigt das Eintreten der Person in die Wohnung, das Ablegen von Mantel, Hut und Straßenschuhen sowie das Anlegen der Lieblingspantoffeln. Reduziert man nun das Gesamtbild auf interessante Einzelheiten, so würde man beispielsweise beobachten können, wie der getragene Hut vom Kopf (mittels Hand) auf die Hutablage gelangt, während die Hausschuhe gleichzeitig aus dem Schuhschrank an die Füße wandern. Erwartet man im Vorfeld, dass die Straßenschuhe und die Jacke abgelegt werden, so kann man sich diese Handlungen gezielt und unabhängig vom Gesamtbild anzeigen lassen. Gleiches funktioniert auch für Filmhandlungen, die zunächst nur auf Vermutungen basieren und/oder sich nicht direkt aus der Szene erkennen lassen (beispielsweise das Entnehmen des Geldbeutels aus der Innentasche der getragenen Jacke). Auf der anderen Seite kann man Szenen ‚extrahieren‘, nachdem man den Gesamtfilm betrachtet hat und sich ihn erneut als ‚spezifischen Film‘ ansehen.

Ähnlich verhält es sich nun bei der massenspektrometrischen Untersuchung von Enzymen: Neben dem Gesamtbild und den erwarteten Molekülen (wie Ausgangssubstanz und bekannte Produkte) kann man durch Beobachtung oder Vermutung auch neue, bisher unbekannte (Zwischen-) Produkte ‚extrahieren‘ und deren Vorhandensein über die Zeit beobachten. Der wesentliche Vorteil dieser Technik ist dabei der hohe Informationsgehalt durch die parallele Aufzeichnung vieler ‚Handlungen‘ in einer Szene bzw. Ionen in einem Spektrum und die anschließend flexible Auswertung dieser Daten. Das präsentierte Beispiel zur Untersuchung der enzymatischen Hydrolysereaktion von Lysozym verdeutlicht die einfache, aber effektive Anwendung dieser

‚beobachtenden‘ Technologie.<sup>[12][21]</sup> Derzeit wird die Technik in der Arbeitsgruppe um Dr. Thomas Letzel mit einem speziellen Massenspektrometersaufsatz für die Anwendung in der Praxis fit gemacht. Dabei wird das Reaktionsgemisch mittels Roboter in nano-Liter (nL) Volumina pipettiert und über eine Kapillare in nL-Flussraten direkt in das Massenspektrometer eingebracht.<sup>[22]</sup> Diese automatisierte und miniaturisierte Anwendung wird es zukünftig ermöglichen, teilweise auch geringste Mengen Protein auf deren funktionelle Eigenschaften zu testen.

## Flüssigphasentechniken zur Szenenänderung in MS-detektierten enzymatischen Reaktionen

Ein weiteres ‚einfaches‘ Untersuchungssystem ist die kontinuierliche Mischtechnik von unterschiedlichen Lösungsflüssen mit verschiedenen enthaltenen Komponenten in Kopplung mit der Massenspektrometrie.

In Filmen, deren Szenen sich nicht ändern, wird man sehr schnell müde und schläft ein. Das Gleiche gilt auch für enzymatische Reaktionen in denen sich nichts tut. Reagiert beispielsweise ein Enzym im kontinuierlichen Fluss immer gleichlang mit seinem Substrat, so wird immer die gleiche Menge Produkt entstehen (Abbildung 3 obere und untere Leitung). Gibt es nun allerdings eine dritte Spur, über die einzelne reaktionsverändernde Substanzen zudosiert werden (Probengeber (Auto) oder HPLC in Abbildung 3), so wird der Film bzw. die Reaktion wieder interessant. Solche Substanzen können die Produktbildung unterdrücken (Inhibitor) oder verstärken (Aktivator). Somit ändert sich die Spurintensität des untersuchten Produktes. Diese Änderung kann qualitativ und teilweise sogar quantitativ erfasst werden. Mit solchen Ansätzen werden deshalb reaktionsverändernde Stoffe für bekannte und unbekannte Enzyme ermittelt und funktionelle Eigenschaften von neuen Proteinen ‚gefilmt‘. Auch hier gilt, umso geringer die Flussraten der beteiligten Ströme desto geringer die Menge an verbrauchtem biologischem Material und desto besser ist das System in der Praxis einsetzbar. Derzeit bearbeitet die Arbeitsgruppe von Dr. Letzel auch dies im Rahmen eines kürzlich bewilligten Projektes zur Etablierung in der Analytik von Hausstaub.

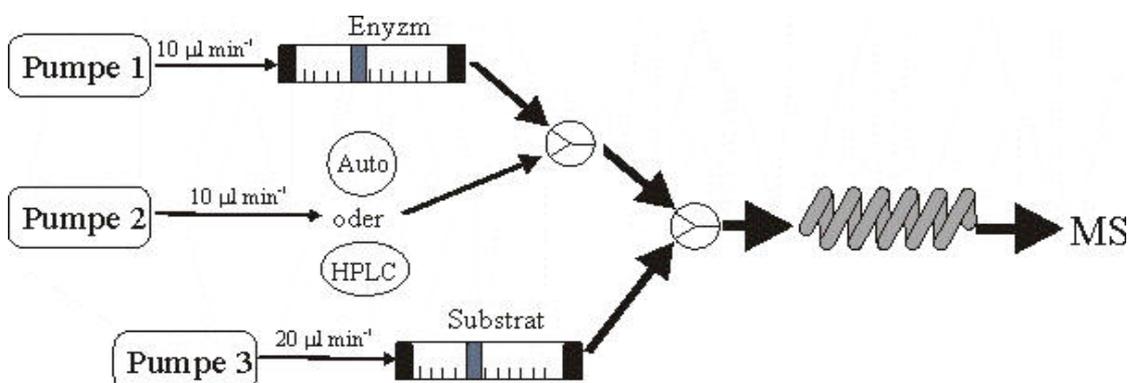


Abbildung 3: Kontinuierliches Mischsystem zur Untersuchung von dritten Komponenten auf die Eigenschaften von enzymatischen Reaktionen. Apparative Details finden Sie in Literatur [12]

Die konsequente Weiterführung dieser Anwendungen in unterschiedlichen Matrices könnte zur breiten Verwendung der ‚massenspektrometrischen Filmtechnik‘ führen.

## Literatur

- [1] Santos, L.S.; Knaack, L.; Metzger, J.O. *International Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *246*, 84-104.
- [2] Moura FC, A. M., Dalmázio I, Alves TM, Santos LS, Eberlin MN, Augusti R, Lago RM *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 1859-1863.
- [3] Liesener, A.; Karst, U. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *382*, 1451-1464.
- [4] Greis, K.D. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26*, 324-339.
- [5] De Boer, A.R.; Lingeman, H.; Niessen, W.M.A.; Irth, H. *Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26*, 867-883.
- [6] Letzel, T. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 257-261.
- [7] Wanner, K.; Hoefner, G. *Mass spectrometry in medicinal chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2007.
- [8] Rehm, H.; Letzel, T. *Der Experimentator: Proteinchemie / Proteomics*, 6th ed.; Elsevier GmbH: München, 2009.
- [9] de Jong, C.F.; Derks, R.J.E.; Bruyneel, B.; Niessen, W.; Irth, H. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 303-310.
- [10] Denhart, N.; Fukamizo, T.; Brzezinski, R.; Lacombe-Harvey, M. E.; Letzel, T. *Journal of Biotechnology* **2008**, *134*, 253-260.
- [11] Lacombe-Harvey, M.È.; Fukamizo, T.; Gagnon, J.; Ghinet, M.G.; Denhart, N.; Letzel, T.; Brzezinski, R. *FEBS Journal* **2009**, *276*, 857-869.
- [12] Denhart, N.; Weigang, L.M.M.; Fujiwara, M.; Fukamizo, T.; Skriver, K.; Letzel, T. *Journal of Biotechnology* **2009**, *143*, 274-283.
- [13] Schlüter, H.; Hildebrand, D.; Gallin, C.; Schulz, A.; Thiemann, J.; Trusch, M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *392*, 783-792.
- [14] De Boer, A.R.; Letzel, T.; Van Elswijk, D.A.; Lingeman, H.; Niessen, W.M.A.; Irth, H. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 3155-3161.
- [15] De Boer, A.R.; Bruyneel, B.; Krabbe, J.G.; Lingeman, H.; Niessen, W.M.A.; Irth, H. *Lab on a Chip* **2005**, *5*, 1286-1292.
- [16] De Boer, A.R.; Alcaide-Hidalgo, J.M.; Krabbe, J.G.; Kolkman, J.; Van Emde Boas, C.N.; Niessen, W.M.A.; Lingeman, H.; Irth, H. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 7894-7900.
- [17] De Boer, A. R.; Letzel, T.; Lingeman, H.; Irth, H. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *381*, 647-655.
- [18] Zhang, X.K.; Elbin, C.S.; Chuang, W.L.; Cooper, S.K.; Marashio, C.A.; Beauregard, C.; Keutzer, J.M. *Clinical Chemistry* **2008**, *54*, 1725-1728.
- [19] Zechel, D.L., Konermann, L., Withers, S.G., Douglas, D.J.. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7664-7669.
- [20] Ge, X., Sirich, T., Beyer, M., Desaire, H., Leary, J. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5078-5082.
- [21] Denhart, N.; Letzel, T. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *386*, 689-698.
- [22] Corso, T.; Almeida, R.; Denhart, N.; Henion, J.; Lees, M.; Letzel, T. *Proceedings of the 55th ASMS Conference, Indianapolis* **2007**.

Falls auch Sie eine Anwendung haben, wünschen wir Ihnen viel Erfolg und geben Ihnen natürlich auch gerne Unterstützung bei Startproblemen oder in Kooperationen.

Zum Abschluss noch eine Bitte in eigener Sache:

Haben Sie ‚echte Filme‘ aus Ihrem analytischen Alltag, die Sie zur Verfügung stellen wollen, so senden Sie diese bitte an folgende Adresse (t.letzel@wzw.tum.de), denn dann werde ich diese in eines unserer Projekte der Öffentlichkeitsarbeit (mit dem Namen [www.chemnixblog.de](http://www.chemnixblog.de)) einbinden. Herzlichen Dank