

Makroskopischer Wassertropfen vor dem Frankfurter Römer.

Der mikroskopische Blick auf die Moleküle des Lebens

Massenspektrometrie:
Wäge- und Analysetechnik
in einem

von Bernd Brutschy
und Michael Karas

Die Stärke der Massenspektrometrie liegt in der Direktheit und Einfachheit der gewonnenen Information. Daher ist sie als Analyseverfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung von chemischen Verbindungen von großer Bedeutung. Jede chemische Verbindung besteht aus einer definierten und charakteristischen Anzahl von unterschiedlichen Bausteinen, den Atomen, die zu einem dreidimensionalen Gerüst verknüpft sind **1**. Jedes Atom hat eine charakteristische Masse. Massenspektrometer sind Geräte, mit denen die Masse von Atomen und Molekülen sehr

Der wissenschaftliche Fortschritt in Chemie, Biowissenschaften und Medizin basiert auf den immer detaillierteren Erkenntnissen über die molekularen Prozesse des Lebens. Eine Voraussetzung dafür sind Fortschritte bei den analytischen Methoden, Techniken und Instrumenten. In dem heute zur Verfügung stehendem Instrumentarium spielt die Massenspektrometrie eine zunehmend wichtige Rolle. Wenn aktuell ein neuer Doping-Skandal durch die Presse geht, sind immer massenspektrometrische Techniken im Spiel: Sie ermöglichen den Nachweis von erlaubten und verbotenen Substanzen aller Art – auch Dopingmitteln.

genau bestimmt werden kann – im Prinzip also Waagen für einzelne atomare und molekulare Teilchen. Dass dies kein normaler Wägevorgang sein kann, versteht sich wegen der unvollständig kleinen Größe – Molekülgrößen liegen im Bereich von millionstel Millimetern – und dem verschwindend geringen Gewicht einzelner Moleküle von selbst: Ein Wasser-Molekül bringt gerade einmal 3×10^{-23} Gramm auf die Waage (also 3 geteilt durch 100 000 000 000 000 000 000 000). Massenspektrometrische Analysen geben aber nicht nur Aufschluss über die Masse eines Moleküls, sondern auch über seine

Struktur. Die Verknüpfung der Atome zu einem für ein bestimmtes Molekül einzigartigen Gerüst ist das zweite, wesentliche Charakteristikum einer chemischen Verbindung. Mit fortgeschrittenen massenspektrometrischen Techniken gelingt es, Molekülonen zu selektieren und in einem zweiten Schritt gezielt in Bruchstücke zu zerlegen, um anschließend aus den Puzzlestücken wiederum auf der Basis einer Massenbestimmung auf die chemische Struktur einer unbekanntem Verbindung zu schließen.

Molekulares Wiegen

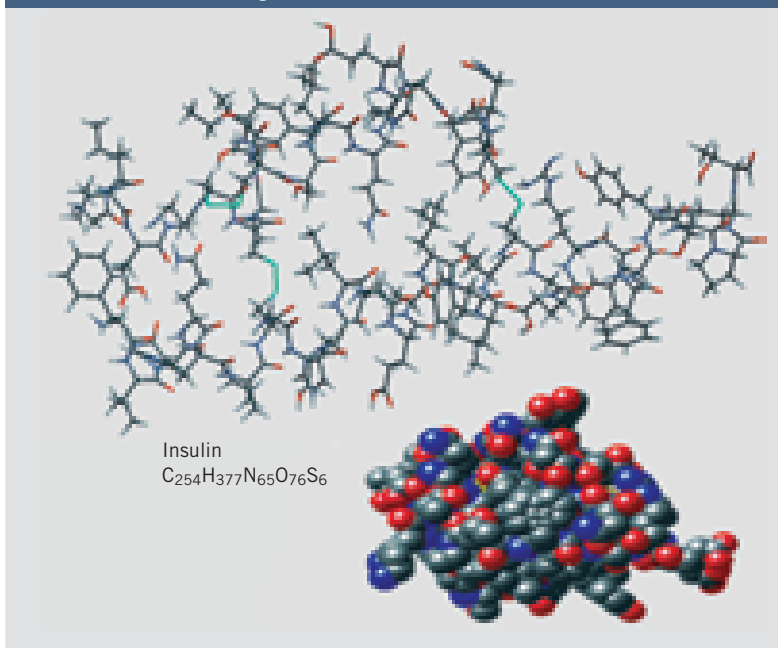
Der massenspektrometrische »Wägevorgang« erfordert einigen Aufwand: Zunächst müssen die zu untersuchenden Probenmoleküle in freie, gasförmige Teilchen und dann in Ionen, das heißt elektrisch geladene Teilchen, überführt werden. Dies gelingt in einer so genannten Ionenquelle durch den Entzug von einem negativ geladenen Elektron oder durch die Anlagerung von (positiv) geladenen Teilchen, wie etwa einem Proton (positives Wasserstoffion, H^+). Dazu ist ebenso wie bei der nachfolgenden Trennung der Molekülonen im massenspektrometrischen Analysator ein sehr geringer Druck (Hochvakuum) nötig, damit die Molekülonen nicht mehr weiter reagieren und unter dem Einfluss elektrischer und magnetischer Kräfte der Masse nach sortiert werden können. Die in Ionen überführten Moleküle haben einen weiteren großen Vorteil: Sie erzeugen am Detektor elektrische Signale, die sich physikalisch effektiv verstärken lassen. Mit modernen Detektoren ist bereits ein einziges ionisiertes Teilchen nachweisbar; daher reichen für eine massenspektrometrische Analyse extrem geringe Probenmengen aus.

Praktisch werden massenspektrometrische Analysetechniken etwa seit den 1950er Jahren eingesetzt, zunächst nur für kleine, organische Verbindungen, wie etwa Erdgas und den flüchtigen Produkten aus Erdöl. Der Weg bis zur massenspektrometrischen Untersuchung von makromolekularen Verbindungen wie Nucleinsäuren, den Speichermolekülen der biologischen Information, und Proteinen war mühsam und lang. Das Hauptproblem der Bio-Massenspektrometrie lag darin, die biochemisch und biologisch wichtigen Makromoleküle – sie liegen im biologischen System typischerweise in wässrigen Salzlösungen vor – unzerstört ins Vakuum des Massenspektrometers zu überführen. Ein Durchbruch wurde Ende der 1980er Jahre durch die Entwicklung zweier Techniken erreicht: der Elektrospray-Ionisation und der MALDI-Technik. Während die Elektrospray-Entwicklung aus den USA stammt, wurden die grundlegenden Arbeiten zu MALDI (Matrix-Assistierte Laser Desorption Ionisation) von Prof. Dr. Franz Hillenkamp, Institut für Medizinische Physik der Universität Münster, und Prof. Dr. Michael Karas zunächst im Institut für Biophysik der Universität Frankfurt und später in Münster durchgeführt und weiter entwickelt. Beide Verfahren sind heute auf dem Gebiet der Biowissenschaften in Forschung und Industrie weit verbreitet.

Bei der so genannten Elektrospray-Ionisation (ESI) werden Lösungen der zu untersuchenden Substanzen durch elektrische Kräfte in ein extrem feines Aerosol aus hochgeladenen Tröpfchen überführt. Danach wird das Lösungsmittel auf dem Weg ins Vakuum des Massenspektrometers sukzessive verdampft, bis schließlich

freie, elektrisch geladene Molekülonen entstehen. Diese können dann getrennt und nachgewiesen werden. Einen ganz anderen Weg verfolgt die MALDI-Technik. Mit diesem sperrigen wissenschaftlichen Begriff wird eine Technik beschrieben, die die massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen und anderen Biopolymeren zu einer Routineanwendung gemacht hat. Die Geräte werden heute von verschiedenen Herstellern kommerziell angeboten.

Dreidimensionale Darstellung eines Insulin-Moleküls

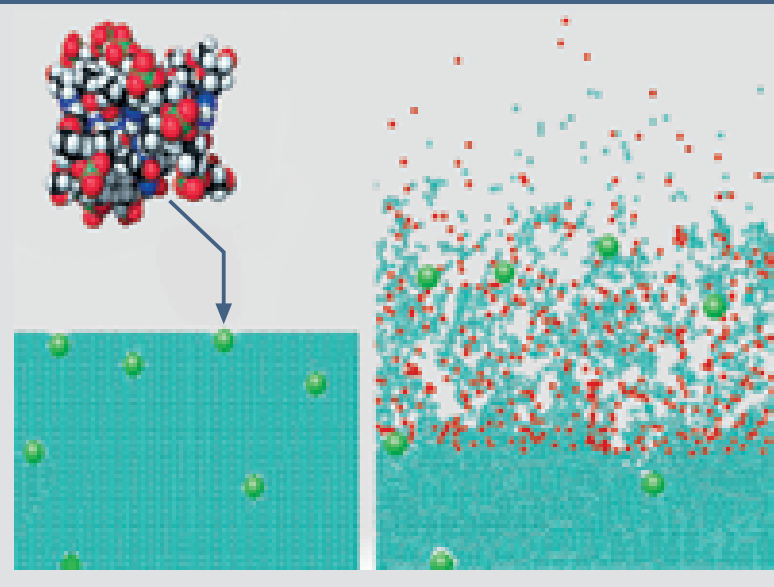


Das Insulin-Molekül in dreidimensionaler Ansicht: Das obere Bild zeigt die Verknüpfung der Atome; sie sitzen in den Verzweigungen und an den Enden der Linien. Zur chemischen Summenformel gibt das untere Bild eine andere dreidimensionale Darstellung, hier sind die einzelnen Atome als Kugeln dargestellt.

MALDI-Technik: elegant und einfach

Das Kernelement der MALDI-Technik ist ein Laser. Er erzeugt einen extrem kurzen (einige milliardstel Sekunden) und intensiven Blitz von ultraviolettem Licht, mit dem die Proteinprobe im Vakuum des Massenspektrometers, der so genannten Ionenquelle, beschossen wird. Bei direktem Laserbeschuss würde sich das häufig hitzeempfindliche Probenmaterial extrem schnell und stark aufheizen. Dieser Effekt ist bei den typischen technischen Laseranwendungen – Schneiden, Bohren, Abtragen oder Nierensteine-Zertrümmern – gewünscht, empfindliche Substanzen wie Proteine werden dadurch allerdings zerstört. Hier hilft ein physikalisch-chemischer Trick: Die hitzeempfindliche Probe wird durch einen Matrixkristall geschützt, in dem die zu untersuchenden Proteinmoleküle isoliert und sehr verdünnt vorliegen. Nach den heutigen Modellvorstellungen geht man davon aus, dass die im Kristall regelmäßig angeordneten Matrixmoleküle die Energie des Laserlichts aufnehmen (absorbieren). Das Laserlicht dringt nur sehr wenig in den Kristall ein und führt in einer dünnen oberflächennahen Schicht der Probe zu extremen mechanischen Spannungen und in der Folge zu einer Mikroexplosion, wodurch die Matrix – und damit auch das Probenmaterial in Form einer Wolke aus winzigen Partikeln und Gas – von der Kristalloberfläche ins Vakuum schleudert wird

Grafische Darstellung des MALDI-Prozesses



(Laserdesorption oder -ablation). **2** zeigt eine grafische Darstellung des MALDI-Prozesses. Dabei entstehen elektrisch geladene Moleküle (Ionen), die dann im Massenspektrometer analysiert werden können.

Durch seine technische Einfachheit, die hohe Genauigkeit der Massenbestimmung sowie die Schnelligkeit und Automatisierbarkeit der Messung ist MALDI heute ein unverzichtbares Werkzeug in der Bioanalytik. Häufig wird eine MALDI-Ionenquelle mit einem so genannten Flugzeit-Massenspektrometer (»englisch time-of-flight«, TOF) gekoppelt **3** **4**. Hauptanwendungsgebiet ist die Analyse des Proteoms, der Gesamtheit aller Proteine eines Organismus. Ohne die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wäre die stürmische Entwicklung dieses Forschungszweigs nicht möglich gewesen. Nach der Bestimmung der im Genom enthaltenen Erbinformation von zahlreichen Organismen, darunter auch des Menschen, leitet die Proteomanalyse die nächste Phase der Forschung ein. Jede Zelle eines Organismus enthält in den Nukleinsäuren des Zellkerns dieselbe genetische Information. Zu einer Haut-, Lungen- oder Leberzelle wird sie durch die unterschiedliche, selektive und spezifische Nutzung dieser Information auf der Ebene der Proteine. Da sich auch Krankheiten auf Proteinebene

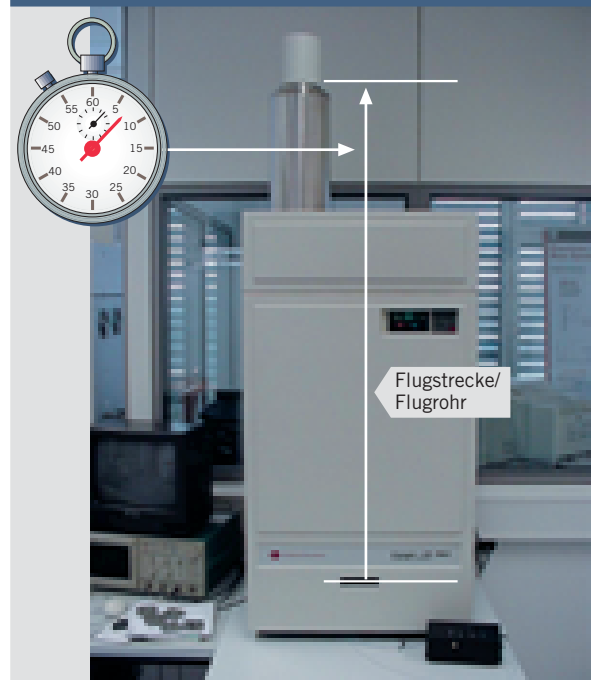
2 Grafische Darstellung des MALDI Prozesses: links vor dem Laserbeschuss, rechts nach dem Laserbeschuss. Die grünen Kugeln symbolisieren die eingebauten Analytmoleküle.

äußern, zum Beispiel durch einen fehlerhaften Aufbau oder falsche Regulation, verbinden sich mit der Kartierung der in unterschiedlichen Körperzellen gebildeten Proteine große Hoffnungen und Erwartungen für das Verständnis der Prozesse des Lebens und der Entstehung von Krankheiten.

Alternative Nachweismethode in der Entwicklung

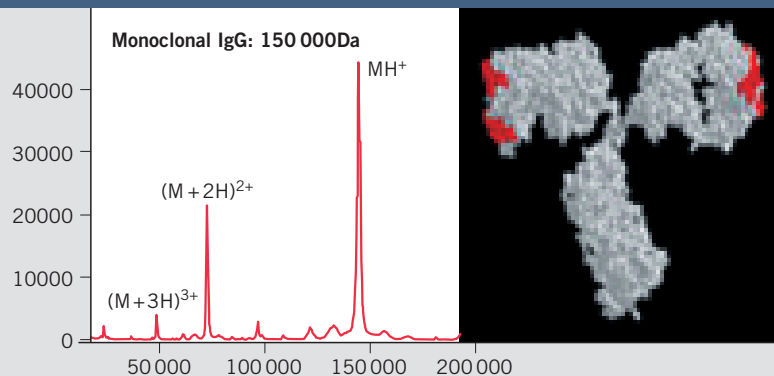
Auch etablierte Techniken, wie MALDI und ESI, lösen nicht alle analytischen Probleme. Deshalb werden alternative Methoden entwickelt. So nutzt MALDI Festkörpermatrix, um Moleküle in die Gasphase zu bringen. Im Gegensatz dazu werden in einer im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Brutschy entwickelten Nachweismethode Biomoleküle aus wässriger Lösung untersucht, also

MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer



3 Ein kommerzielles MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer (Applied Biosystems DE Pro) im Institut für Pharmazeutische Chemie. Die Flugstrecke zwischen Ionenentstehungsort und Detektor, über die die Flugzeit der Ionen ermittelt wird, ist mit dem Pfeil dargestellt.

MALDI-Flugzeit-Massenspektrum eines großen Proteins



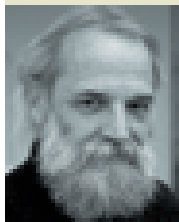
4 MALDI-Flugzeit-Massenspektrum eines monoklonalen Antikörpers mit einer molekularen Masse von zirka 150 000 Dalton. Das Massenspektrum zeigt einfach, doppelt und dreifach geladene positive Ionen; zusätzlich ist rechts die dreidimensionale Struktur des Proteins dargestellt.

in ihrer natürlichen Umgebung. Darüber hinaus sind diese in Lösung in der Regel schon elektrisch geladen (Ionen). Gelöste Ionen können aber nicht verdampft werden, da ihre Bindungsenergie um ein Vielfaches größer ist als die thermische Energie, die ihnen durch Erhitzen der Lösung zugeführt werden kann. In dem neu entwickelten Verfahren LILBID (laser induced liquid beam/bead ion desorption) werden die ionisierten Biomoleküle mit einem Trick in die Gasphase überführt, damit sie mit Standardverfahren wie der TOF-Massenspektrometrie analysiert werden können. LILBID benutzt dazu einen Infrarotlaser, mit dem die Schwingungen der Lösungsmittelmoleküle in Bruchteilen einer

Die Autoren



Prof. Dr. Bernd Brutschy, 57, studierte Physik an der Universität Freiburg und promovierte dort im Jahre 1977 mit einem Thema aus der Atomphysik. Nach einem Postdoktoranden-Aufenthalt am Hahn-Meitner-Institut in Berlin wechselte er 1979 in die Gruppe von Prof. Dr. Helmut Baumgärtel an das Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Freien Universität in Berlin. Dort beschäftigte er sich unter anderem mit Untersuchungen am Berliner Elektronen Speicherring BESSY. Im Jahre 1989 habilitierte er sich im Fach Physikalische Chemie und nahm 1992 den Ruf auf eine Professur an die Universität Frankfurt an. Von 1994 bis 1995 war er Dekan des Fachbereichs Chemie, von 1995 bis 2001 Direktor des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie und von 1998 bis 2000 Mitglied des Haushaltsausschusses der Universität. Neben seiner Forschungstätigkeit war er Gastherausgeber führender internationaler Zeitschriften der Chemie. Daneben ist er Mitglied in International Advisory Boards renommierter Institute der Akademie der Wissenschaften in Prag und Warschau. Neben der Entwicklung neuer, laserspektroskopischer Methoden zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von Molekülen und molekularen Aggregaten beschäftigt er sich vor allem mit der Erforschung schwacher, zwischenmolekularer Kräfte, die Grundlage vieler makroskopischer Eigenschaften in der Natur sind.



Prof. Dr. Michael Karas, 51, studierte Chemie an der Universität Bonn und promovierte dort 1982. Ein Jahr später wechselte er in die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Franz Hillenkamp an das Institut für Biophysik der Universität Frankfurt. Von 1987 bis 1994 war er an der Universität Münster tätig, wo er gemeinsam

mit Franz Hillenkamp die in Frankfurt begonnenen Arbeiten zur MALDI-Technik vorantrieb. Dort habilitierte er sich 1992 im Fach Physikalische Chemie. Seit 1995 ist Michael Karas Professor an der Universität Frankfurt, zuerst im Fach Chemie, seit 2001 im Institut für Pharmazeutische Chemie. Seit 2002 ist er darüber hinaus stellvertretender Direktor des Zentrums für Membrane Proteomics. Für seine innovativen methodischen Entwicklungen wurde Michael Karas mehrfach ausgezeichnet, darunter gemeinsam mit Franz Hillenkamp mit dem »Award for a Distinguished Contribution in Mass Spectrometry« der American Society for Mass Spectrometry 1997. Im Jahr 2000 wurde dem Forscherduo der mit 100 000 DM dotierte »Award for Molecular Bioanalytics« von der Deutschen Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie zuerkannt, 2003 unter anderem der Fresenius-Preis der Gesellschaft Deutscher Chemiker und der Karl Heinz Beckurts-Preis.

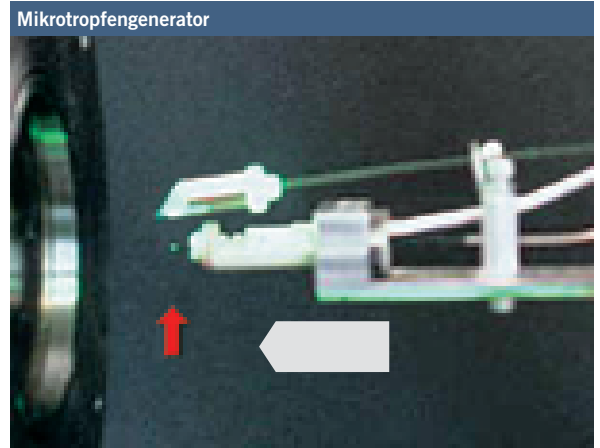
Im Jahr 2002 wurden die Entwicklungen auf dem Gebiet der Massenspektrometrie mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt. Den Preis erhielten der Amerikaner Prof. Dr. John Fenn für die Elektrospray-Ionisation und der Japaner Prof. Dr. Koichi Tanaka, der eine alternative, aber heute praktisch nicht genutzte Methode der Laser-Massenspektrometrie entwickelt hatte. Das von Michael Karas und Franz Hillenkamp in Frankfurt und Münster entwickelte MALDI-Verfahren, das als einziges Laserdesorptionsverfahren weltweit angewendet wird, wurde zwar vom Nobelkomitee ausdrücklich gewürdigt, aber zum Unverständnis vieler Fachkollegen bei der Vergabe des Preises nicht bedacht.

Anzeige

Anzeige 06 Varian Deutschland

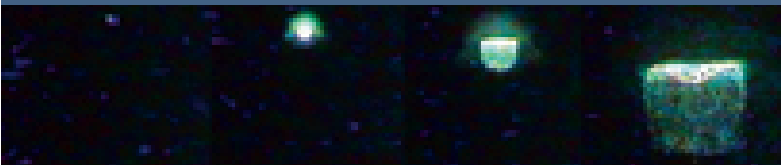
186 x 128

millionstel Sekunde angeregt werden. Da der Laser in der Lage ist, eine Lichtleistung in der Größenordnung der Leistung des Biblis B-Reaktors innerhalb weniger milliardstel Sekunden auf einem Brennpunkt von einem Quadratmillimeter zu erzeugen, wird die Flüssigkeit sprunghaft um mehrere hundert Grad Celsius erhitzt, wobei sich der Binnendruck in der Flüssigkeit um mehrere hundert Bar erhöht. Die beobachtete Aufheizgeschwindigkeit ist gewaltig und beträgt etwa 10^{11} Kelvin pro Sekunde. Danach verhält sich die Flüssigkeit nicht mehr wie eine Flüssigkeit, sondern wie ein hochkomprimiertes Gas, das im Vakuum im wahren Sinne des Wortes explodiert. Durch die eingebrachte Energie gerät die Wasserschutzhülle in große Unordnung, wodurch die Abschirmung der Ionen stark verringert wird. Dies führt zu ihrer gegenseitigen Neutralisation. Damit sind sie für einen Ladungsdetektor nicht mehr nachweisbar. Dennoch gelingt es etwa jedem zehntausendsten Ion, sich durch die Explosion so schnell von seinem



5 Mikrotropfchen (roter Pfeil), erzeugt mit einem Tropfengenerator und mit einem grünen Nanosekundenlaserblitz sichtbar gemacht. Durch Überstrahlung entsteht ein vergrößertes Abbild.

Stroboskopische Aufnahme eines explodierenden Mikrotropfchens



6 Phasen des explodierenden Tröpfchens nach Beschuss durch einen Infrarotlaserpuls: Zwischen jedem Bild verstreicht eine millionstel Sekunde. Das Tröpfchen wurde stroboskopartig von einem grünen Laser beleuchtet. Am Anfang hat es eine Größe von 50 Mikrometern am Ende von etwa zwei Millimetern.

Gegenion zu entfernen, dass es in die Gasphase entkommt und dort als geladenes Teilchen nachgewiesen werden kann.

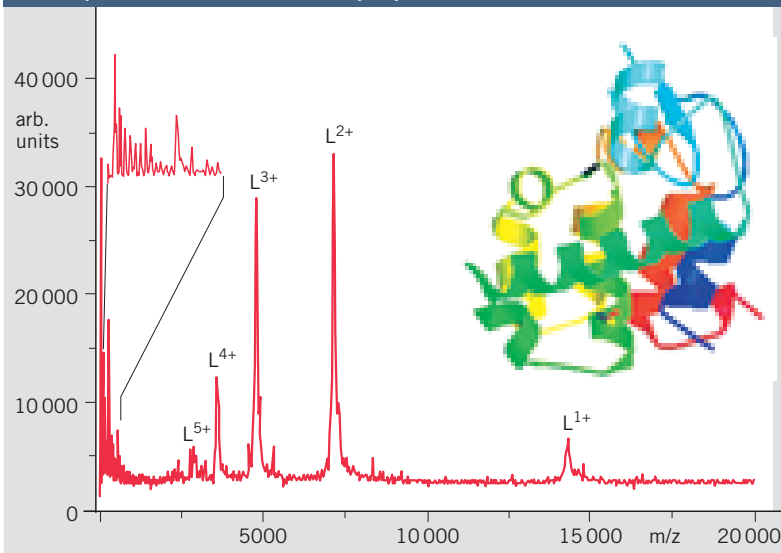
Das Hauptproblem bei der Entwicklung dieses Verfahrens war, dass sich Vakuum und Flüssigkeit in der Regel gegenseitig ausschließen. Im Vakuum sieden Flüssigkeiten spontan, wodurch das Vakuum schlagartig zusammenbricht. Dieses Problem kann man umgehen, wenn man einen ultrafeinen Flüssigkeitsstrahl (Durchmesser etwa ein Fünftel von normalem Haar) mit großer Geschwindigkeit (100 Meter pro Sekunde) direkt in das Vakuum einschießt und wenig später an einer gekühlten Oberfläche ausfriert. Wegen des gepulsten

Lasers wird hierbei allerdings nur etwa der hunderttausendste Teil der Flüssigkeit analysiert, der Rest bleibt ungenutzt. Dies ist insbesondere bei teuren Biomolekülen ein Riesennachteil.

Eine wesentlich verbesserte Variante von LILBID nutzt feine Mikrotropfen mit 50 tausendstel Millimetern Durchmesser, wie sie auch in Tintenstrahldruckern benutzt werden 5. Die Tropfen haben ein Volumen, das etwa dem zwei millionsten Teil des makroskopischen Wassertropfens in Abbildung auf Seite 12 entspricht. Sie sind nur im Mikroskop sichtbar. Typischerweise werden pro Sekunde zehn dieser Tröpfchen ins Vakuum eingeschossen. Dort sorgt ein synchron gepulster Infrarotlaser für ihre Explosion, wobei Ionen aus der Lösung ins Vakuum gelangen. Phasen dieser Explosion sind in 6 dargestellt.

Wenige Tröpfchen genügen für eine Analyse. So zeigt 7 ein LILBID-Massenspektrum eines Proteins mit unterschiedlichen Ladungszuständen. Das Verfahren arbeitet sehr sanft. Schwach gebundene Biomoleküle wie Hämoglobin, das Trägermolekül für den Sauerstofftransport im menschlichen Körper, können noch unfragmentiert nachgewiesen werden. Erhöht man die Laserenergie, zerfallen solche schwach gebundenen Komplexe in ihre chemischen Untereinheiten. Damit kann man mit dem Laser sofort überprüfen, wie stark die Komplexe gebunden sind. Das Verfahren befindet sich noch in der Entwicklungs- und Erprobungsphase. Sein zukünftiges Anwendungspotenzial ist in Verbindung mit Mikroanalyseverfahren zu sehen, die gegenwärtig weltweit entwickelt werden. Ihr Ziel ist es, durch einen hohen Automatisierungsgrad schnellere, genauere und kostengünstigere Analysen durchführen zu können, wie sie beispielsweise in der Gesundheitsfürsorge – etwa bei der Analyse von Blut – benötigt werden. ♦

Massenspektrum für das Antibiotikum Lysozym



7 Massenspektrum, aufgenommen für ein einzelnes Wassertropfchen, in dem das Antibiotikum Lysozym in sehr geringer Konzentration enthalten ist. Man erkennt unterschiedliche Ladungszustände (1^+ bis 5^+). Die durch Röntgenbeugung bestimmte Struktur des Makromoleküls ist in dem Einschub dargestellt.