

MICHAEL LINSCHIED

Strukturanalytik und Umweltchemie

Alle natürlichen Biopolymere bestehen nicht nur aus Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff, sondern sie enthalten weitere Elemente wie Schwefel, Phosphor und Selen. Diese können als Indikator zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden; zur Verbesserung der Nachweisstärke markieren wir Biopolymere chemisch mit Lanthaniden. Daher entwickeln wir chemische Markermoleküle sowie die Anwendung von Elektrosprayionisation (ESI), Massenspektrometrie (MS) und der leistungsfähigen Element(ICP)-MS für eine zuverlässige quantitative Bestimmung von Peptiden, Proteinen und DNA-Oligomeren.

Allgemeine Einführung in das Fachgebiet

In den zurückliegenden Jahren hat sich die Biologie in weiten Teilen in eine »molekulare« Wissenschaft verwandelt, das heißt diese Forschung befasst sich auf molekularer Ebene mit den Abläufen in Zellen und Geweben. Damit war sofort die biologische Chemie auf den Plan gerufen, da viele biologische Prozesse nur durch die detaillierte Kenntnis der zugrundeliegenden chemischen Abläufe verstanden werden können. Es wurde schnell klar, dass ein wirkliches Verständnis dieser Abläufe nur durch eine quantitative Beschreibung möglich ist. Das Verständnis des biologischen Systems im Vergleich unterschiedlicher Spezies oder Randbedingungen macht dies unabdingbar, denn Unterschiede sind sehr häufig nur durch unterschiedliche Mengen charakterisiert, nicht in vollständig anderen Abläufen. Damit wurden Methoden bedeutsam, die diese Unterschiede zuverlässig darstellen können.

Da die MS zu einer der Schlüsselmethoden in der Biologie geworden ist, war die Entwicklung quantitativer MS-Verfahren der nächste Schritt. Dies aller-

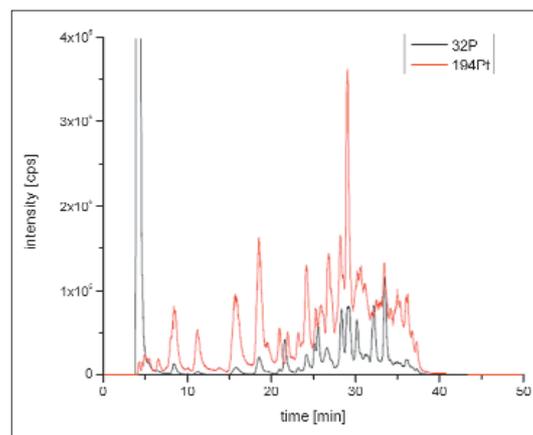


Abb. 1

Chromatografische Trennung von cis-Platin modifizierten Nucleotiden; schwarz: Phosphorspur (= alle Nucleotide), rot: Platinspur (= nur modifizierte Nucleotide). (nach M.Ziehe et al., IMSC 2009, Bremen)

dings ist eine Herausforderung, da die MS vor allem in Verbindung mit Trennmethode schwierig quantitativ zu machen ist. Die Anwendung von Isotopen, was in der Element-MS seit langem praktiziert wird, brachte hier den entscheidenden Durchbruch. Es werden isotonenmarkierte Verbindungen mit den unmarkierten, natürlichen Verbindungen gemischt

Internet

www.chemie.hu-berlin.de/linschied

Abstract

All natural biopolymers contain aside from hydrogen, carbon, oxygen and nitrogen heavier elements such as sulfur, phosphor or selenium. Those elements can be taken as indicators for quantitative measurements using an appropriate detection technique. To enhance the detection capabilities, we label biopolymers chemically with the lanthanides. Thus, we develop chemical tags which allow the application of electrospray and for quantification the element specific ICP-MS which allows for reliable quantitative determination of peptides, proteins and DNA-oligomers at very low detection limits.



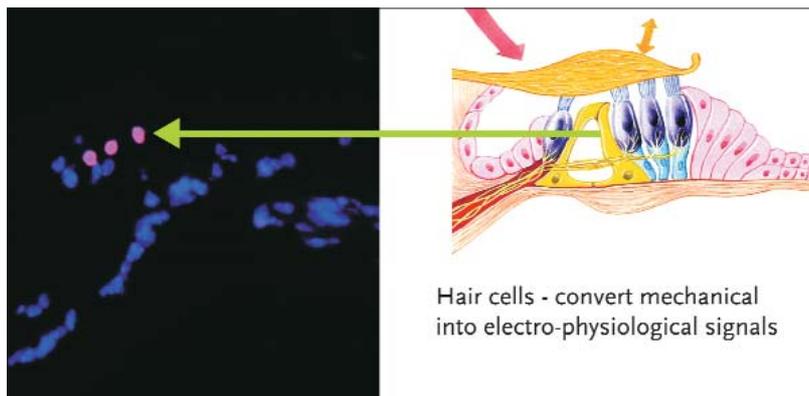
Dr. Michael Linscheid, Professor für Angewandte Analytik und Umweltchemie am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin

und mit diesen zusammen analysiert. Da sie sich in der Masse unterscheiden, nicht aber im chemischen oder physikalischen Verhalten, ist ein Mengenvergleich beider – der markierten und der natürlichen Verbindung – durch ihre MS-Daten zuverlässig möglich. Mit Techniken dieser Art wurde eine Revolution im Verständnis der biochemischen Prozesse in Zellen ausgelöst, deren Auswirkungen bisher noch nicht wirklich absehbar sind.

Forschungsprojekte

Die Kombination von ESI- und ICP-MS hat sich insofern als besonders leistungsfähig herausgestellt, als mittels ESI-MS und auch ESI-MS/MS-Techniken (Fragmentierung ausgewählter Ionen) solche komplexe Strukturen wie die von Proteinen, Peptiden oder auch DNA-Oligomeren – allgemein Biologomere genannt – sich strukturell untersuchen lassen, während die ICP-MS besonders zur Quantifizierung geeignet ist. Daher haben wir diese Kombination zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von modifizierten Oligonukleotiden verwendet, wobei sich die quantitative Bestimmung auf die in diesen Molekülen selteneren Elemente wie Phosphor, Schwefel und Selen stützen kann. Sollten sich weitere Elemente anbieten wie z.B. im Falle der Modifikation durch platinhaltige

Krebsmedikamente, kann auch das Platin als Marker quantitativ mit sehr guter Nachweisstärke herangezogen werden. Wir konnten so auch sehr kleine Konzentrationen eines modifizierten Nucleotids in Gewebeproben nachweisen (Abb. 1). In einer Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Essen wollen wir die Strukturen nachweisen, die ein dort entwickelter Antikörper in DNA erkennt. Der Antikörper selbst ist in Gewebeschnitten durch Fluoreszenz sichtbar zu machen (Abb. 2).

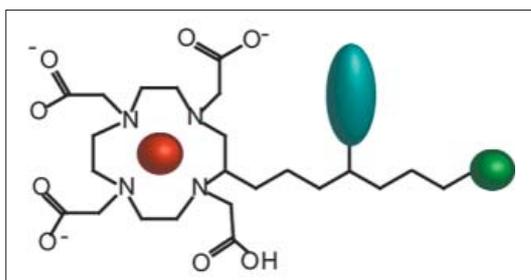


Darüber hinaus können wir – in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe der BAM – durch Laserverdampfung kombiniert mit ICP-MS in den Gewebeschnitten die Verteilung von Platin in weiteren Kompartimenten untersuchen und damit einen Beitrag zum Verständnis des Verbleibs eines großen Anteils des Medikamentes leisten.

In einem weiteren Projekt widmen wir uns der quantitativen Bestimmung von Proteinen. Proteine lassen sich nur sehr schwer wirklich absolut genau quantifizieren, da sie von sehr unterschiedlichem Charakter sein können. Dies betrifft ihre molekulare Größe, ihre Löslichkeit in Wasser oder Membranen, ihre Ladungszustände und die Ionisierbarkeit im MS. Dazu treten sie in extrem unterschiedlichen Mengen auf, was ihre Bestimmung sehr erschwert.

Abb. 2
Cartoon des Gewebes und Gewebeschnitt: Die rotgefärbten Punkte zeigen durch fluoreszierende Antikörper Positionen in der DNA an, die durch cis-Platin modifiziert sind; blaugefärbt wurde die DNA selbst. Die Probe stammt aus Haarzellen, die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von J. Thomale, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt. Die Abbildung stammt aus einem gemeinsamen Tagungsbeitrag: M. Ziehe et al, IMSC 2009, Bremen.

Abb. 3
Schematische Struktur des Moleküls zur Markierung mit Lanthanid-Komplexen;
rot: mögliche Lanthanid-Ionen (Ho^{3+} , Tm^{3+} usw.);
blau: Anker mit Biotin (optional);
grün: SH-reaktive Gruppe (Maleimid, Iodessigsäureamid).



Für die Quantifizierung sind wir nun einen neuen Weg gegangen, indem wir Lanthanid-Komplexe kovalent an die Proteine oder Peptide anbringen. Dies geschieht mit einer Verbindung, die einerseits den Lanthanid-Komplex trägt und am anderen Ende einer Kette, die zur Flexibilisierung beitragen soll, eine reaktive Gruppe enthält, die wiederum mit einer aktiven Aminosäure im Protein oder Peptid reagieren kann. Bisher haben wir meist die Cysteine als Anker-Aminosäure ausgewählt, da diese die reaktive Sulfidgruppe enthalten (Abb. 3). Möglich ist aber auch zum Beispiel, die Aminogruppen zu adressieren. Diese Konstruktion erlaubt es, zusätzlich noch einen weiteren Anker in dem Molekül anzubringen, mit dem der gesamte Komplex aus einer Mischung angereichert werden kann. Biotin ist dazu ein weit-

hin gebrauchter »Affinitätsanker«, da das Biotin auf geeigneten Säulen bindet und dann, nachdem alle Begleitstoffe entfernt wurden, von diesen Säulen gereinigt abgenommen werden kann.

Warum verwenden wir Lanthanide? Lanthanide haben den Vorteil gegenüber anderen Metallen, dass sie in der belebten Natur sehr selten sind, mit ICP-MS aber in äußerst kleinen Konzentrationen gemessen werden können. Damit haben wir bei der Messung keinen störenden Untergrund aus den Proben und da vor allem das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis entscheidend für die Nachweisstärke eines Verfahrens ist, gewinnen wir mit dieser Wahl entscheidende Vorteile.

So können wir selbst komplexe Proteingemische aus Geweben, Hefen oder Bakterien, die sogenannten Proteome, nach der Markierung mit den Lanthanid-Komplexen in einem dünnen Gel mit Hilfe der Gel-Elektrophorese auftrennen, wichtige kleine Bereiche (»Spots«) auswählen, diese ausstechen und in diesen dann die markierten Proteine empfindlich nachweisen (Abb. 4). Wenn wir zwei unterschiedliche Proben (z.B. zwei Gewebe, die verschie-

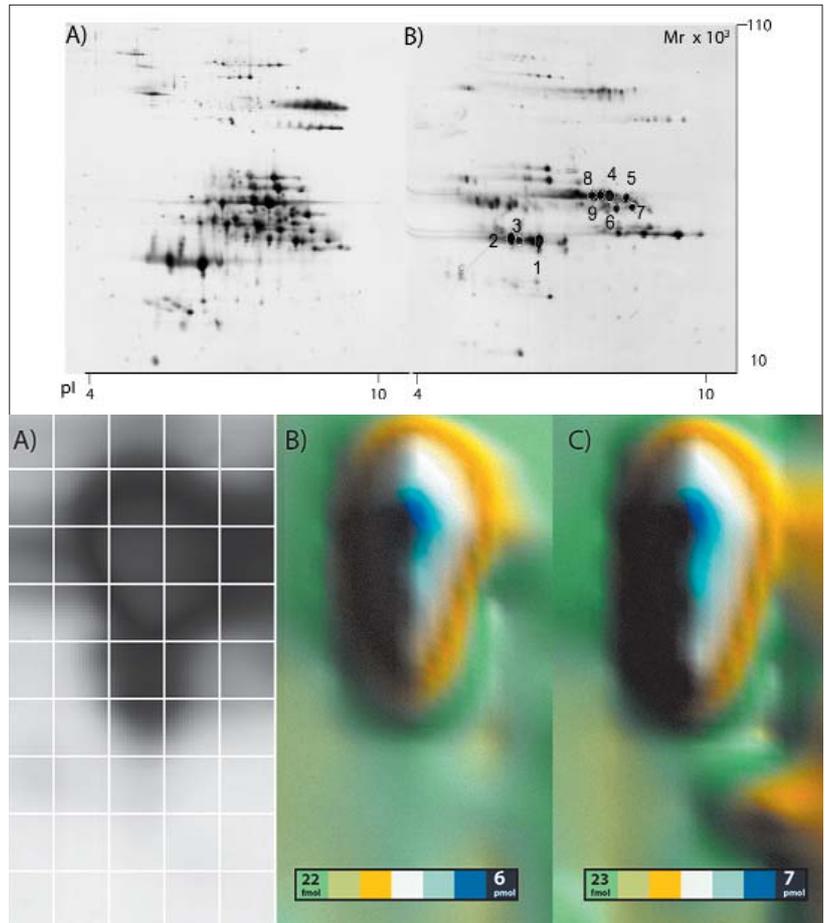
Kooperationen

- BAM – Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung: Quantitative Bestimmung von Proteinen; Metallmarkierung von Antikörpern; Bildgebende MS-Verfahren.
- BFR – Bundesanstalt für Risikobewertung: Charakterisierung von Bdellovibrionen, DFG-Projekte.
- Charité – Dermatologische Klinik: Verhalten von Stoffen auf und bei der Penetration durch die Haut.
- Universitätsklinikum Essen: Charakterisierung von DNA-Addukten von Cytostatica sowie von Antikörpern gegen DNA-Strukturen, DFG-Projekte.
- Universitätsklinikum Hamburg: Untersuchungen zur Substraterkennung von Proteasen.
- Proteome Factory: Entwicklung von Metallmarkierungen, gemeinsame Patente.
- Protekum Umweltinstitut, Oranienburg: Modifizierung von organischen Schadstoffen in der Untergrundpassage, BMBF-Projekt.
- National Research Centre Cairo: Strukturbestimmung von Naturstoffen der Volksmedizin.

den behandelt wurden oder zwei unterschiedliche Bakterienstämme) vergleichen wollen, wird jede mit einem anderen Lanthanid markiert. Da wir die beiden Metalle im ICP-MS gleichzeitig messen können, lassen sich die Signale für beide Metalle ins Verhältnis setzen und genau miteinander vergleichen. Auf dieser Basis können wir dann angeben, welche Proteine mehr oder welche weniger wurden. Wenn wir einen Standard zufügen, dessen Menge genau bekannt ist, können wir sogar die genauen Mengen in Gramm (bzw. nano-Gramm) angeben.

Glücklicherweise haben einige dieser Lanthanide nur ein einziges stabiles »Isotop«, d.h. im Massenspektrometer ergeben diese nur ein einziges Signal. Damit sind diese besonders attraktiv auch für Messungen der gesamten Moleküle mittels Elektrospray-MS, da sie die ohnehin komplexen Spektren nicht weiter komplizieren. Für die quantitativen ICP-MS-Messungen allerdings haben die Lanthanide mit mehreren Isotopen den Vorteil, dass mit Hilfe von bekannten Isotopverteilungen eine sehr exakte Messung der Mengen möglich wird. Dieses Verfahren, Isotopenverdünnungsanalyse genannt, zählt zu den präzisesten Messverfahren in der analytischen Chemie überhaupt.

Für uns ist aber neben den quantitativen Informationen ebenso wichtig, das massenspektrometrische Verhalten von großen und komplexen Molekülen in der Gasphase zu verstehen, damit Rückschlüsse auf die Strukturen möglich werden. Daher untersuchen wir einerseits das Verhalten von Ionen in der Gasphase, was vor allem möglich ist, wenn diese z.B. durch Stöße oder durch Laserlicht zum Fragmentieren gebracht werden können. Aus dem Verhalten während der Fragmentierung lassen sich wertvolle Rückschlüsse auf die Strukturen erhalten. Dabei ist es von großer Bedeutung, die richtigen Experimente



zur richtigen Zeit auswählen zu können und mit diesen Strategien beschäftigt sich die Arbeitsgruppe.

Ausgewählte Publikationen

- Mohamed, D., et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, 22, 1435–46.
- Schlüter, H., et al., *Anal. Chem.*, 2007, 79, 1251–5.
- Ahrends, R., et al., *Mol. & Cell. Proteom.*, 2007, 6, 1907–16.
- Edler, M., N. Jakubowski, and M. Linscheid, *J Mass Spectrom.*, 2006, 41, 507–16.

Prof. Dr. Michael Linscheid

Jg. 1948. 1972 Diplom; 1975 Promotion, Universität Köln bei H. Budzikiewicz; 1980 Postdoc, University Berkeley, Ca., USA; 1981 Leiter AG Organische Analyse, ISAS Dortmund; 1991 Tit. Member, IUPAC Comm. V.2 (Micro/Trace Analysis); 1992 Vorsitzender der AGMS; 1993 STA Fellow, Tsukuba, Japan; 1995 Habilitation, Universität Köln; 1998 Professor für Angewandte Analytik und Umweltchemie, Humboldt-Universität zu Berlin; 2002–04 Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der HU Berlin; 2004–05 komm. Direktor des Museums für Naturkunde; 2007–10 Vizepräsident für Forschung der Humboldt-Universität zu Berlin; 1998–2011 Mitglied in versch. Kommissionen der DFG; 2005 Life Science Preis der DGMS; European Editor des *J. Mass Spectrom.*; Beiratsmitglied. Abt. Analytische Chemie der BAM; Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie; Kuratoriumsmitglied des Fraunhofer PYCO, Teltow.

Humboldt-Universität zu Berlin • Institut für Chemie

E-Mail: m.linscheid@chemie.hu-berlin.de • www.chemie.hu-berlin.de/linscheid

Abb. 4
Oben der Vergleich zweier 2-dimensionaler elektrophoretischer Trennungen (»2D-Gelelektrophorese«) eines Gemisches (»Proteoms«) von Proteinen aus Augenlinsen des Schweins in natürlichem (A) und in Lanthanid-markiertem Zustand (B); unten ein einzelner Fleck daraus in schwarzer Silberfärbung (A); das Raster zeigt an, wie das Gel dieses Fleckes in einzelne Bereiche aufgeteilt und dann auf die Konzentration zweier Lanthanidionen hin (B: Lu, C: Tm) vermessen wurde; die Konzentrationen (wenige fmol) sind als Höhenprofil dargestellt. (nach R. Ahrends et al., 2007)