

Ortsaufgelöste MALDI- Massenspektrometrie an biologischen und synthetischen Oberflächen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Justus-Liebig-Universität Gießen

(Fachbereich Biologie, Chemie, Geowissenschaften)

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Werner Bouschen

Gießen, im März 2004

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Spengler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bruno Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2004

Es gibt eine Theorie, die besagt, wenn jemals irgendwer genau rausfindet,
wozu das Universum da ist und warum es da ist,
dann verschwindet es auf der Stelle und
wird durch etwas noch Bizarreres und Unbegreiflicheres ersetzt.

Es gibt eine andere Theorie, nach der das schon passiert ist.

Douglas Adams

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----|---|-----|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 2 | Grundlagen der Massenspektrometrie | 9 |
| 2.1 | Desorptions- und Ionisationsmethoden | 10 |
| 2.2 | Massenanalysatoren | 15 |
| 2.3 | Ionennachweis | 24 |
| 2.4 | Mikrosonden-Techniken | 25 |
| 2.5 | MALDI-MS | 28 |
| 2.6 | Scanning-Mikrosonden-MALDI-MS | 33 |
| 3 | Instrumentierung | 37 |
| 3.1 | Lamma 2000 | 38 |
| 3.2 | Aladim II | 49 |
| 3.3 | Bedampfungsanlage | 53 |
| 4 | Bildverarbeitung von Massenspektren | 55 |
| 4.1 | Datenaufnahme und Datenverarbeitung | 56 |
| 4.2 | Dreidimensionale Massenspektrometrie | 63 |
| 5 | Grundlagenuntersuchungen zu Präparationsmethoden für SMALDI-MS an Oberflächen | 79 |
| 5.1 | Standardpräparationen für MALDI-MS | 83 |
| 5.2 | Sprühmethoden | 94 |
| 5.3 | Bedampfungsmethoden | 105 |
| 6 | Anwendungsbeispiele SMALDI-MS | 119 |
| 6.1 | Untersuchungen an MALDI-Präparationen | 120 |
| 6.2 | Funktionalisierte Siliziumoberflächen | 125 |
| 6.3 | Gewebeschnitte mit LDI-MS | 137 |
| 6.4 | Einzel-Zell-Analytik | 141 |
| 7 | Zusammenfassung und Ausblick | 151 |
| | Abbildungsverzeichnis | 153 |
| | Tabellenverzeichnis | 157 |
| | Literaturverzeichnis | 159 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| ALADIM II | Advanced Laser Desorption Ionization Mass Spectrometer II |
| CHCA | α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure |
| CID | Collision-Induced Dissociation |
| DE | Verzögerte Extraktion (delayed extraction) |
| DHB | 2,5-Dihydroxybenzoesäure |
| DIOS | Desorption Ionisation on Silicon |
| EI | Elektronen-Stoß-Ionisation |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| FT-ICR-MS | Fourier-Transformations-Ionen-Zyklotron-Resonanz Massenspektrometer |
| FWHM | full width at half maximum |
| HPLC | High Pressure Liquid Chromatography |
| LAMMA | Laser Mikrosonden Massenanalysator |
| LDI-MS | Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie |
| LMMS | Laser-Mikrosonden-Massenspektrometrie |
| MALDI-MS | Matrix-assistierte Laserdesorptions-Ionisations- Massenspektrometrie |
| MCP | Mikrokanalplatte (microchannel plate) |
| PSD | Post-Source Decay |
| SA | Sinapinsäure |
| SIMS | Sekundärionen-Massenspektrometrie |
| SMALDI-MS | Scannende Mikrosonden Matrix-assistierte Laserdesorptions- Ionisations-Massenspektrometrie |

| | |
|---------|--|
| SNOM | Rasternde Nahfeld Mikroskopie (Scanning near field microscopy) |
| TI | Thermische Ionisation |
| TOF | Flugzeit (Time-Of-Flight) |
| UIT | Ulisses Imaging Tool |
| ULISSES | Universal laser ionization spectrometry system`s evaluation software |

1 Einleitung

Das zunehmende Interesse an der Untersuchung der Gesamtheit der Stoffe, die in einem biologischen Objekt wie einer Zelle oder gar einem weit komplexeren Organismus wie z. B. dem Menschen vorkommen, hat die Massenspektrometrie in den letzten 15 Jahren in den Mittelpunkt der biologischen und biomedizinischen Forschung gerückt. Die Aufklärung des Genoms eines Organismus ist die Voraussetzung um ein Verständnis für den Aufbau der Natur erlangen zu können. Allerdings ermöglicht erst das Wissen über das Proteom, da dieses vom aktuellen Zustand des Organismus abhängt, die komplexen Zusammenhänge innerhalb z.B. einer Zelle verstehen und kontrollieren zu können. Die molekulare Masse solcher Biomoleküle, die in der Natur eine entscheidende Rolle spielen, stellt eine wichtige Messgröße auf dem Weg zur Strukturaufklärung von Biomolekülen dar. Die rasant steigende Nachweisempfindlichkeit moderner Massenspektrometer macht nun kleinste Probenmengen messbar, wie sie auch von der Natur innerhalb biologischer Systeme eingesetzt werden. Inzwischen lassen sich die Masse und auch die Struktur von Biomolekülen wie z.B. Proteinen, Peptiden, Oligosacchariden oder Oligonucleotiden mit Probenmengen kleiner als 1 fmol mit einer sehr großen Richtigkeit (Fehler 1-2 ppm) in der Masse bestimmen. Entscheidend hierfür war die Entwicklung neuer „sanfter“ Ionisationsmethoden wie der Matrix-Assistierten Desorptions-Ionisation (MALDI) [1] und der Elektrospray-Ionisation (ESI) [2] in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts, die die Möglichkeit bieten große biologisch relevante Moleküle intakt zu desorbieren, zu ionisieren und mit ausreichender Empfindlichkeit nachzuweisen. Die Desorption großer Biomoleküle aus der Festphase [3] sowie die Elektrospray-Ionisation [2] wurden mit dem Nobelpreis für Chemie 2002 bedacht. Durch die Verwendung von Fragmentierungsverfahren wie z.B. Post-Source Decay (PSD) [4] oder Collision-Induced Dissociation (CID) [5], bei dem die Fragmentierung von Biomolekülen gezielt eingesetzt wird, können auch die Primärstrukturen massenspektrometrisch aufgeklärt werden.

Die hohe Komplexität eines lebenden Organismus macht zunächst eine Auftrennung und Extraktion mit z.B. der 2D-Gelelektrophorese oder der High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) der Biomoleküle notwendig, um anschließend

eine Identifizierung durchführen zu können. Die Extrakte aus solchen Aufarbeitungen können auch dann noch eine sehr hohe Komplexität aufweisen, so dass nur ein Teil der tatsächlichen Bestandteile der Probe mit der Massenspektrometrie aufgelöst nachgewiesen werden kann.

Ein weiterer Ansatz besteht darin, sich aus der Vielzahl der Komponenten einen signifikanten Satz von Proteinen herauszufiltern, die für den Zustand des Systems (aktiv - inaktiv, krank - gesund) typisch sind, statt die Zusammensetzung eines solchen Systems in seiner Vollständigkeit zu erfassen. Über ein solches „differenzielles Profiling“ können dann äußere Einflüsse auf den Organismus studiert werden.

Die Laser-Mikrosonden-Massenspektrometrie (LMMS) [6] ist eine seit mehr als 25 Jahren eingesetzte Methode um einer Probe lokalisierte chemische Informationen zu entnehmen und so biologische und synthetische Oberflächen zu analysieren und zu charakterisieren. Allerdings blieb diese Charakterisierung bislang auf die Elementanalytik bzw. auf den Nachweis kleiner Moleküle begrenzt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine neue Methode der mikroskopischen, bildgebenden Massenspektrometrie, aufbauend auf einer Kombination der „sanften“ Ionisationsmethode MALDI mit der rasternden Mikrosonden-Analytik von Oberflächen. Dabei wird die Abbildung von molekularen Konzentrationsverteilungen mit lateralen Auflösungen im Sub-Mikrometerbereich möglich. Gleichzeitig ist eine Erfassung und Darstellung der dreidimensionalen Topologie der Probe möglich.

Die Dissertation gliedert sich in vier Teile. Der erste Teil gibt einen Überblick über die Entwicklungen und die Grundlagen der Massenspektrometrie, den Desorptions/Ionisations-Mechanismus bei der MALDI-MS und die Mikrosondenmassenspektrometrie. Anschließend werden die primär verwendeten Instrumente vorgestellt und der Laserstrahldurchmesser als ein Parameter für die Laser-mikrosondenmassenspektrometrie charakterisiert. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Aufarbeitung und Interpretation der Daten, die mit der rasternden Massenspektrometrie erzeugt werden. Dazu wurde ein Programm zur Bilderstellung aus diesen Daten entwickelt. Darauf aufbauend wird erläutert, wie aus den gewonnenen Daten die dreidimensionale Topologie der Probe gewonnen

werden kann. Im dritten Teil werden die wichtigsten Grundlagen und Methoden vorgestellt, die nötig sind um eine Oberfläche für die rasternde Mikrosonden MALDI MS (SMALDI MS) zu präparieren. Dabei werden zuerst ausgewählte Aspekte der MALDI-Präparation untersucht und danach zwei Methoden der Präparation vorgestellt. Abschließend stellt der letzte Teil Beispiele zu Anwendungsfeldern der SMALDI Massenspektrometrie vor.

2 Grundlagen der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode, um Atome und Moleküle im Vakuum anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses zu trennen und zu analysieren bzw. zu identifizieren. Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten des Aufbaus von Massenspektrometern. Dabei ist jedes Massenspektrometer grundsätzlich aus drei Teilen aufgebaut, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor.

In der Ionenquelle werden die Atome oder Moleküle in die Gasphase überführt und ionisiert. Anschließend werden sie durch einen Massenanalysator geführt, in welchem sie mithilfe elektrischer und/oder magnetischer Felder nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis räumlich oder zeitlich getrennt werden. Wie aus den Maxwell-Gleichungen ersichtlich ist, ist es nicht möglich aus den Bewegungen der Ionen ihre Masse zu bestimmen, sondern nur das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Eine Bestimmung der Masse wird nur möglich, indem man zusätzliche Informationen wie z. B. das Isotopenmuster zur Bestimmung der Ladungszahl heranzieht. Durch das in dieser Arbeit eingesetzte Ionisierungsverfahren werden allerdings fast ausschließlich einfach geladene Ionen erzeugt und damit entspricht das gemessene m/z -Verhältnis in aller Regel der Masse des Moleküls.

Anschließend bestimmt der Detektor das Masse/Ladungsverhältnis, sowie die Häufigkeit der Ionen.

2.1 Desorptions- und Ionisationsmethoden

Um in der Ionenquelle die zu analysierenden Atome bzw. Moleküle in die Gasphase zu überführen, wird diesen Energie zugeführt. Diese Übertragung von Energie muss allerdings derart geschehen, dass die Moleküle anschließend in der Gasphase nicht vollständig in ihre atomaren Bestandteile fragmentieren. Allerdings kann ein gewisser Grad an Fragmentierung gewünscht sein, um so strukturelle Informationen über den Analyten zu bekommen. Gleichzeitig muss das Molekül ionisiert werden, da nur so eine Massentrennung möglich wird. Die Ionisierung erfolgt entweder durch das Entfernen von Elektronen (Radikalionenbildung) aus der Valenzschale der Moleküle oder durch eine Säure/Base Reaktion bei der Protonen chemisch an den Analyten gebunden oder von ihm entfernt werden.

Die historisch ersten Ionisierungsverfahren waren die Thermische Ionisation (TI) [7] und die Elektronen-Stoß-Ionisation (EI) [8]. Bei der thermischen Ionisation wird der Probe durch Erhitzen Wärmeenergie zugeführt und so der Analyt in die Gasphase „verdampft“. Durch das Abspalten eines Elektrons wird der Analyt ionisiert. Da die Ionisierungswahrscheinlichkeit nur sehr gering ist, muss eine relativ große Menge der Probe verdampft werden. Außerdem sind Moleküle größtenteils instabil, und somit ist die Methode nur zur Analyse von Atomen oder sehr stabilen, kleinen Molekülen geeignet. Bei der Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrometrie (EI-MS) werden die bereits gasförmigen Teilchen mit einem Elektronenstrahl beschossen und dadurch ionisiert. Die Probe ist entweder gasförmig oder wird thermisch in die Gasphase gebracht. Die kinetische Energie der Elektronen liegt bei 50 – 100 eV, typisch sind 70 eV. Die durch einen inelastischen Stoß mit den Gasteilchen übertragene Energie reicht aus, um die meisten Atome und Moleküle zu ionisieren. Dabei entsteht ein Radikalion, das allerdings durch die relativ starke Anregung meist instabil ist. Bei dieser „harten“ Ionisierung wird nur ein Massenbereich von einigen 100 u zugänglich, allerdings kann durch Fragmentierung eine Strukturaufklärung stattfinden. Elektronenstoßionisation zeichnet sich durch gute Reproduzierbarkeit sowohl in den Fragmentierungsmustern als auch in der Intensität der Signale aus und ist deshalb zur Identifizierung und Quantifi-

zierung von unbekanntem Proben gut geeignet [9].

Mit der Chemischen Ionisierung [10] ist eine sanftere Ionisationsmethode gefunden worden. Die Analytmoleküle werden hierbei indirekt durch ein Puffergas (meist Methan) ionisiert. Dieses Puffergas wird durch Elektronenstoß ionisiert und die entstandenen Ionen reagieren chemisch mit dem eigentlichen Analyten. Bei dieser chemischen Reaktion werden Analytmolekülionen gebildet, es handelt sich dabei um ein Reaktionsprodukt aus Analyten und Puffergas. Im Allgemeinen werden Protonen bei der Reaktion übertragen, so dass der Analyt plus Proton als positives Ion auftreten bzw. der deprotonierte Analyt als negatives Ion auftreten. Es sind aber auch andere Addukte möglich. Chemische Ionisierung wird häufig als Kombinationsexperiment mit Elektronenstoßionisation eingesetzt, da das gleiche Experiment mit und ohne Puffergas durchgeführt werden kann. Bei der chemischen Ionisierung wird ebenfalls die thermische Verdampfung des Analyten eingesetzt.

Erst die Entwicklung von sogenannten „Desorptionsmethoden“ erlaubte es, auch schwerflüchtige oder thermisch instabile Moleküle intakt in die Gasphase zu bringen. Der Begriff der Desorption ist aber im physikalischen Sinne eines thermischen Gleichgewichtsprozesses für keine der folgenden Methoden wirklich korrekt, wird aber aus historischen Gründen beibehalten. Die Felddesorption [11][12][13] beispielsweise beruht in Wahrheit nicht auf einer Ablösung von Atomen oder Molekülen von der Oberfläche durch starke elektrische Felder, sondern auf einer elektrohydrodynamischen Verdampfung elektrisch geladener Mikrotröpfchen.

Die Laserdesorptions-Ionisation [14] besteht aus zwei Prozessen, die sich jedoch nicht voneinander getrennt betrachten lassen. Zum Einen werden durch die Energie des Laserstrahls die Atome bzw. Moleküle der festen Probe desorbiert, also durch eine Sublimation in die Gasphase gebracht. Zum Anderen wird gleichzeitig eine Ionisation durch Ladungstrennung hervorgerufen. Diese Ionisation kann sowohl in der festen Phase als auch in der Gasphase passieren. Die zu untersuchende Probe muss das Licht des Lasers absorbieren können, um so durch die schnelle Erwärmung während des Laserpulses explosionsartig Moleküle und

Atome von der Probenoberfläche zu lösen. Eine eingehendere Betrachtung der Laser Desorptions-Ionisation wird in Kapitel 2.4. vorgenommen.

Die weiteren Desorptionsmethoden, die im folgenden kurz beschrieben werden, verwenden eine Matrix in der die zu analysierenden Moleküle eingebettet sind. Die Matrix dient als eine Art Energiepuffer, da sie zunächst den überwiegenden Teil der Primärenergie aufnimmt und dem Analyten nur die zur Ionisation und Desorption notwendige Energie zuführt. Dadurch kann eine starke Fragmentierung der Moleküle unterdrückt werden. Mit der Methode des Fast-Atom-Bombardment [15][16] wurde erstmals eine Matrix in Form von flüssigem Glycerin benutzt. Der Analyt liegt innerhalb der Flüssigkeit bereits im ionisierten Zustand vor. Diese vorgeformten Ionen (preformed ions) werden dann mittels Beschuss durch Argon- oder Xenonatome in die Gasphase überführt. Die schnellen Atome mit Energien von einigen Kiloelektronenvolt schlagen kleine Glycerintröpfchen aus der Flüssigkeit heraus, die dann im Vakuum verdampfen. Die im Tropfen enthaltenen Analytmoleküle bleiben als Ionen in der Gasphase zurück und können somit untersucht werden. Bei der verwandten Methode der Sekundär-Ionen-Massenspektrometrie [17] wird die Probe mit schnellen Primärionen (z.B. Cs^+) beschossen. Die Analytmoleküle werden dann über Stoßkaskaden desorbiert und teilweise ionisiert. Bei dieser Methode wird keine Matrix verwendet.

Die Plasma-Desorptions Massenspektrometrie [18][19] nutzt den radioaktiven Zerfall des Isotops ^{252}Cf (Californium), um die Analytmoleküle zu ionisieren. Bei dem Zerfall entstehen zwei Spaltfragmente des Californium mit Energien von etwa 100 MeV, die symmetrisch voneinander weg fliegen. Ein Spaltfragment löst den Startpuls für die Flugzeitmassenspektrometrie aus, während das Andere auf die Probe trifft und ein Plasma in seinem Durchschussskanal durch die Probe erzeugt. Dieses sich radial ausbreitende Plasma ionisiert die Moleküle in der Nähe der Probenoberfläche und bringt diese in die Gasphase. Durch den Einsatz einer Matrix aus Nitrocellulose können mit dieser relativ sanften Ionisierungsmethode Moleküle bis etwa 10000 u in die Gasphase überführt werden. Die schwammartige Struktur der Nitrocellulose begünstigt die Einlagerung und die stärkere Isolierung der Analytmoleküle den Ionisierungsprozess.

Eine weitere Methode der Desorption bzw. Ionisation, die sich der Unterstützung einer Matrix bedient ist die Matrix-assistierte Laserdesorptions-Ionisation (MALDI) [20]. Diese Technik durchbrach die Limitierung, die kennzeichnend für die klassische Laserdesorptions-Ionisation war. Für die LDI-MS waren nur bestimmte Substanzklassen zugänglich, bedingt durch die unterschiedliche spektrale Absorption. Gleichzeitig lag die obere Massengrenze bei etwa 1000 u, unter anderem bedingt durch intermolekulare Wechselwirkungen. Der Analyt wird bei MALDI-MS in eine Matrix, meist eine organische Säure, eingebettet. Die Matrix sollte dabei die folgenden Eigenschaften erfüllen: Sie muss in einem molaren Überschuss von typischerweise 1000:1 bis 100000:1 vorliegen, um so die Analytmoleküle räumlich voneinander zu trennen und dadurch die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Analytmolekülen zu minimieren. Außerdem muss sie das Laserlicht absorbieren, um so schon bei geringen Laserintensitäten in die Gasphase gebracht werden zu können. Die Energie, die dann auf den Analyten übertragen wird, kann dadurch gering gehalten werden, so dass der Zerfall des Analyten minimiert wird. Die Funktionsfähigkeit der eingesetzten Matrices hängt damit von der eingesetzten Laserwellenlänge ab. Historisch wurden zunächst verschiedene Anregungswellenlängen von 266 nm, 337 nm, 354 nm im UV-Bereich eingesetzt. Jedoch hat sich schließlich aus praktischen Gründen der Stickstofflaser bei 337 nm durchgesetzt. Als Matrix werden hier neben verschiedenen anderen Matrices hauptsächlich 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [21], Sinapinsäure [22] und α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHCA) [23] verwendet. Als weiterer Wellenlängenbereich hat sich der Infrarot-Bereich bei 2.49 μm etabliert (IR-MALDI). Dabei wird üblicherweise Glycerin [24] oder Bernsteinsäure [25] als Matrix verwendet. In der Regel werden bei der Matrix-assistierten Laserdesorptions-Ionisation protonierte, einfach geladene Molekülonen erzeugt. Bei größeren Molekülen können auch Mehrfachladungen auftreten. Der Desorption-Ionisationsprozess bei MALDI-MS wird in Kapitel 2.5 detaillierter dargestellt.

Eine weitere erfolgreiche Ionisationsmethode ist die Elektrospray-Ionisation (ESI) [26][27][2]. Sie unterscheidet sich grundsätzlich von den anderen hier beschriebenen Methoden, da die Probe in gelöster Form vorliegt und die Ionisierung unter Atmosphärendruck stattfindet. Einige Vorläufer dieser Methode waren schon frü-

her bekannt, allerdings wurde ihre Relevanz für die Massenspektrometrie zunächst nicht erkannt [28][29]. Die Thermospray-Ionisation [30] brachte einen Durchbruch, wurde aber später von der Elektrospray-Ionisation verdrängt. Bei der ESI wird die Probe aus einer Glaskapillare gesprüht, die typischerweise einen Innendurchmesser von 10 bis 100 μm hat. Die Kapillarspitze ist von einer Metallkapillare ummantelt oder besitzt selbst eine Metallbeschichtung die auf einem Potential von 1 bis 6 kV gegenüber einer Abzugsblende liegt. Durch die hohen Felddichten an der Spitze der Kapillare entsteht ein Überschallstrahl aus feinen geladenen Tröpfchen. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels wird die Ladungsdichte der Tröpfchen weiter erhöht, bis diese durch die Ladungsabstoßung explosionsartig (Coulomb-Explosion) in kleine Tröpfchen und schließlich in einzelne hochgeladenen Ionen zerfallen. Über ein differentiell gepumptes Einlasssystem, dessen Öffnung axial gegenüber der Kapillarspitze liegt, gelangen die Ionen in den Vakuumbereich des Massenspektrometers, um dort analysiert zu werden. Die Ionen liegen als protonierte Moleküle in der Form $(M+nH)^{n+}$ mit einem Masse/Ladungsverhältnis von typischerweise bis zu $m/z = 2000$ u vor. Die Auswahl des Lösungsmittels und ein eingesetzter Stickstoffgasstrom in Sprührichtung spielen für die Größe der erzeugten Tröpfchen und auch für das Masse/Ladungsverhältnis und die Intensität der Massesignale eine entscheidende Rolle. Ein besonderer Vorteil dieser Ionisationsmethode ist die direkte Injektion des gelösten Analyten in das Massenspektrometer. Dadurch lassen sich leicht Online-Kopplungen zu chromatographischen (High Pressure Liquid Chromatography) [31] und elektrophoretischen (Capillary Electrophoresis) [32] Trennmethode realisieren.

2.2 Massenanalysatoren

Die ältesten Massenanalysatoren separierten die Ionen mittels eines magnetischen Feldes [33]. Die bewegte Ladung des Ions bewirkt, dass das Ion im magnetischen Feld auf eine Kreisbahn gezwungen wird, deren Radius vom Masse/Ladungsverhältnis des Ions abhängt. Somit können bei einer gegebenen magnetischen Feldstärke nur Ionen eines bestimmten Masse/Ladungsverhältnisses den Detektor erreichen, wenn sich vor diesem eine geeignete Spaltblende befindet. Durch eine Veränderung der Feldstärke lässt sich nun ein vollständiges Massenspektrum aufnehmen. Bei einem konstanten Feld kann mit einer Photoplatte anstelle des Detektors das Massenspektrum orts aufgelöst dargestellt werden. Die größte Einschränkung dieses Analysators war sein beschränktes Auflösungsvermögen. Das Massenaufklärungsvermögen wird unter anderem definiert als die höchste Masse, die sich mit dem Signal der Nachbar-masse nicht oberhalb ihrer halben Signalhöhe überlappt. Als praktische Bestimmungsformel ergibt sich daraus die FWHM-Definition („full width at half maximum“), die im Kapitel 4.1 noch näher erläutert wird. Um die Massenaufklärung zu verbessern, wurden die einfach fokussierenden magnetischen Analysatoren durch ein statisches elektrisches Feld erweitert. Bei diesen sogenannten doppelt-fokussierenden Analysatoren [34][35] wurden vor allem die Mattauch-Herzog-Geometrie (Fokussierung der Ionen auf eine Photoplatte) und die Nier-Johnson-Geometrie (Fokussierung der Ionen auf einen Detektor) eingesetzt. In beiden Fällen wird das elektrische Feld zur Selektion der kinetischen Energie konstant gehalten und das magnetische Feld variiert. Diese doppelt fokussierenden Sektorfeldgeräte können eine Massenaufklärung bis etwa $M/\Delta M = 100000$ erreichen.

Der Quadrupol-Massenfilter ist eine Anordnung von vier parallelen stabförmigen Metallelektroden, die von Ionen unter bestimmten Bedingungen auf stabilen oszillierenden Bahnen durchlaufen werden können. Er wurde erstmals 1953 von W. Paul und H. Steinwedel beschrieben [36][37]. Das System besteht aus vier Stäben, von denen die gegenüberliegenden Stäbe mit einer Gleichspannung und einer überlagerten Wechselspannung belegt sind. Benachbarte Stäbe haben eine gegensätzliche Polarität der Gleichspannung und eine Phasenverschiebung um

180° bei der Wechselspannung. Das daraus resultierende elektrische Potential und damit die Kräfte und die Flugbahn lassen sich mit den Mathieschen Differentialgleichungen beschreiben. Aus dem Stabilitätsdiagramm der Mathieschen Gleichungen (Abbildung 1, [38]) für das zweidimensionale Quadrupolfeld lassen sich die Bedingungen ablesen, unter denen Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis auf einer stabilen Bahn den Quadrupolfilter durchqueren können. Die höchste Auflösung wird erreicht, wenn die Arbeitsgerade, die durch das Verhältnis zwischen Gleich- und Wechselspannungsamplitude U durch V bestimmt wird, die Spitze des Bereichs stabiler Oszillationen gerade berührt. Bei heute kommerziell erhältlichen Geräten ist ein Massenbereich bis zu $m/z = 5000$ u bei einer Auflösung zwischen $M/\Delta M = 100$ und 10000 zugänglich. Die praktischen Vorteile des Quadrupol-Massenfilters wie hohe Ionentransmission, große Stabilität im Dauerbetrieb und geringe Kosten haben zu einer weiten Verbreitung dieses Massenfilters geführt. Durch die Einführung von zwei oder drei Quadrupolen hintereinander werden gezielte Experimente zur Fragmentierung von Molekülen zur Strukturaufklärung möglich [39].

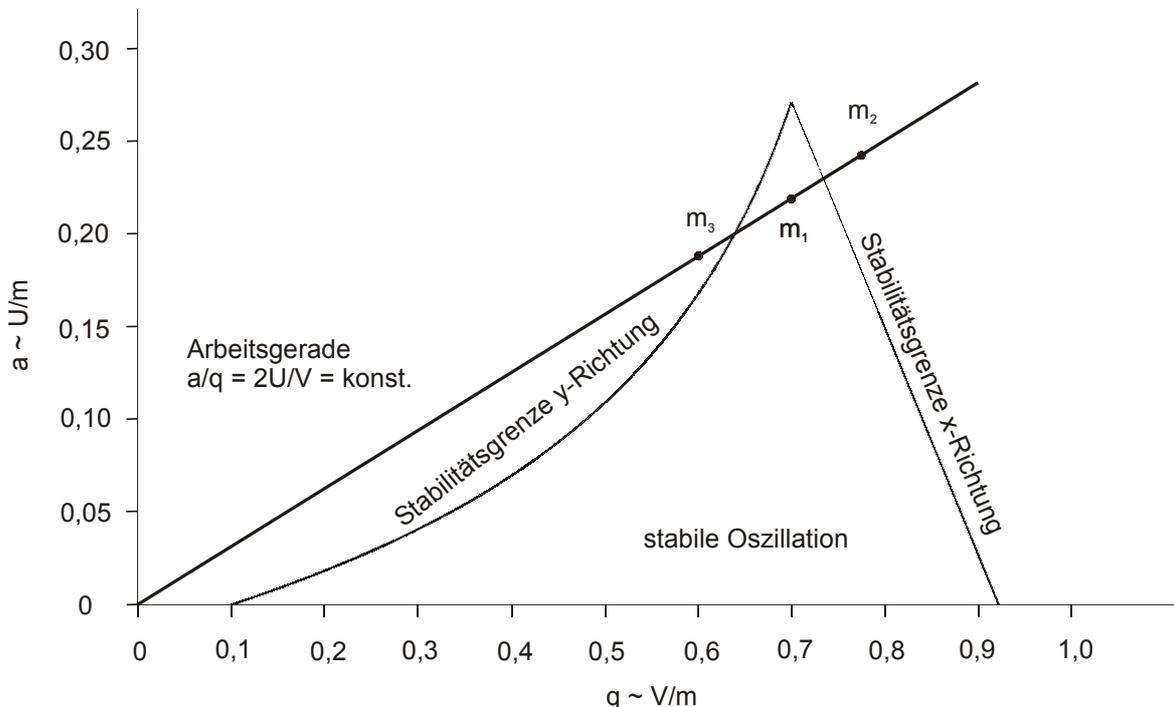


Abbildung 1: Stabilitätsdiagramm für einen zweidimensionalen Quadrupolmassenfilter [38]

Schon wenige Jahre nach den ersten Quadrupolanalysatoren wurde von W. Paul und E. Fischer der erste „dreidimensionale Quadrupol“, die Ionenfalle oder ion trap vorgestellt [40][41][37]. Die Ionen werden hierbei mit geeigneten elektrischen Feldern in der Ionenfalle eingefangen und können in einem Zeitbereich von bis zu mehreren Sekunden gespeichert und analysiert werden. Eine Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode mit zwei Endkappen, an die Wechselspannungen angelegt werden. Die Endkappen besitzen zentrische Öffnungen zum Ein- und Auslass der Ionen. Auch der Bereich der stabilen Ionenbahnen wird durch die Mathieuschen Differenzialgleichungen bestimmt. Während bei einem linearen Quadrupolfilter Ionen einer Masse ausgewählt werden, die das System durchqueren, wird bei der Ionenfalle ein Betriebsmodus gewählt in dem ein möglichst großer Massenbereich in der Falle gespeichert wird. Durch das Einleiten von Stoßgas und gezieltes Herauswerfen von Ionen können mit kommerziell erhältlichen Ionenfallen Fragmentierungsexperimente in mehreren Stufen durchgeführt werden.

Ein weiteres Verfahren um Ionen zu speichern und zu analysieren ist das Fourier-Transformations-Ionen-Zyklotron-Resonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS) [42][43]. Im Gegensatz zu den anderen vorgestellten Analysatoren ist hier der Analysator mit dem Detektor der Ionen in einem Messprinzip vereint. Die Ionen werden durch ein starkes Magnetfeld in der ICR-Zelle auf eine Kreisbahn geleitet. Die kubische ICR-Zelle besteht aus sechs Metallplatten, die die Funktion des Einfangens, gezielten Fragmentierens und des Detektierens übernehmen. Da durch das Magnetfeld die Ionen nur in zwei Dimensionen eingefangen werden können, ermöglicht ein Potential an zwei Endplatten, dass die Ionen ebenfalls in der dritten Dimension eingefangen werden. Über die Steuerung dieses Potentials werden die Ionen auch in die Zelle eingeleitet und eingefangen. Zwei weitere gegenüberliegende Platten dienen dazu über Hochfrequenzeinstrahlung die Ionen zu manipulieren, Ionen zu fragmentieren oder Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses in der Zelle zu isolieren. Als Detektor fungieren die letzten zwei Platten, die die Kreisfrequenz der Ionen induktiv messen. Bei bekannter Stärke des Magnetfelds kann aus diesem Zeitspektrum der sich überlagernden Zyklotronfrequenzen der Ionen durch Fourier-Transformation ein Frequenzspektrum gewonnen werden. Durch eine geeignete Kalibrierung ergibt sich ein Massenspektrum. Die Auflösung,

die mit diesem Massenanalysator erreicht werden kann, liegt mit 10^6 deutlich über den erreichbaren Auflösungen anderer Analysatoren. Sie ist abhängig von der Zeitdauer in der die Frequenzen der Ionen bestimmt werden kann. Neben der Massenauflösung ist besonders die Richtigkeit (accuracy) der bestimmten Masse von Bedeutung. Auch sie liegt bei der FT-ICR-Methode mit 1-2 ppm bei deutlich besseren Werten, verglichen mit anderen Massenanalysatoren. Um die Ionen in die ICR-Zelle zu transferieren werden meistens Quadrupole oder Hexapole verwendet. Als Ionenquellen sind MALDI- oder Elektrospray-Kopplungen üblich [44][45].

Da es sich bei der Laserdesorptions-Ionisations-Technik (LDI) um eine gepulste, diskontinuierliche Quelle handelt, bietet sich als Massenanalysator ein Flugzeitanalysator („Time of Flight“, „TOF“) an, um die erzeugten Ionenpakete analysieren zu können.

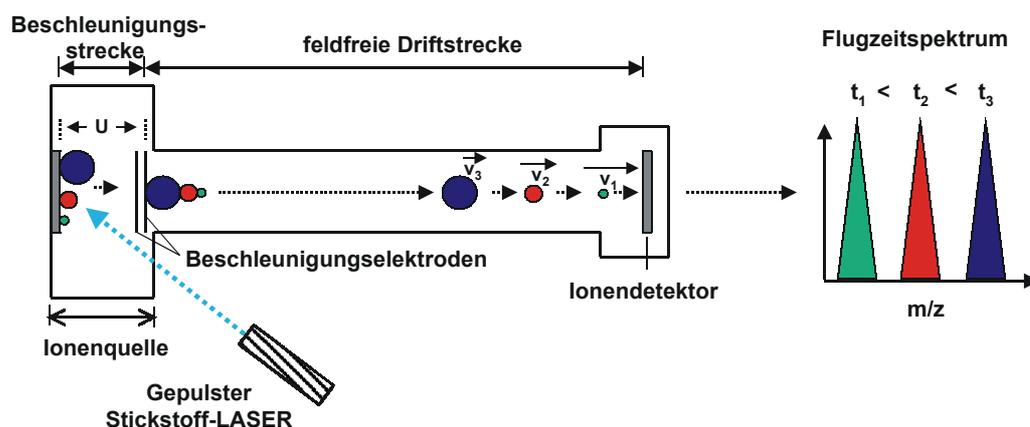


Abbildung 2: Lineares Time-Of-Flight Massenspektrometer

Der Aufbau eines einfachen Flugzeitmassenspektrometers ist in Abbildung 2 beschrieben. Bei dieser Anordnung werden mit einem gepulsten Laserstrahl, der auf eine Probe fokussiert ist, Ionen aus der Probe erzeugt. Diese dort entstandenen Ionen werden mit Hilfe eines elektrischen Feldes von der Probenoberfläche weg in ein lineares Flugrohr beschleunigt. Die kinetische Energie, die sie bei der Beschleunigung im Quellbereich des Instrumentes bekommen, ist unabhängig von der Masse der erzeugten Ionen und ergibt sich aus der angelegten Beschleunigungsspannung U und der elektrischen Ladung des Ions $z \cdot e$ (e : Elementar-

ladung, z : Anzahl der Ladungen).

$$E_{kin} = U \cdot z \cdot e$$

Gleichung 1

Die beschleunigten Ionen treten anschließend in die feldfreie Strecke des Massenanalysators ein. Für ihre Geschwindigkeit gilt

$$V = \sqrt{\frac{2Uze}{m}}.$$

Gleichung 2

Die Flugzeit in der feldfreien Strecke L ergibt sich dann als

$$t_{drift} = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2Uze}},$$

Gleichung 3

während für die Beschleunigungsstrecke s gilt:

$$t_{acc} = 2s \cdot \sqrt{\frac{m}{2Uze}}.$$

Gleichung 4

Die Gesamtflugzeit unter Vernachlässigung einer eventuellen Detektornachbeschleunigung ist dann:

$$t_{gesamt} = (2s + L) \cdot \sqrt{\frac{m}{2Uze}}$$

Gleichung 5

$$t \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Gleichung 6

Aus dieser Beziehung lässt sich eine einfache Kalibrierungsgleichung ableiten. In erster Näherung ist diese Gleichung auch für kompliziertere Massenspektrometer mit weiteren Verzögerungs- oder Beschleunigungsfeldern, wie Ionenfokussierungen, Detektornachbeschleunigung oder Flugzeitfokussierungen, gültig.

$$t = a + b \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Gleichung 7

Normalerweise sollte die Kalibrierungskonstante b für eine exakte Kalibrierung ausreichen. In der zusätzlich eingeführten Kalibrierungskonstante a können allerdings weitere instrumentelle und methodische Einflüsse zusammengefasst werden, die einen Einfluss auf den Startzeitpunkt haben.

Aus dieser Gleichung ergibt sich ein einfaches, unkompliziertes und empirisches Kalibrierungsverfahren mit dem die gemessene Flugzeit mit dem Masse-Ladungsverhältnis verknüpft werden kann. Außerdem kann aus der Gleichung gefolgert werden, dass Ionen mit gleicher Masse zur selben Zeit am Detektor ankommen, solange sichergestellt wird, dass der Startzeitpunkt aller Ionen identisch ist und sie alle nach der Beschleunigungsstrecke dieselbe Energie besitzen. Dies ist in der Praxis nicht gegeben und es ergeben sich drei mögliche Fehler die im Kapitel 4.2 besprochen werden [46]:

1. Startzeitfehler
2. Energiefehler
3. Flugstreckenfehler

In realen Flugzeitmassenspektrometern lassen sich die Flugzeitverteilungen nicht ohne weiteres mathematisch-analytisch beschreiben, da komplexe Ionisationsmechanismen, diverse Beschleunigungs- und Bremszonen für die Ionen und zum Teil dynamische elektrische Felder vorliegen. Allerdings ist es sinnvoll, die auflösungsbegrenzenden Flugzeitverteilungen formal in Energie- und Startzeitfehler zu separieren, um so die im Folgenden beschriebenen flugzeitkorrigierenden Verfahren zu unterscheiden.

Der einfachste Weg zur Kompensation von virtuellen Energiefehlern ist der einstufige homogene Ionenreflektor [47][48]. Die Ionen gelangen, nachdem sie eine feldfreie Strecke durchlaufen haben, in ein homogenes elektrisches Reflexionsfeld in dem sie schließlich umkehren um eine weitere feldfreie Flugstrecke zu durchlaufen bevor sie auf den Detektor treffen (Abbildung 3). Die Energiefehler werden kompensiert, da die schnelleren Ionen früher in den Reflektor eintauchen, allerdings aufgrund ihrer höheren Energie tiefer in den Reflektor eintauchen als die langsameren Ionen. Dies führt dazu, dass die langsamen Ionen den Reflektor früher verlassen und auf der zweiten Driftstrecke von den schnelleren Ionen eingeholt werden. Der Detektor liegt dann idealerweise an dieser Position.

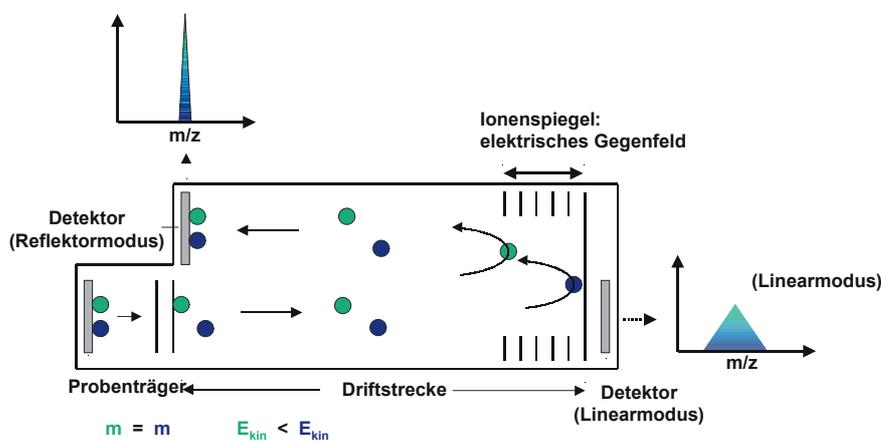


Abbildung 3: Funktionsprinzip des Reflektors

Bei einer Betrachtung der optimalen Bedingungen zur Energiefehlerkompensation zeigt sich, dass die Gesamtflugzeit bei der Variation der kinetischen Energie eine parabelförmige Abhängigkeit besitzt. Daraus folgt, dass der Einfluss der Energiefehler am geringsten am Minimum dieser Kurve ist, da sich dort die Flugzeit mit Variation der Energie am geringsten verändert. Gleichzeitig ergibt sich aus dem parabelförmigen Zusammenhang allerdings auch, dass die Fehler nicht vollständig mit einem einstufigen Reflektor kompensiert werden können. Eine deutlich bessere Konfiguration ist der zweistufige Reflektor [49][50][51]. Bei dieser Anordnung werden die Ionen zunächst in der ersten, kurzen Stufe auf etwa ein Drittel der Energie abgebremst. Die eigentliche Reflexion geschieht dann in der zweiten Stufe des Reflektors. In diesem Teil steigt das elektrische Potential nur schwach über eine längere Strecke an. Entscheidend für eine gute Kompensation der

Energiefehler in dieser Konfiguration ist die Einstellung des Potentials des mittleren Netzes und des Gesamtpotentials. Für die optimierten Parameter zeigt sich, dass im Vergleich zum einstufigen Reflektor die Kurve der Gesamtflugzeit bei Variation der kinetischen Energie ein breites Plateau bildet. In diesem Bereich werden die Energiefehler über einen weiten Bereich kompensiert. Wichtig für einen zweistufigen Reflektor ist weiterhin, dass es in ersten Stufe, da hier das Potential auf einer kurzen Strecke stark ansteigt, Feldverzerrungen vermieden werden. Dies geschieht durch entsprechend engmaschige Gitter, die hier zur Verwendung kommen. Eine weitere Geometrie für Reflektoren sind die sogenannten curved-field Reflektoren. Hier steigt das Potential innerhalb des Reflektors quadratisch bzw. exponentiell an [52][53]. Mit dieser Konfiguration lassen sich bis jetzt nur begrenzte Auflösungsverbesserungen erreichen, da sich die Realisierung der optimalen Potentialgeometrie als schwierig erweist.

Die Kompensation der Startzeitfehler, die durch Anfangsgeschwindigkeiten der Ionen beim Desorptionsprozess, durch Stöße der Ionen mit Matrix- oder Restgasmolekülen oder durch Verteilung der Ionenentstehungszeitpunkte erzeugt werden, kann durch statische Felder nicht kompensiert werden. Dynamische Felder zur Kompensation dieser Fehler wurden schon vor Einsatz des Reflektors entwickelt [54]. Die Methode des sogenannten „time-lag focusing“ oder auch „delayed extraction“ [55][56] beruht auf dem Prinzip der Umwandlung einer Anfangsgeschwindigkeitsverteilung in eine räumliche Verteilung durch eine verzögerte Beschleunigung der Ionen nach ihrer Entstehung. Die Ionen mit größerer Geschwindigkeit in Flugrichtung breiten sich schon vor dem Einschalten des Beschleunigungsfeldes stärker aus, als solche mit kleiner Anfangsgeschwindigkeit. Sie bekommen dann beim Einschalten des Feldes eine geringere Gesamtbeschleunigungs-Energie zugeführt, als die Ionen mit geringerer Anfangsgeschwindigkeit, da sie auf einem höheren Potential starten. Hieraus ergibt sich dann ein Ortsfokus für die Ionen, der bei der zweifachen Entfernung der Beschleunigungsstrecke liegt. Da dies im allgemeinen nicht der Entfernung des Detektors entspricht, wird generell eine zweite Beschleunigungsstufe eingerichtet, mit der der Ortsfokus beliebig im Raum verschoben werden kann. Eine entsprechende Dimensionierung und Einstellung der Potentiale erlaubt eine Kombination

aus Reflektor-TOF zur Energiefehlerkompensation und einer verzögerten Extraktion zur Kompensation der Startzeitfehler, die in vielen aktuellen Flugzeitmassenspektrometern Verwendung findet. Eine weitere Methode zur Kompensation von Startzeitfehlern ist die „post-source-pulse-focusing“ Methode [57]. Hierbei werden die Ionen zunächst beschleunigt und treten dann in eine zweite Beschleunigungsstrecke. Dort wird durch ein gepulstes Potential die inzwischen erlangte räumliche Verteilung auf einen gemeinsamen Ort fokussiert. Da die zweite Beschleunigung räumlich getrennt erfolgt, ist es möglich diese Kompensation auch nach anderen Manipulationen der Ionen durchzuführen.

2.3 Ionennachweis

Der Nachweis der Ionen wird bei der Flugzeitmassenspektrometrie üblicherweise mit Kanalplattendetektoren (microchannel plate; MCP) durchgeführt [58]. Dies geschieht durch die Erzeugung von Sekundärelektronen beim Auftreffen der Primärionen innerhalb der um ca. 6 Grad gegen die Flugrichtung gekippten Kanäle. Durch erneutes Auftreffen dieser Elektronen auf die Kanalwände werden in einer Kaskade lawinenartig Elektronen erzeugt. Um die notwendige Verstärkung des Signals um ca. sechs Größenordnungen zu erreichen, werden meistens zwei Kanalplattendetektoren hintereinandergeschaltet. Diese Detektoren zeichnen sich durch ihre geringe Größe, ihre ebene Primär-Auftrefffläche und ihr gutes Zeitverhalten aus. Allerdings ist die Ladungskapazität der Kanalplatten durch ihre Größe beschränkt, so dass bei stärkeren Ionensignalen der Detektor kurzzeitig blind wird. Besser geeignet für große Ionenströme ist ein Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV), da hier die hohe nutzbare Gesamtladung von Vorteil ist. Durch das schlechtere Zeitverhalten und die nichtebene Auftrefffläche sind die erzielten Massenaufösungen geringer. Als dritte Möglichkeit kann noch ein Photoelektronen-Vervielfacher eingesetzt werden [59]. Mit diesem Detektor ist es möglich die Vorteile der MCP und des SEV zu kombinieren. Zunächst prallen die Primärionen auf eine ebenen Konversionsdynode und erzeugen einen Sekundärelektronenstrom. Diese Elektronen werden auf einen Szintillator beschleunigt und erzeugen Photonen. Mittels eines Photomultipliers wird dann ein elektronisch verwertbares Signal erzeugt. Aus dieser Anordnung ergibt sich ebenfalls eine ebene Auftrefffläche für die Primärionen. Gleichzeitig bietet diese Anordnung, da die Sekundärelektronen beschleunigt werden und durch ein magnetisches Feld aus der axialen Achse gebracht werden, die Möglichkeit auch in einem Reflektorgerät für die Primärionen einen komplett axialen Aufbau vorzunehmen. Ein weiterer Vorteil ist, dass ein geschlossenes Detektorsystem außerhalb des Massenspektrometers verwendet werden kann, das im Gegensatz zu offenen Systemen kaum Alterungs- und Kontaminationsphänomene aufweist.

2.4 Mikrosonden-Techniken

Während der letzten 40 Jahren sind eine Vielzahl von oberflächenanalytischen Methoden entwickelt worden. Ein besonderes Augenmerk wird hier auf die orts aufgelöste Analytik von Oberflächen gelegt. Um Oberflächen oder auch die obersten Schichten eines Objektes zu untersuchen, liegen eine ganze Reihe von Techniken vor, die sich aus den möglichen physikalischen Wechselwirkungen ergeben. Die Tabelle 1 [60] gibt einen schematischen Überblick über die eingehenden Teilchen wie z.B. Elektronen, Photonen, Ionen, die ausgehenden Teilchen und einigen der daraus resultierenden Methoden zur Untersuchung von Oberflächen.

| Eingehendes Teilchen auf die Probe (Sonde) | Ausgehende Teilchen von der Probe (Informationsträger) | Methode |
|--|--|---|
| Elektronen | Elektronen | Auger-Spektroskopie Elektronenenergieverlust-Spektroskopie |
| | Photonen | Elektronen Mikroröntgensondenanalytik |
| | Ionen | Elektronenionisations-Massenspektrometrie |
| Ionen | Ionen | Sekundärionen-Massenspektrometrie |
| | Photonen | Ioneninduzierte Röntgenstrahlanalytik |
| Neutralteilchen | Ionen | Fast atom bombardment Massenspektrometrie |
| Photonen | Photonen | Ramanmikrosondenanalytik Fouriertransform-Infrarotspektroskopie Röntgenfluoreszenzspektroskopie |
| | Ionen | Laser-Mikrosonden-Massenspektrometrie |
| | Elektronen | Röntgen- und UV-Photoelektronenspektroskopie |
| Elektrisches Feld | Ionen | Feldionisations-Massenspektrometrie |
| Wärmeenergie | Ionen | Thermale Ionsisations-Massenspektrometrie |

Tabelle 1: Überblick über Methoden der Mikrosondenanalytik [60]

Die gewonnenen Informationen einer Probe lassen sich in drei Parametern zusammenfassen, die für die in dieser Arbeit besprochenen Methoden der Massenspektrometrie relevant sind. Erstens die Masse bzw. Polarität und Ladung der erzeugten Partikel, zweitens die Anzahl der Teilchen bzw. Intensität der Signale, wobei meistens nur eine relative Quantifizierung möglich ist und drittens die räumliche Verteilung der detektierten Partikel auf der Oberfläche. Die beiden wichtigsten Methoden, um auch Informationen über die laterale Verteilung der Zusammensetzung einer Probe zu erhalten, sind die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) und die Laser Mikrosonden Massenspektrometrie (LMMS). Die laterale Verteilung von Oberflächen durch Massenspektrometrie zu untersuchen, hat gerade im letzten Jahrzehnt in der biologischen und medizinischen Forschung an Bedeutung gewonnen. Mehrere Arbeiten beschäftigen sich mit der Bedeutung der Massenspektrometrie zur Diagnostik von Krankheiten wie Krebs [61], Schlaganfall [62], Alzheimer [63], BSE [64][65], Silikose [66] und anderen. Mit SIMS kann die Verteilung von Elementen [67] und kleinen Molekülen in Zellen [68] und Gewebeschnitten [69] gezeigt werden. Mit MALDI-MS kann die laterale Verteilung größerer Moleküle (bis $m/z = 100000$ u) im Gewebe dargestellt werden [70].

Die ersten Versuche Laser in der Massenspektrometrie einzusetzen wurden von Honig und Woolston [71] unternommen, die einen Krater von etwa $150 \mu\text{m}$ Durchmesser in einer Probe produzierten und mit einem doppelt fokussierenden Sektorfeldgerät die Ionen detektierten. Da die Pulsdauer noch zu lang war, konnten keine ausreichenden Massenauflösungen erreicht werden. Die Weiterentwicklung der Laser wie auch der Analysatoren machte einen Massenbereich zugänglich, in dem auch größere Moleküle wie Oligosaccharide oder Peptide bis etwa 1500 u nachgewiesen werden konnten [72]. Durch die gute Fokussierbarkeit und die kurzen Einwirkzeiten des Lasers ist er besonders für eine Kopplung mit Flugzeitmassenspektrometern geeignet, um so rasternde Massenspektrometrie durchführen zu können. Die ersten Untersuchungen wurden an umgebauten Elektronenstoß-Ionisations- bzw. Chemischen Ionisations-Quellen durchgeführt [6][73][74][75]. Zwischen 1980 und 1984 waren die ersten kommerziell gebauten Geräte erhältlich (Lima 2a [76], Lamma 500 [77], Lamma 1000 [78]). Diese Geräte

sind mit einem frequenzvervierfachtem Nd:YAG Laser bei 266 nm ausgerüstet und haben einen Laserfokus auf der Probe von 0.5 bis 5 μm . Je nach Gerätetyp kann im Transmissions- oder Reflexionsmodus gearbeitet werden. Die Massenauflösung liegt bei $M/\Delta M = 500$ bis 850 [79][80]. Diese kommerziell erhältlichen Geräte sind noch nicht mit einer entsprechenden Software ausgerüstet um rasternde Massenspektrometrie durchzuführen. Mit einer im Mikrometermaßstab zu positionierenden Probenhalterung und einem He-Ne Pilotlaser lassen sich die zu untersuchenden Gewebeteile oder andere Oberflächen sehr genau aufgrund des guten Ortsfokus des Lasers und der Beobachtungsoptik auswählen und analysieren. Da das Lamma 500 im Transmissionsmodus arbeitet, ist die Dicke der Proben auf ca. 1 μm begrenzt [81]. Das Lamma 1000 hat eine Reflexionsgeometrie und kann deshalb auch für dickere Proben und Oberflächen von Festkörpern eingesetzt werden. Das Lima 2a ist in beiden Modi einsetzbar.

Um die Auflösung und die Massengenauigkeit zu verbessern, wurde 1988 ein Fourier Transform Massenanalysator mit einem LMMS Aufbau kombiniert [82][83][84]. Die Auflösung dieses Gerätes ging bis zu $m/\Delta m = 160000$, allerdings konnte nur ein Massenbereich bis ca. $m/z = 100$ u untersucht werden.

2.5 MALDI-MS

Die Matrix-assistierte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie stellt einen wesentlichen Fortschritt dar, um größere Moleküle aus der festen Phase in die Gasphase zu überführen [85][1][20][3][86]. Neben der Elektrosprayionisation hat sich die MALDI-MS zu der wichtigsten Methode entwickelt, um nichtflüchtige Substanzen mit hohem Molekulargewicht wie z.B. Peptide [87], Proteine [88], DNA [89], Zucker [90], Polymere [3] oder Fullerene [91] zu untersuchen. Obwohl diese Methode eine ganze Fülle von Substanzklassen der Untersuchung zugänglich gemacht hat, ist der Desorptions/Ionisationsmechanismus bislang nicht ausreichend verstanden worden. Kenntnisse der Mechanismen sind von großer Bedeutung z.B. für eine Erhöhung der Empfindlichkeit oder eine bessere Kontrolle der Fragmentation. Weiterhin spielt der Ladungszustand der Moleküle eine entscheidende Rolle, um auch mit MALDI-MS größere Moleküle einfacher zugänglich zu machen. Die Kontrolle über den Mechanismus macht vielleicht auch eine quantitative MALDI-Massenspektrometrie möglich. Aus einem besseren Verständnis der Desorptions- und Ionisationsvorgänge könnten darüber hinaus verbesserte Präparationstechniken für Oberflächenuntersuchungen abgeleitet werden.

Einer der Gründe warum der MALDI-Mechanismus bislang nur unzureichend aufgeklärt ist, liegt in der Komplexität des Vorgangs. Zunächst wird in kurzer Zeit sehr viel Energie in einem Festkörper deponiert und dieser verdampft. In der entstehenden Verdampfungswolke über dem Probeneller laufen komplexe physikalische, chemische und photochemische Reaktionen ab, bevor die entstandenen Ionen mit einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Die vielfältigen möglichen Ionisierungsmechanismen werden in der Literatur diskutiert. Es existieren mehrere, sich zum Teil widersprechende Modelle. Zu den wichtigen und durch experimentelle Hinweise [21][92][93][86] belegten Eigenschaften der Matrix gehört, dass sie den Analyten isoliert, um so die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den großen Analytmolekülen zu minimieren. Dies wird erreicht durch ein molares Matrix/Analyt-Verhältnis von mindestens 1000:1. Gleichzeitig wird durch die Matrix die Energie des Laserlichtes absorbiert um die Probe zu desorbieren. Durch die hohen Pulsenergie des Lasers findet ein schneller, explosiver Phasenübergang

statt, und das entstehende Gas (Matrix und Analyt) expandiert in einem Überschallgasstrahl [94]. Die gemessenen Ionengeschwindigkeiten liegen unmittelbar nach der Desorption des Materials bei bis zu 1000 m/s und variieren je nach verwendeter Matrix [95][96][97][98][99][100]. Die Ionengeschwindigkeiten der Analyten sind im Durchschnitt etwa 100 bis 200 m/s niedriger [101]. Die Analyten sind nach unterschiedlichen Modellvorstellungen innerhalb der Wolke zunächst als neutrale Moleküle [102] oder bereits als positive Ionen mit ihren dazugehörigen Anionen innerhalb eines Matrixclusters vorhanden [103]. Da das Ionisierungspotential für die verschiedenen Matrices zwischen 7,7 und 9,4 eV liegen [102] ist eine direkte Ionisation durch ein Stickstofflaserphoton nicht möglich und für zwei Photonen (7,36 eV) noch sehr unwahrscheinlich. Eine Ionisierung durch drei oder mehr Photonen ist bei den eingesetzten Photonendichten nicht bevorzugt. Deshalb geht man nicht von einer direkten Ionisierung des Matrixmoleküls aus [104][105], sondern nimmt einen Mechanismus an, bei dem über einen angeregten Zwischenzustand sowohl Matrix [106] als auch Analyt ionisiert wird [102]. Die innere Anregung der Analytmoleküle führt zur Fragmentierung, die in den meisten UV-MALDI Messungen tatsächlich beobachtet werden kann. Dabei kann insbesondere bei Peptiden zwischen einem „in-source“ Zerfall [107] in den ersten 100 ns nach dem Laserbeschuss mit vorwiegend c- bzw. z-Fragmenten (zur Nomenklatur der Fragmentationen siehe [108]) und einer metastabilen Fragmentierung („post source decay“ (PSD) technique) [4][109] mit hauptsächlich b- bzw. y-Fragmenten [108] unterschieden werden. Die PSD-MALDI-MS lässt sich unter anderem zur Sequenzierung von Peptiden [110][111] und Oligosacchariden nutzen [112]. Da die Lebensdauer größerer Ionen höher ist, zerfällt der Großteil der Moleküle erst in der feldfreien Flugstrecke. Die Fragmente lassen sich dann mithilfe eines Energieanalysators auftrennen. Eine weitere Methode zur Fragmentierung ist der Stoß-induzierte Zerfall. Dabei werden die Moleküle gezielt durch Kollision mit einem Stoßgas fragmentiert (Collision induced dissociation (CID)) [5][113]. Der Fragmentierungsgrad hängt von der relativen Geschwindigkeit und der Dichte der Stoßpartner ab. Hohe Dichten des Stoßpartners führen allerdings zur Verringerung der Transmission der Molekül- bzw. Fragment-Ionen. In diese Fragmentenspektren lassen sich durch beispielsweise Wasserabspaltungen oder

Ringschlüsse auch komplexere Fragmentierungswege nachweisen, da die Fragmentierung auf einer längeren Zeitskala (bis zu mehreren Millisekunden) stattfindet.

Die möglichen Wege zur Ionisation des Moleküls sind die Übertragung von Energie aus mehreren einfach angeregten Molekülen (Energie Pooling) [114][93], sequentielle zweifache Anregung oder direkte zweifache Anregung eines Moleküls [106]. Die Ionisierung der Analytmoleküle geschieht innerhalb der MALDI Gaswolke, die noch Millisekunden nach dem Laserbeschuss Dichten im Bereich von 0,1mbar aufweist und deshalb Stöße innerhalb der Wolke sehr wahrscheinlich sind [115]. Eine der möglichen Reaktionen in der Gaswolke ist eine Transferreaktion von Protonen von den Matrixionen zum Analyten. Untersuchungen der Ionendichten vor einer MALDI-Probe zeigen, dass im Bereich der langsamen protonierten Analytmoleküle die Dichte der protonierten Matrixmoleküle abnimmt [98]. Weitere Untersuchungen zur Flugzeit von protonierten Analyten weisen starke Hinweise auf Protonentransferreaktionen auf [116]. Alternativ wird diskutiert, dass der Ladungsübertrag innerhalb eines desorbierten Clusters [117] stattfindet. Durch die große Anzahl der Stöße innerhalb der Wolke sowohl mit Ionen als auch mit Elektronen findet eine effektive Rekombination statt, so dass der größte Teil der Moleküle als Neutralteilchen in der Wolke existieren [102]. Allerdings werden ebenfalls Moleküle detektiert [118], deren Entstehung in der Gaswolke durch Rekombination eher unwahrscheinlich sind. Die nachgewiesenen Moleküle legen ein alternatives Modell nahe, bei dem die Analytionen bereits im Kristall vorliegen und die Matrix/Analytcluster durch den Laserpuls kollektiv in die Gasphase mitgerissen werden, wo sie dann zerfallen [118]. Für dieses Modell spricht, dass es eine Abhängigkeit des protonierten Analytsignals im Vergleich zum Signal des Salz-Addukts gibt, da die Ionen schon in Lösung vorliegen [119]. Die zum Teil hochgeladenen Cluster und die statistische Ladung, die abhängig von der Anionen- und Kationenanzahl im Cluster ist, wurden schon bei der Untersuchung des LDI-Mechanismus als der erste Schritt zur Ladungstrennung angesehen [94]. Die effektive Rekombination innerhalb der Gaswolke und der Verlust von geladenen Matrixionen, Anionen und Kationen beim Zerfall der Cluster bietet dann eine gute Erklärung für die fast ausschließlich einfach positiv, bzw. negativ geladenen Ana-

lytionen [103]. Die verschiedenen Phänomene legen nahe, dass sowohl in dem entstehenden Gasstrahl geladene Cluster mitgerissen werden als auch ein Protonenübertrag von Matrix zu Analyt in der Gaswolke stattfindet [100].

Entscheidend für die MALDI-Präparation insbesondere zur mikroskopisch rastrenden Untersuchung ist, inwieweit ein Einbau des Analyten in den Matrixkristall nötig ist, um ein verwertbares Analytsignal zu erhalten. Üblicherweise wird davon ausgegangen, dass der Analyt mit dem wachsenden Kristall eingeschlossen wird und nur dann eine genügende und homogene Separierung der Analytmoleküle gelingt [97]. Dies bedeutet, dass eine Vermischung von Analyt und Matrix noch in der flüssigen Phase notwendig ist und diese während der Kristallisation weiterhin vorhanden sein muss. Die zwingende Vermischung hätte zur Folge, dass auf einer Oberfläche lokalisierte Analytmoleküle bei der MALDI-Präparation erst chemisch gelöst werden müssen, um anschließend gemeinsam mit der Matrix auszukristallisieren. Durch diesen Prozess jedoch geht zwangsläufig die Ortsinformation des Analyten verloren, da eine laterale Migration der Analytmoleküle die Folge wäre. Während der Kristallisation geschieht eine Segregation aufgrund unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften der Analyten [120][121]. Diese Segregation lässt sich innerhalb einer MALDI-Präparation beobachten. Zum Teil ist diese inhomogene Verteilung der Analyten sogar innerhalb eines Kristalls zu beobachten (vgl. Kapitel 5.1). Allerdings gibt es in der Literatur auch Hinweise, dass die Inkorporation des Analyten zwingende Voraussetzung ist, um größere Moleküle intakt in die Gasphase zu bekommen [122]. Bedingung ist jedoch weiterhin, dass die Analytmoleküle räumlich voneinander getrennt werden. So können auch mit der DIOS (Desorption Ionisation on Silicon) Massenspektrometrie erfolgreich Peptide analysiert werden [123]. Der Analyt wird hierbei auf einen porösen Siliziumträger gegeben. Da der Analyt von der porösen Oberfläche adsorbiert wird und nur wenige der großen Moleküle in die 2 - 50 nm großen Öffnungen passen, kann auch hier von einer räumlichen Trennung der Analyten gesprochen werden. Weitere Untersuchungen zeigen, dass auch Matrices für MALDI-MS verwendet werden können, die keinen Einbau des Analyten in den wachsenden Kristall zeigen und dennoch Messungen möglich sind [122]. Der Einbau des Analyten ist jedoch in jedem Fall sehr nützlich, um gute Signalintensitäten und eine gute

Empfindlichkeit zu erreichen. Anscheinend ist zur erfolgreichen Desorption und Ionisation lediglich notwendig, dass sich der Analyt in unmittelbarer Umgebung der Matrix befindet und durch die Laserbestrahlung in die Gasphase überführt werden kann. Konfokale Mikroskopie an Matrixkristallen zeigt, dass es ausreicht, wenn der Analyt im direkten Kontakt mit den Kristallen vorliegt [124]. Auch mit SMALDI-MS kann dieses Phänomen beobachtet werden (Kapitel 6.1, [125]). Zusätzlich lässt sich bei einer dünnen trockenen Beschichtung einer Analytenoberfläche mit Matrix ein Abtragungseffekt beobachten. Bei mehrfachem Laserbeschuss ist der Analyt nur unmittelbar bevor die Schicht abgetragen ist zu beobachten (Kapitel 5.3). Diese Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass auch die Präparation einer Oberfläche möglich ist, ohne dass eine intensive Vermischung des Analyten von der Oberfläche mit der Matrix nötig ist (Kapitel 5). Dies erleichtert die notwendigen Anstrengungen, um eine hochauflösende Scanning Microprobe MALDI Massenspektrometrie von biologischen Oberflächen zu ermöglichen.

2.6 Scanning-Mikrosonden-MALDI-MS

Durch die Entwicklung der Laser-Mikrosonden-Massenspektrometrie (LMMS) in den 80er Jahren konnten die Einschränkungen anderer Mikrosondentechniken, insbesondere in Hinblick auf Empfindlichkeit und Massenbereich überwunden werden. Die Empfindlichkeit konnte so um einige Größenordnung verbessert und der Massenbereich von der reinen Elementanalytik auf organische Verbindungen erweitert werden [126][127][128]. Die dennoch vorhandene Begrenzung des Massenbereichs bei der LMMS auf etwa $m/z = 1000$ u beschränkte die biologischen Anwendungen auf wenige Beispiele wie z.B. das Profiling von Bakterien [129][130]. Der Erfolg einer Untersuchung hing von den sehr unterschiedlichen Eigenschaften der Probe ab. Genau wie bei LDI (bei größeren Laserfoki) spielten Parameter wie Absorption, Ionisierungspotential und Flüchtigkeit der Probe eine wesentliche Rolle, um bioorganische Moleküle analysieren zu können [85][114].

Eine weitere Methode um Mikroanalyse von anorganischen und organischen Verbindungen durchzuführen, ist die Sekundär-Ionen-Massenspektrometrie (SIMS) [131]. Der Unterschied zur MALDI-Massenspektrometrie liegt unter anderem im zugänglichen Massenbereich und der Tiefe, aus der analytische Informationen gewonnen werden. Während bei MALDI-MS Proteine untersucht werden können und je nach Fokusbereich der Abtrag zwischen wenigen Nanometern und einigen Mikrometern liegt, ist die Analytik mit SIMS auf Elemente bzw. organische Moleküle und auf die oberste Monolage beschränkt. Die laterale Auflösung von SIMS liegt aufgrund der guten Fokussierbarkeit eines Ionenstrahls bei etwa 100 nm.

Die rasternde Nahfeldmikroskopie (scanning near field microscopy, SNOM) ist eine Methode, um bei der lasergestützten Untersuchung von Oberflächen zu noch kleineren bestrahlten Flächen zu kommen. Die klassische Begrenzung der optischen Beugung kann bei der Nahfeldmikroskopie überwunden und eine optische Auflösung von wenigen Nanometern erreicht werden. Allerdings ist die Kombination zwischen SNOM und LDI-Massenspektrometrie bisher nur sehr beschränkt einsetzbar, da bislang nur kleinere Moleküle mit sehr schlechter Nachweisempfindlichkeit detektiert werden konnten [132].

Das wachsende Interesse an MALDI-MS führte unter anderem zu Untersuchungen, bei denen entweder Zellextrakte oder einzelne ausgewählte Zellen mit Matrix vermischt und analysiert wurden. So wurde beispielsweise ein Gewebeschnitt für einige Sekunden auf einen Probenträger gepresst und der entstandene Fleck mit Matrix präpariert (Blotting) und mit (PSD-) MALDI-Massenspektrometrie analysiert [133]. Alternativ hat man ausgewählte Zellen in einem Gefäß oder direkt auf dem Probenteller mit Matrix gemischt und mit MALDI-MS untersucht [133][134][135]. Interessant ist dabei vor allem, dass ohne aufwendige Vorbereitungs-, Aufarbeitungs- oder Auftrennungsschritte Ergebnisse erzielt werden, mit denen Neuronen, Zellen oder Gewebe charakterisieren werden können. Die Toleranz der MALDI-MS gegenüber Verunreinigungen und Begleitstoffen macht sie zu einer idealen Methode um biologische Oberflächen direkt zu untersuchen.

Aufgrund der attraktiven Eigenschaften im Hinblick auf die Untersuchung biologischer Proben liegt es nahe MALDI auch für Mikrosondentechnik einzusetzen. Insbesondere die Möglichkeit strukturelle Informationen (PSD) über die Probe zu bekommen, macht die Idee der Kombination dieser beiden Methoden sehr attraktiv. Die hohe Empfindlichkeit der MALDI-Massenspektrometrie und der kleine Laserfokus der Mikrosondenanalytik stellen eine ideale Kombination dar, um nicht nur einzelne ausgewählte Stellen einer Probe zu untersuchen und zu vergleichen, sondern auch gezielt einen ganzen Probenbereich abzurastern (Imaging). Die Datenverarbeitungsgeschwindigkeit schränkte hierbei zunächst rasternde bildgebende Massenspektrometrie ein. Die Aufarbeitung von mehreren tausend Massenspektren war sehr zeitaufwendig und begrenzte die Zahl der gleichzeitig analysierten Substanzen, da eine Software zur automatischen Aufarbeitung der Spektren noch nicht zur Verfügung stand [136]. Weiterhin waren die verfügbaren MALDI-Massenspektrometer nur in der Lage, einen Laserfokus im Bereich von 50 bis 200 μm Durchmesser zu erzeugen. Die wesentlichen Einschränkungen kommen allerdings durch die Präparation der biologischen Objekte und führen zu einer Limitierung der lateralen Auflösung von ca. 30 μm [137][70][138][139]. Für diese Größenordnung kann eine weitgehend migrationsfreie Präparation durchgeführt werden. Zur Auflösung von Strukturen im Zellmaßstab ist diese laterale Auflösung jedoch nicht ausreichend. Das in dieser Arbeit vorgestellte Gerät (Lamma 2000)

[125] verfügt über einen Laserfokus der nahe der Beugungsbegrenzung liegt und bei einer lateralen Auflösung von $0,7 \mu\text{m}$ arbeitet. Damit sind die technischen Voraussetzungen erfüllt um Scanning-Mikrosonden-MALDI-MS (SMALDI-MS) zu betreiben. Erst eine Verbesserung der Präparationstechniken (Kapitel 5) ermöglichte es SMALDI-MS auch für biologische und synthetische Objekte in diesem Auflösungsbereich nutzen zu können (Kapitel 6).

3 Instrumentierung

Die im folgenden Kapitel beschriebenen MALDI-Massenspektrometer wurden beide am Institut für Lasermedizin der Universität Düsseldorf konzipiert und im Grundaufbau realisiert. Das „Aladim II“ ist ein leistungsfähiges PSD-MALDI-Massenspektrometer, das hohe Empfindlichkeit und hohe Massenauflösung auch im PSD-Modus gewährleistet. Beim „Lamma 2000“ handelt es sich um eine Weiterentwicklung des Lamma 500 bzw. Lamma 1000 der Firma Leybold, das nicht nur zur Untersuchung von biologischen Proben mit LDI-MS, sondern auch mit MALDI-MS geeignet ist. An beiden Geräten werden die Laserfoki charakterisiert, um insbesondere den Mikrosondencharakter des „Lamma 2000“ zu zeigen. In späteren Kapiteln werden noch weitere Geräte zur Probenvorbereitung vorgestellt.

3.1 Lamma 2000

Eine schematische Abbildung des Instruments Lamma 2000 ist in Abbildung 4 dargestellt [125]. Zum Zweck der einfacheren Probenhandhabung ist das Flugrohr des Flugzeitmassenspektrometers in vertikaler Richtung orientiert. Das gesamte Vakuumsystem wird mit zwei 360 l/s Turbomolekularpumpen (Leybold AG, Köln, Deutschland) und einer Drehschieberpumpe (Leybold AG, Köln, Deutschland, 16 m³/h) betrieben. Die Turbomolekularpumpen befinden sich auf der Rückseite der Probenkammer und in der Mitte des Flugrohrs. Die Vorpumpenpumpe ist in hinreichendem Abstand neben dem Instrument platziert, um eventuelle Vibrationseinflüsse zu vermeiden. Mit derselben Drehschieberpumpe wird auch die Schleusenkammer zum Einführen der Probe evakuiert. Während der Evakuierung der Schleusenkammer wird die Vorpumpe von den Turbomolekularpumpen abgetrennt. Da zwischen Turbomolekularpumpe und Vorpumpe eine Vorkammer als Puffer vorhanden ist, kann die Turbomolekularpumpe ohne weiteres mehrere Minuten ohne Vorpumpe arbeiten. Der Arbeitsdruck des Vakuumsystems beträgt $5 \cdot 10^{-7}$ mbar. Der Druck im Schleusensystem beim Einschleusen einer Probe beträgt $1 \cdot 10^{-1}$ mbar. Nach dem Einschleusen der Probe wird innerhalb einer Minute der Arbeitsdruck wieder erreicht und es kann mit der Messung begonnen werden.

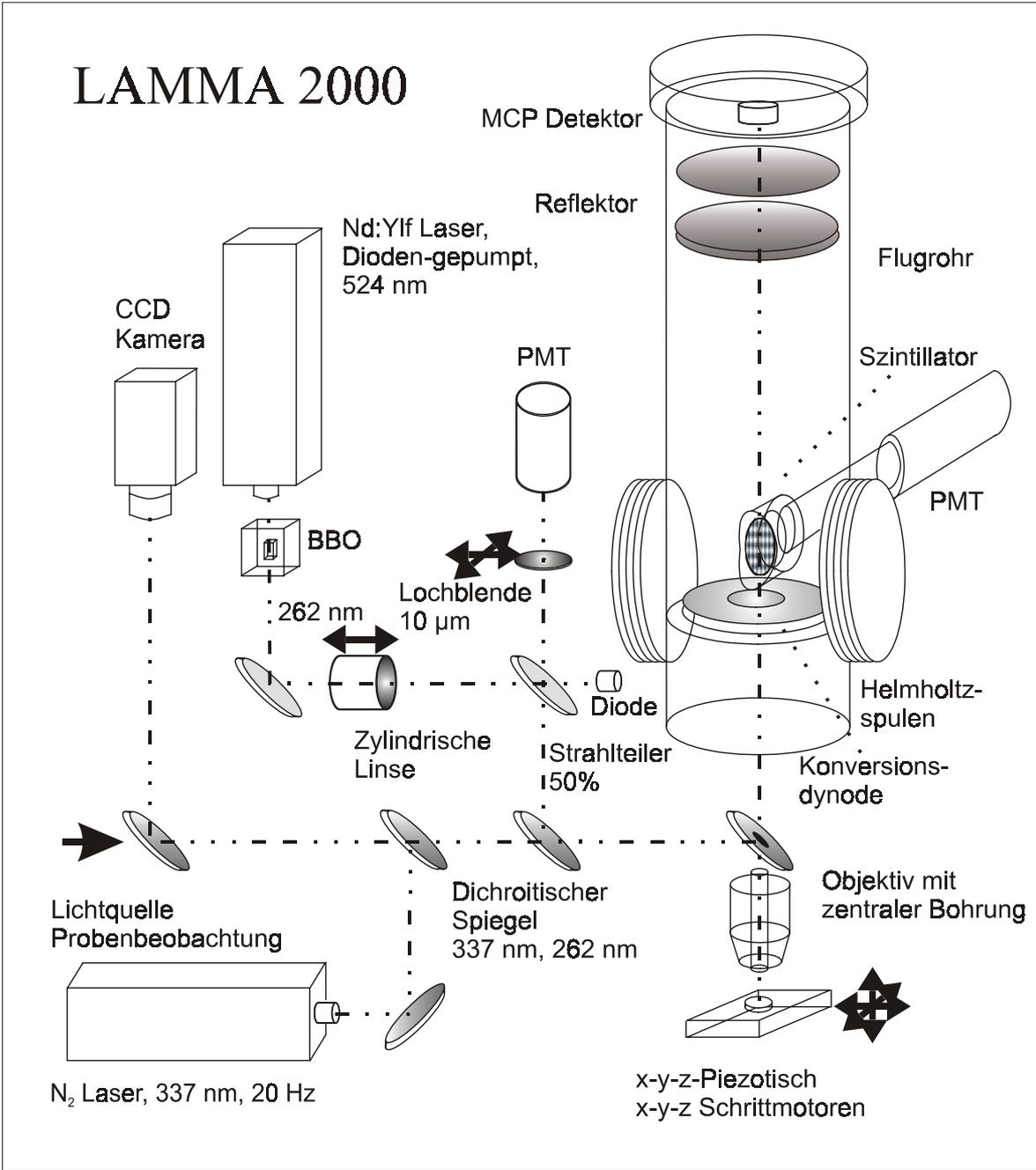


Abbildung 4: Aufbau Massenspektrometer "Lamma 2000" [125]

Es stehen zwei alternative Lasersysteme zur Desorption / Ionisation bzw. für die ebenfalls mögliche konfokale Mikroskopie zur Verfügung, ein frequenzvervierfacher Nd:YFL-Laser mit einer Wellenlänge von 262 nm und ein Stickstofflaser mit 337 nm Wellenlänge.

Der gepulste, diodengepumpte und intern frequenzverdoppelte Nd:YLF-Laser (ADLAS, Lübeck, Deutschland, Model 421 QD) erreicht eine Pulsenergie von 100 μJ bei einer Pulslänge von 15 ns bei 524 nm. Die Frequenzvervierfachung wird extern mit einem temperaturüberwachten BBO-Kristall durchgeführt. Nach der Frequenzvervierfachung beträgt die Pulsenergie 15 μJ bei 262 nm. Das diodengepumpte System kann mit Repetitionsraten von 1 Hz bis 8 kHz bei UV-Pulsen mit konstanter und hinreichender Pulsenergie betrieben werden. Laserenergie und Repetitionsrate können durch den Diodenpump laser manuell oder per Computer gesteuert werden.

Als zweiter Laser steht ein Stickstofflaser (VSL 337 NDS Laser, Laser Science Inc. Cambridge, Massachusetts, USA), wie er bei vielen kommerziellen MALDI-Massenspektrometern benutzt wird, zur Verfügung. Die Pulsenergie des Lasers beträgt 300 μJ bei einer Pulslänge von 3 ns und einer Wellenlänge von 337 nm. Die Repetitionsrate kann per Computer von 1 Hz bis 20 Hz gesteuert werden. Zusätzlich wird die Laserenergie mittels zweier drehbarer Abschwächer gesteuert.

Um eine Fokussierung des Laserlichtes im Submikrometerbereich zu erreichen, sind besondere Maßnahmen erforderlich: Die zwei alternativen Lasersysteme werden zunächst auf etwa 10 μm vorfokussiert, um dann direkt oberhalb des Probenträgers in der Vakuumkammer endgültig gebündelt zu werden. Da der Laserstrahl des Nd:YLF-Lasers nach dem Vervierfachen der Wellenlänge ein stark elliptisches Intensitätsprofil besitzt, muss es mittels zweier zylindrischer Linsen korrigiert werden, damit später eine gute Fokussierung erreicht werden kann.

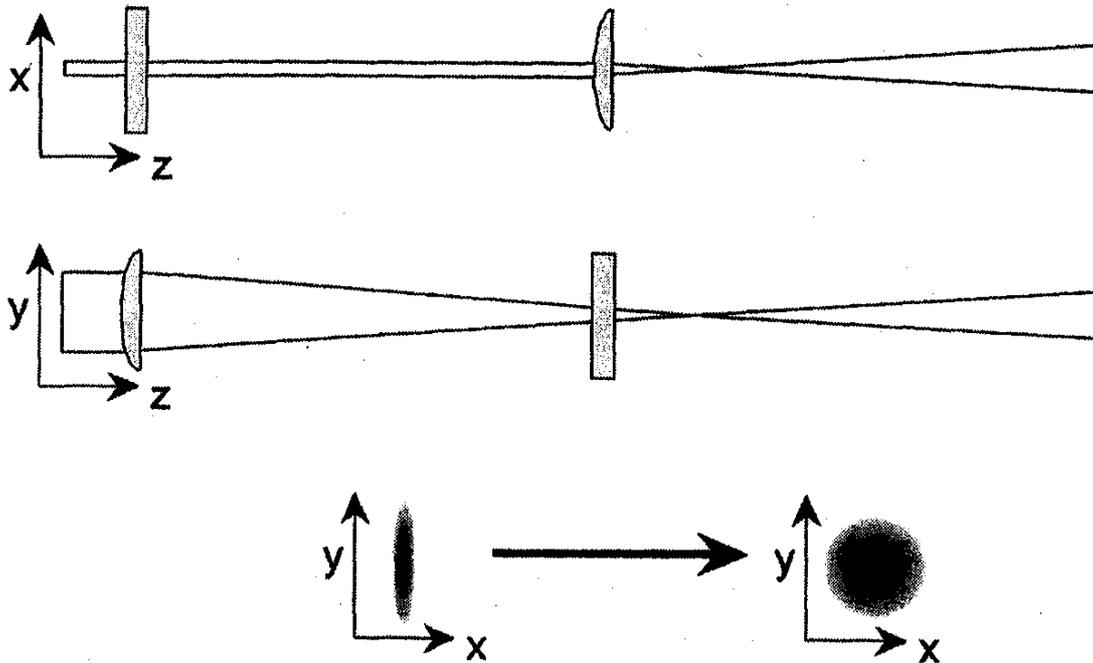


Abbildung 5: Korrekturlinsen für ein zirkuläres Strahlprofil [125]

Die Vorfokussierung des Laserstrahls wird in Abbildung 5 gezeigt. Das Verhältnis der beiden Radien des elliptischen Profils beträgt 1:8. Die X-Achse (kleiner Radius) wird mit einer zylindrischen Linse, die einen Fokus von 5 mm hat, fokussiert, während die Y-Achse mit einer zylindrischen Linse mit einem Fokus von 40 mm fokussiert wird. Beide Foki werden in dieselbe fokale Ebene gelegt, um dort ein nahezu rundes Laserprofil zu erzeugen. Da das Laserprofil des Stickstofflasers zufriedenstellend ist, wird dieser Laser mit einer konventionellen Linse mit einer Brennweite von 40 mm auf einen Vorfokus von 10 μm fokussiert.

Die endgültige Fokussierung geschieht im Hauptvakuum direkt über dem Probenhalter. Das Objektiv zur Fokussierung hat einen Außendurchmesser von 90 mm und einen freien Arbeitsabstand von 16 mm. Die numerische Apertur des Objektivs beträgt 0.6. Das speziell für dieses Gerät hergestellte Objektiv besteht aus 5 Suprasilquarzlinsen mit Durchmessern zwischen 35 und 50 mm und ist optimiert für eine Wellenlänge von 262 nm. Der große freie Arbeitsabstand ist notwendig,

um vor das Objektiv den notwendigen Aufbau für die Ionenquelle platzieren zu können. Damit die Ionen die Quelle senkrecht zur Probenoberfläche verlassen können, besitzt das Objektiv eine zentrale Bohrung durch die eine Stahlröhre mit einem inneren Durchmesser von 6 mm verläuft. Sowohl für den frequenzvervierten Nd:YLF-Laser bei einer Wellenlänge von 262 nm als auch für den Stickstofflaser bei einer Wellenlänge von 337 nm kann gezeigt werden, dass die erreichbaren Laserfoki im Bereich von 0.5 μm bis 1 μm liegen. Durch eine direkte Messung der Intensitätsverteilung des Laserlichtes mittels eines Diodenarrays konnte der Fokusbereich bei 262 nm zu $0.45 \mu\text{m} \pm 0.15 \mu\text{m}$ ermittelt werden (Abbildung 6).

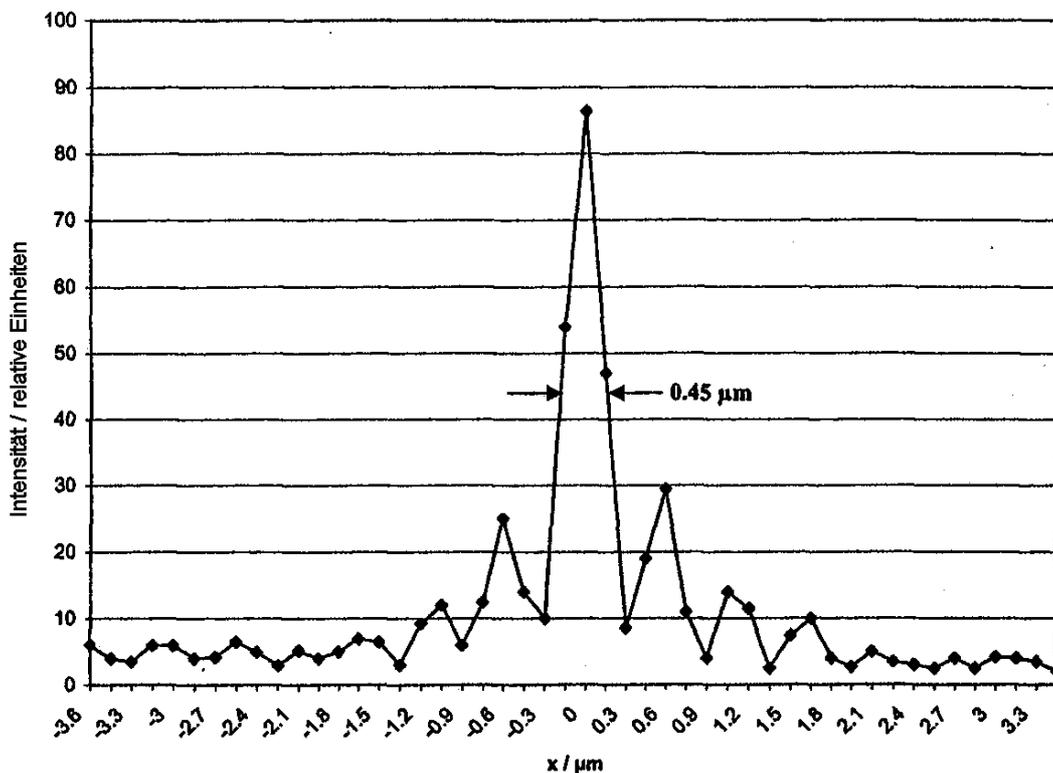
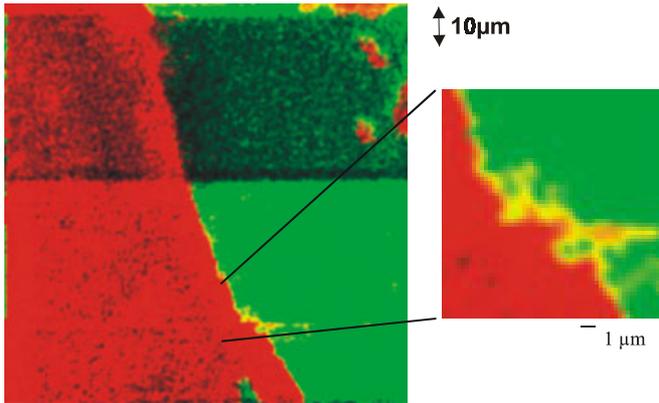


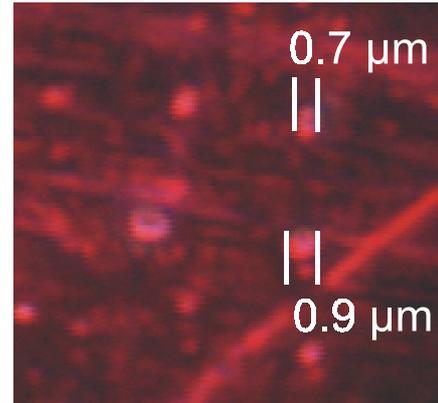
Abbildung 6: Fokusbereich bei 262 nm [125]

Dazu wurde ein Diodenarray mit 15 μm Diodenabstand bei einer 100-fachen Vergrößerung (Leitz Ultrafluor 100, Numerische Apertur: 0.85) des Laserfokus eingesetzt. Der Laserfokus auf der Probenoberfläche bei Verwendung des Stickstofflasers bei 337 nm Wellenlänge wurde über Einschusslöcher des Lasers

in einen dünnen roten Farbfilm auf einer Probenoberfläche gemessen (Abbildung 7). Auf einem normalen Aluminiumprobenträger wurde mit einem roten Filzstift (Edding 3000, rot) ein Farbfilm aufgetragen und mit der zwei- bis dreifachen Schwellbestrahlungsstärke des Lasers ein Strahlpuls auf die Probe fokussiert. Die Schwellbestrahlungsstärke ist definiert als die niedrigste Bestrahlungsstärke bei der Ionen mit ausreichendem Signal-zu-Rausch-Verhältnis nachgewiesen werden können. Bei der Schwellbestrahlungsstärke konnten keine optisch sichtbaren Einschusspuren festgestellt werden. Wurde die Laserleistung entsprechend erhöht, konnten mit einem optischen Auflicht-Mikroskop (Olympus BX 40) bei einer 1000-fachen Vergrößerung nahezu kreisrunde Einschusslöcher mit einem Durchmesser von $0.6\ \mu\text{m}$ bis $0.9\ \mu\text{m}$ bei einer Desorptionswellenlänge von $337\ \text{nm}$ gemessen werden (Abbildung 7). Die Einschusslöcher wurden unter Vakuumbedingungen und unter normalen massenspektrometrischen Bedingungen erzeugt. Da von einem nahezu gaußförmigen Intensitätsprofil des Stickstofflasers ausgegangen werden kann und die normalen Intensitäten des Lasers zur Aufnahme eines Verteilungsbildes nur wenig über der Schwellbestrahlungsstärke liegen, kann unter solchen Bedingungen sogar von einem kleineren Fokussdurchmesser als $0,6\ \mu\text{m}$ ausgegangen werden. Die resultierende analytische Ortsauflösung des Massenspektrometers liegt im Bereich von $1\ \mu\text{m}$, wie im linken Teil der Abbildung 7 an einer Grenze zwischen zwei Filzstiftstrichen gezeigt werden kann.



Scanning LDI-MS von zwei Filzstiftstrichen auf Aluminiumteller;
 Roter Kanal: $m/z = 122$ u;
 Grüner Kanal: $m/z = 372$ u
 (100 x 100 μm , 0.5 μm Schrittweite)
 Wellenlänge: 262 nm



Lasereinschüsse auf roter Filzstiftfarbe
 (15 x 15 μm).
 Wellenlänge: 337 nm

Abbildung 7: Charakterisierung der analytischen Auflösung [125]

Zur Abschätzung des Wertes der Schwellbestrahlungsstärke bei einem Fokussdurchmesser von 0.5 μm bis 1.0 μm wurden die Verluste der optischen Elemente bestimmt, um daraus die effektive Bestrahlungsstärke bei der Messung mit ausreichender Genauigkeit bestimmen zu können. Eine Messung der Laserenergie direkt am Ausgang des Stickstofflasers ergab einen Wert von $254 \mu\text{J} \pm 3 \mu\text{J}$ pro Laserpuls bei einer Pulslänge von 3 ns. Zur Abschwächung der Laserenergie wird eine dichroitisch beschichtete Quarzplatte benutzt, die senkrecht zur optischen Achse steht und um ihre Achse verstellt wird, um so die Reflektivität des Abschwächers zu variieren. Um zu verhindern das durch den Abschwächer ein Strahlversatz entsteht, wird ein zweite nicht beschichtete Quarzplatte in den Laserstrahl gebracht und entgegengesetzt zur Ersten verstellt. Zusätzlich wurde der Laser durch Glasplatten abgeschwächt, damit die Winkelverstellung des Abschwächers möglichst gering bleibt. Die Winkelabhängigkeit der Abschwächung bzw. die Schrittmotoreinstellung (Abbildung 8) zeigt, dass die größte Variation bei einem Winkel zwischen 15 und 30 Grad bzw. bei Schrittmotoreinstellungen zwischen 25 und 50 zu erreichen ist. Durch die Bestimmung der optischen Transmission der Elemente (Abbildung 9) kann die Schwellbestrahlungsstärke aus der

Schrittmotorposition, der Anzahl der Glasplatten im Strahlengang und der Größe des Laserfokus bestimmt werden. Die normale Bestrahlungsstärke, während einer Messung bei der noch Matrixsignal (DHB) bzw. Analytsignal nachgewiesen werden können, lässt sich so aus der Einstellung des Abschwächers und der Anzahl der Glasobjektträger bestimmen. Für DHB als Matrix ergab sich hier bei 10 Glasplatten eine Schrittmotoreinstellung von 42 für die Matrix und 38 für den Analyten. Daraus ergibt sich auf der Probe eine Laserenergie von 1,9 μJ für Matrixsignale und 2,6 μJ für Analytsignale.

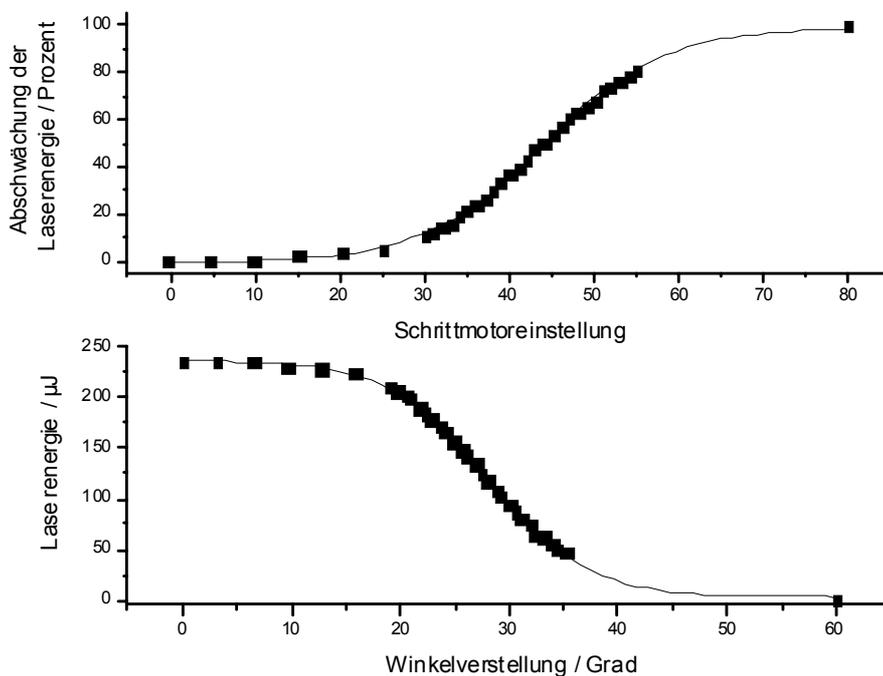


Abbildung 8: Charakterisierung des Laserabschwächers

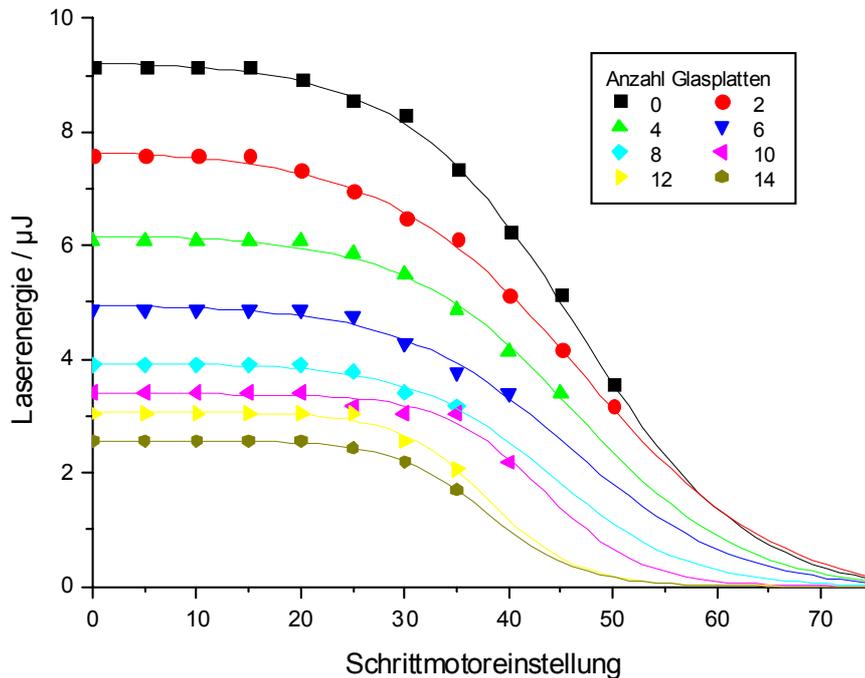


Abbildung 9: Laserpulsenergie an der Position des Proben-tellers

Bei einem Laserfokus von ca. $1 \mu\text{m}$ ergibt sich für die Schwellbestrahlungsstärke ein Wert von ca. $1 \cdot 10^6 \text{ J/m}^2$ bzw. $3,3 \cdot 10^{10} \text{ W/cm}^2$ für das Matrixsignal und ca. $1,4 \cdot 10^6 \text{ J/m}^2$ bzw. $4,5 \cdot 10^{10} \text{ W/cm}^2$ für das Analytsignal. Vergleicht man diesen Wert mit den Messungen von Dreisewerd und Hillenkamp [140][141] zeigt sich, dass die Schwellbestrahlungsstärke nicht mit dem dort aufgestellten, thermischen Modell vereinbar ist. Eine Extrapolation des Modells herunter bis zu Laserfoki von $1 \mu\text{m}$ würde zu erwartende Werte der Schwellbestrahlungsstärke liefern, die bei dem 100 bis 1000-fach der gemessenen Werte liegen. Dies ist nur verständlich, wenn von grundsätzlich verschiedenen Desorptionsmechanismen bei großen und kleinen Foki ausgegangen wird, oder wenn man annimmt, dass das thermische Modell generell eine zu schlechte Abbildung der Wirklichkeit darstellt. Während bei Foki im Bereich von 10 bis $500 \mu\text{m}$ von einem Prozess ausgegangen wird, bei dem nur die Oberfläche der Probe abgetragen wird, sind die Eindringtiefen bei $1 \mu\text{m}$ wesentlich höher ($0,3 - 0,5 \mu\text{m}$, Abbildung 24), so dass nicht länger von einem Oberflächenprozess gesprochen werden kann.

Zur Positionierung der Probe bzw. zur Abrasterung der Probe im Mikrometerbereich stehen zwei Systeme zur Verfügung. Zunächst kann die Probe mit einem X-Y-Z-Schrittmotortisch grob positioniert werden. Der Tisch lässt sich sowohl mit Hilfe des Computers als auch mit einer Handsteuerung kontrollieren. In der X- und Y-Richtung ist der Tisch mit einer Genauigkeit von 5 μm in einem Bereich von 20 mm x 20 mm, in Z-Richtung mit einer Genauigkeit von 0,2 μm in einem Bereich von 10 mm ansteuerbar. Da dieser Tisch die einzige Möglichkeit ist, die Z-Achse und damit die Einstellung des Laserfokus auf die Probe zu steuern, muss über die Einstellung der Z-Achse in Kombination mit der Einstellung der Laserleistung die Schwellbestrahlungsstärke bei einem optimalen Fokus gefunden werden. Dabei ist zu beachten, dass die Mechanik der Schrittmotoren bei einem Wechsel der Laufrichtung einen Schlupf von einigen Mikrometern aufweist. Das zweite Positionierungssystem, das auf dem schrittmotorgesteuerten Tisch aufgebaut ist, besteht aus einem piezogesteuerten X-Y-System. Auch dieser Tisch ist sowohl computer- als auch handgesteuert zu bedienen. Hiermit kann die Probe über einen Bereich von 100 μm mal 100 μm mit einer Genauigkeit von 0,25 μm angefahren werden.

Als Probenträger werden speziell für dieses Gerät angefertigte runde Teller mit einem Durchmesser von 20 mm verwendet. Da der Piezotisch für die schnelle Abrasterung der Probe ein maximales Auflage-Gewicht von 2 g tragen kann, sind die Teller aus Aluminium gefertigt und nur 0,6 mm dick. Optional wird zusätzlich eine Hartgoldbeschichtung von 8 μm Dicke auf die Teller aufgebracht. Die Probenträger lassen sich sowohl im Massenspektrometer „Lamma 2000“ als auch im „Aladim II“ verwenden.

Zur optischen Beobachtung der Probe steht ein Aufbau zur Verfügung, der einem normalen Lichtmikroskop entspricht, und eine Vergrößerung um den Faktor 400 besitzt. Dabei wird die Probe durch dasselbe Objektivlinsensystem abgebildet durch das auch der Laser auf die Probe fokussiert wird. Da das Objektiv eine große numerische Apertur besitzt, ist zur Probenbeleuchtung nur monochromatisches Licht geeignet. Zur Probenbeleuchtung wird deshalb ein Diodenlaser mit einer Laserleistung von 15 mW eingesetzt. Zur Vermeidung von Interferenzmustern (Speckle-Muster), die durch die Oberflächentopologie in der

Größenordnung des Laserlichtes hervorgerufen werden, wird das Licht zunächst durch einen Lichtleiter geführt, der mit einem Motor in Schwingung versetzt wird. Dies zerstört das Interferenzmuster auf der Oberfläche und erzeugt einen homogenen Lichtfleck zur Beleuchtung der Probe. Mithilfe einer Korrekturoptik kann das Bild dann auf einer Videokamera abgebildet werden. Ein Bereich von $500\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ wird wahlweise auf einem Schwarz-Weiß-Bildschirm abgebildet oder mittels einer Videokarte auf dem Computer gespeichert.

Zum Nachweis werden die durch den hochfokussierten Laserstrahl erzeugten Ionen durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Dabei wird die Probe auf ein Potential von 13 kV gelegt, während die erste Blende in 4 mm Abstand auf ca. 10 kV Potential liegt. Darüber befindet sich in 12 mm Abstand eine Gitterelektrode auf Massepotential. Diese Elemente zur Beschleunigung der Ionen liegen vor der coaxialen Optik, die mittig eine 8 mm große Bohrung mit einer eingesetzten Metallröhre besitzt. Die Ionen werden durch diese 20 cm lange Röhre mit einem Innendurchmesser von 6 mm in die feldfreie Flugstrecke des Massenspektrometers geleitet. Wahlweise kann die erste Blende entweder mit einer statischen Spannung belegt werden, oder (im sogenannten verzögerten Extraktionsbetrieb, DE) mit einer schaltbaren Spannung betrieben werden. Nach der feldfreien Strecke folgt für den linearen Betrieb ein Kanalplattendetektor (MCP). Für den Reflektorbetrieb wird ein aus insgesamt 14 Ringen und drei Gittern bestehender zweistufiger Ionenreflektor, die erste Stufe mit 7 kV und die zweite Stufe mit 12 kV, am Ende der feldfreien Strecke eingesetzt. Die Beschleunigungsspannung wird für diesen Betrieb auf 10 kV reduziert. Nach der zweiten feldfreien Flugstrecke treffen die Primärionen auf eine Konversionsdynode und erzeugen einen Sekundärelektronenstrom. Diese Sekundärelektronen werden mittels eines magnetischen Feldes aus der axialen Richtung heraus auf einen Szintillator beschleunigt und erzeugen dort Photonen. Mit einem Photomultiplier wird daraus dann ein elektronisches Signal erzeugt.

Die weitere Datenaufnahme und Aufarbeitung der Daten wird ausführlich in Kapitel 4 erläutert.

3.2 Aladim II

Das PSD-MALDI Massenspektrometer „Aladim II“ (Advanced Laser Desorption Ionization Mass Spectrometer) ist in der (Abbildung 10) schematisch dargestellt. Es handelt sich um ein horizontal angeordnetes axiales Reflektor-Flugzeit-massenspektrometer. Das System wird von zwei Turbomolekularpumpen und einer Drehschieberpumpe auf Vakuum gehalten. Die erste Turbomolekularpumpe (Pfeiffer Vakuum, Asstar, Deutschland, TMU 250, 250 l/s) befindet sich unter der Ionenquelle, während die zweite Pumpe (Pfeiffer Vakuum, Asstar, Deutschland, TMU 520, 520 l/s) sich am Ende des Flugrohres unter dem Reflektor befindet. Die Drehschieberpumpe (Pfeiffer Vakuum, Köln, Deutschland, Duo16B, 16 m³/h) wird schwingungsgedämpft im Inneren des Gerätes gelagert. Eine zusätzliche Vorpumpe (Leybold AG, Köln, Deutschland, TRIVAC D1, 3 m³/h) dient zur Evakuierung der Schleusenvorkammer. Der Arbeitsdruck des Geräts liegt bei ca. $8 \cdot 10^{-7}$ mbar.

Als Laser steht ein Stickstofflaser (VSL 337 NDS Laser, Laser Science Inc. Cambridge, Massachusetts, USA) zur Verfügung. Die Pulsenergie des Lasers beträgt 300 µJ bei einer Pulslänge von 3 ns und einer Wellenlänge von 337 nm. Die Repetitionsrate kann über den Computer von 1 Hz bis 20 Hz gesteuert werden. Weiterhin wird die Laserenergie durch zwei drehbare Abschwächer gesteuert.

Auch bei diesem System wird analog zum „Lamma 2000“ der Laserstrahl koaxial mittels durchbohrter Spiegel und Linsen in das Gerät auf die Probe gebracht. Der Laserfokus beträgt bei optimaler Fokussierung und zwei bis dreifacher Schwellbestrahlungsstärke zwischen 12 µm und 20 µm (Abbildung 11) und liegt damit deutlich unterhalb der sonst üblichen Werte für Massenspektrometer, die sich meist im Bereich von 50 µm bis 500 µm befinden. Die Schwellbestrahlungsstärke wird auch bei diesem Gerät aus einer direkten Messung der Laserenergie bei hohen Energien an der Probenoberfläche und einer Charakterisierung des einstellbaren Abschwächers im Strahlengang bestimmt. Die minimale Laserenergie beträgt 0,12 µJ für Matrixsignal und 0,15 µJ für Analytsignal. Aus den Berechnungen ergeben sich die Schwellbestrahlungsstärken von 680 J/m² bzw. $2,3 \cdot 10^7$ W/cm² für Matrix und 500 J/m² bzw. $2,8 \cdot 10^7$ W/cm² für Analytmoleküle.

Diese Werte für die Schwellbestrahlungsstärken sind für einen Laserfokus von ca. 15 μm im Einklang mit dem thermischen Modell von Dreiswerd und Hillenkamp [140][141].

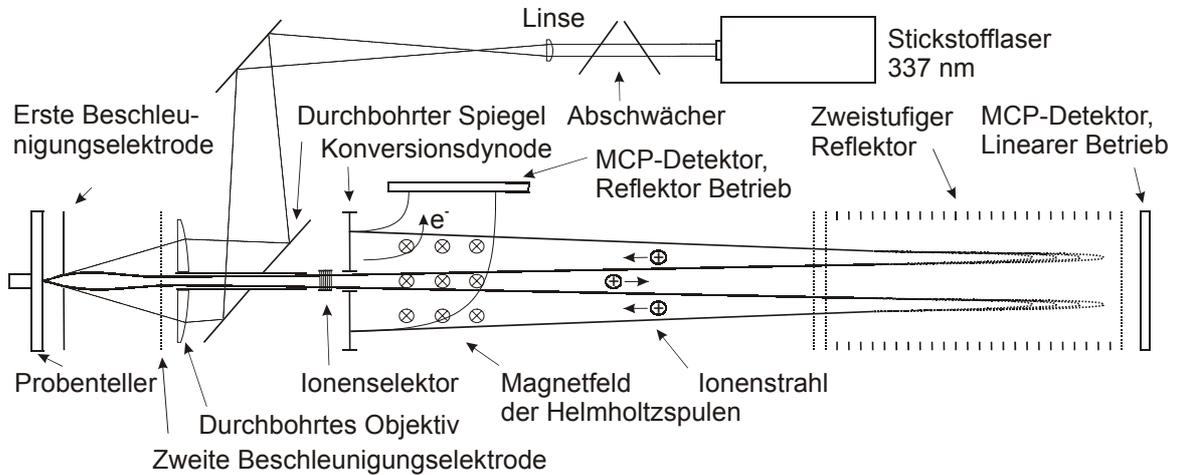


Abbildung 10: Aufbau Massenspektrometer "Aladim II"

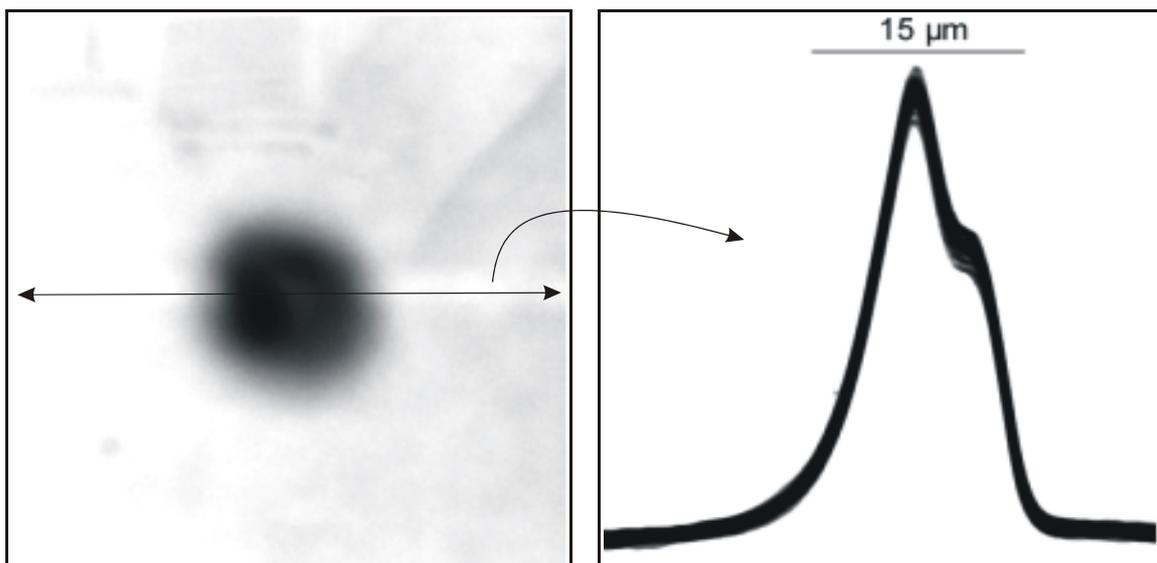


Abbildung 11: Raster-Elektronenmikroskop-Aufnahme des Laserfokus des Massenspektrometer "Aladim II", 1000 fache Vergrößerung

Die Probenpositionierung erfolgt durch eine exzentrisch drehbare Schubstange, mit der auch die Probe ins Vakuum eingeschleust wird. Zur Beobachtung der Probe steht ein System zur Verfügung mit dem ein Bereich von 2 mm x 2 mm mit einer Vergrößerung von 100 sichtbar wird. Die Beobachtung erfolgt hier nicht durch das Linsensystem des Lasers hindurch, sondern über einen Spiegel der im

(durch die Durchbohrung der Linse und des Hauptspiegels) ausgeblendeten Bereich der Linse angebracht ist. Die Beleuchtung der Probe erfolgt mit einer Quecksilberdampfampe koaxial mit der Laserbestrahlung.

Der prinzipielle Aufbau zur Beschleunigung der Ionen ist analog zum Lamma 2000 vollständig koaxial ausgeführt. Die Probe ist in einem Abstand von 2 mm zur ersten Lochblende angebracht und kann mit einer Spannung von 27 kV belegt werden. Die Ionenquelle wird zur Verbesserung der Auflösung und der Massengenauigkeit mit verzögerter Extraktion (Delayed Extraction, DE) betrieben. Dazu wird die Spannung an der ersten Lochblende nach einer definierten Zeitverzögerung nach dem Laserpuls von Probenpotential auf ca. 85 % – 90 % des Probenpotentials zur Beschleunigung der Ionen heruntergeschaltet. Eine weitere Gitterelektrode auf Massepotential im Abstand von 12 mm beendet die Beschleunigungsstrecke im Massenspektrometer. Im Linearbetrieb des Geräts kann die Probe auf ein Potential von 27 kV gelegt werden um auch im höhermolekularen Bereich bis ca. 100000 u Ionen detektieren zu können. Die Nachweiswahrscheinlichkeit von Ionen über Sekundärionen ist eine Funktion der Ionen- geschwindigkeit, so dass größere Molekülonen auf hohe kinetische Energien beschleunigt werden müssen, um nachweisbar zu sein. Im Reflektorbetrieb kann die Probe mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV betrieben werden, da der zweistufige Reflektor mit insgesamt 24 Ringen und drei Gittern bis 26 kV spannungsstabil ist. Zur Detektion von Post-Source-Decay Fragmentationen befindet sich nach der Ionenquelle und der axial durchbohrten Optik zur Laserfokussierung vor der Driftstrecke ein Mutterionenselektor zur Auswahl der zu fragmentierenden Ionen. Zur Aufnahme der Fragmentationen kann die am Reflektor anliegende Spannung schrittweise reduziert werden, um die durch den zweistufigen Reflektor begrenzten Massenfenster nacheinander aufnehmen zu können.

Entsprechend des Aufbaus des „Lamma 2000“-Instruments besitzt dieses Massenspektrometer als Detektorsystem eine Konversionsdynode zur Erzeugung von Sekundärelektronen aus den reflektierten Ionen. Diese Elektronen werden mittels eines magnetischen Feldes aus der axialen Richtung heraus auf einen Szintillator beschleunigt und erzeugen dort Photonen. Mit einem Photomultiplier wird daraus

dann ein elektronisches Signal erzeugt.

Die Datenaufnahme der Massenspektren sowie die Steuerung der Massenspektrometer erfolgt über die institutseigene Software Ulisses (Version 8.2, B. Spengler) und wird ausführlich in Kapitel 4 beschrieben.

3.3 Bedampfungsanlage

Die Vakuumbedampfungsanlage JEE-4B von Joel (Japan), ursprünglich eingesetzt zur Präparation von Proben für die Elektronenmikroskopie, wird hier zur MALDI-Präparation von biologischen Materialien (siehe Kapitel 5.3) verwendet.

Das Gerät besteht aus einer Glasglocke, die mit einer externen Gasballastpumpe (D12, 12 m³/h, Leybold AG, Köln, Deutschland) und einer internen Öldiffusionspumpe (130 l/min) evakuiert wird. Der Enddruck bei Einsatz der Öldiffusionspumpe liegt bei 1·10⁻⁵ mbar, mit der Gasballastpumpe allein werden 1·10⁻³ mbar erreicht. Die Kontrolle des Vakuums erfolgt über eine Vakuummessröhre der Firma Pfeiffer Vakuum (Aslar, Deutschland, Compact Full Range Gauge). Mit Hilfe verschiedener Ventile kann das Vakuum in der Glasglocke stufenlos von Atmosphärendruck bis 1·10⁻³ mbar eingestellt werden. In der Glasglocke befinden sich zwei unabhängige Elektrodensysteme die verschiedene Heizfäden oder Schiffchen aufnehmen können. Die Elektroden können mit einem Strom von bis zu 40 A beschickt werden, um eine Verdampfung der Materialien zu ermöglichen. Bei der Verdampfung von Matrix wird ein Schiffchen verwendet in dem bis zu 50 mg Material erhitzt werden können. Dabei ist zur Temperatursteuerung (bis 300 °C) ein Thermofühler an dem Schiffchen angebracht, um eine konstante Temperatur über einen längeren Zeitraum einzustellen.

4 Bildverarbeitung von Massenspektren

Die Aufarbeitung und Darstellung von Daten spielt in der bildgebenden Massenspektrometrie eine vorrangige Rolle. Entscheidend ist hierbei eine schnelle und automatische Darstellung der essentiellen Informationen in einer geeigneten Form. Die nachfolgende Verarbeitung umfasst eine automatische Signalanalyse in den Einzelspektren und eine Reduzierung der Daten auf die Zentroide des Signals und der Fläche unter dem Signal für jedes Einzelspektrum. Aus diesem Gesamtdatensatz werden anschließend Signale mit, im Rahmen der Messgenauigkeit, gleichen Massen herausgefiltert und zu einem Verteilungsbild für diese Masse zusammengefasst. Bei mehr als einem Laserpuls pro Probenstelle können sowohl Bilder für die Einzelspektren als auch für die Summation erstellt werden. Die Ergebnisse für ein Peptidgemisch zeigen, dass durch die automatische Bildauswertung schnell die Verteilung sowohl der Hauptkomponenten des Gemischs als auch typischer Matrixsignale oder Verunreinigungen sowie verschiedene Fragmente der Peptide für die Probe erstellt werden können. Mit diesem System können sowohl MALDI-Massenspektren von einzelnen Probenorten, als auch Ionenverteilungsbilder einzelner Massen und damit Verteilungen unbekannter Probenbestandteile erstellt werden. Bei einer genaueren Analyse der Massenspektren zeigt sich, dass zusätzlich zu den Verteilungsbildern einer Masse auch ein Höhenprofil dieser Masse erstellt werden kann, also dreidimensionale Massenspektrometrie möglich ist. Das hier vorgestellte Messverfahren und die Bildaufarbeitung ohne Massenvorgabe stellt eine wesentliche Voraussetzung dar, um Analytik an komplexen Systemen wie z.B. Zelloberflächen von kultivierten Einzelzellen, Geweben oder Zellbestandteilen durchführen zu können und eröffnet gleichzeitig neue Möglichkeiten zur Verbesserung der Präparationstechnik und zur Untersuchung des MALDI-Prozesses.

4.1 Datenaufnahme und Datenverarbeitung

Die Datenaufnahme der Massenspektren an den Geräten „Aladim II“ und „Lamma 2000“ sowie die Steuerung der Massenspektrometer erfolgt, wie in Kapitel 3 bereits angesprochen, über die institutseigene Software Ulisses (Version 8.2, B. Spengler, Analytische Chemie, Universität Gießen). Einzelschussspektren und Summenspektren von bis zu 400 Schuss können damit aufgenommen und gespeichert werden. Es besteht die Möglichkeit, die Messung mit bis zu vier Stützpunkten zu kalibrieren und eine automatische Signalerkennung bei der Vorgabe einer zu erwartenden Auflösung und einer Schwellintensität durchzuführen. Die Laserenergie kann über den Computer während der Messung variiert werden, um eine optimale Intensität der Signale zu erzielen.

Zur Aufnahme der Ionenverteilungsbilder am „Lamma 2000“ sind zusätzlich eine Steuerung des Piezotisches und des Schrittmotortisches in das Programm integriert. Zur schnelleren Aufnahme der Spektren wurde bei diesem Gerät eine Transientenrekorderkarte (Precision Instruments 9825 Control, 200 Megasamples/s) gewählt, da so die Karte direkt in den Computer integriert und höhere Repetitionsraten des Lasers realisiert werden. Dabei kann ein Bereich von maximal 400 mal 400 Punkten bei einer Größe von 100 μm mal 100 μm abgerastert werden. Bis zu vier Massen eines Spektrums können ausgewählt werden um ein Voransichtbild der maximalen Intensitäten dieser Massensignale zu erzeugen. Der Aufbau dieser Bilder und die Ausschnitte der Spektren bei den vier ausgewählten Massen können zur Kontrolle des Gerätes online verfolgt werden. Gleichzeitig ist es möglich die Einzelspektren auf den Computer zur weiteren Auswertung abzuspeichern. Es können zwischen 1 und 32 Einzelpuls-Massenspektren pro Pixel des Verteilungsbildes aufgenommen werden. Aufgrund der maximalen Repetitionsrate (20 Hz) des Lasers und der Verarbeitungsgeschwindigkeit des Computers sind, bei Aufnahme eines Verteilungsbildes bei 100 mal 100 Bildpunkten und 4 Laserpulsen pro Punkt Repetitionsraten zwischen 5 und 10 Hz zu erreichen, so dass die Aufnahme eines solchen Bildes zwischen 15 und 90 Minuten dauert. Die Bilder können von der Software Ulisses abschließend wahlweise im 8 Bit oder 16 Bit Graustufen Tiff-Format abgespeichert werden.

Nachdem die bis zu 40000 Einzelschussspektren gespeichert worden sind, folgt eine Aufarbeitung der Spektren zu Ionenverteilungsbildern ohne die Vorgabe einer bestimmten Masse. Dafür wird zunächst eine automatische Peakerkennung bei der Vorgabe der zu erwartenden Auflösung und einer Schwellintensität durchgeführt. Die erzeugten charakteristischen Daten zur Beschreibung der Massensignale (Kanalzahl der Zentriode, Masse der Zentroiden, Fläche des Signals, Maximum des Signals, Auflösung des Signals, etc.) werden in einer Report-Datei zum Einzelspektrum abgelegt. Bis zu 150 Datenpakete von Massensignalen können pro Spektrum in einer Datei abgespeichert werden. Da von der Auswahl der zwei Parameter, Schwellintensität und erwartete Auflösung, die Qualität der später erzeugten Bilder abhängt, ist diese Auswahl mit besonderer Vorsicht und Sorgfalt zu treffen und durch Tests an ausgewählten Spektren zu optimieren. Die erwartete Auflösung ist ein gerätespezifischer Parameter und liegt beim Lamma 2000 zwischen 600 und 1200 im Linearbetrieb und zwischen 1000 und 2000 im Reflektorbetrieb. Die Schwellintensität hängt vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Messung ab. Wenn, wie bei diesem Betriebsmodus meist üblich, im empfindlichsten Messbereich der Transientenrekorderkarte (40 mV volle Skala) gemessen wird, beträgt das Rauschsignal ca. 1 bis 1,5 mV, so dass für die Schwellintensität, die in Prozent der vollen Skala angegeben wird, ein Wert ab 5 Prozent (2 mV Signal) erst sinnvoll ist. Durch die Begrenzung auf maximal 150 Massensignale pro Messung sind jedoch Schwellwerte im Bereich von 8 bis 15 Prozent für eine sinnvolle Auswertung der Messung zu wählen. Dies entspricht einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 2 bis 4 und damit einem klar erkennbaren Signal.

Die weitere Auswertung der Messung erfolgt in einem neu erstellten zusätzlichen Programm (Ulisses Imaging Tool (UIT), Version 1.2). In diesem Programm werden zunächst die Report-Dateien der Einzelmessungen eingelesen und die Masse und die Gesamtfläche des Signals sowie die Koordinate der Messung in eine Matrix geschrieben und als Gesamtdatei abgespeichert [142].

Zur Erzeugung von Ionenverteilungsbildern einer bestimmten Masse muss zunächst ermittelt werden, bei welcher Masse sich ein sinnvolles auswertbares Bild ergibt. In diese Überlegung muss die Schwankungsbreite eines gemessenen

Signals, also die Massengenauigkeit des Massenspektrometers eingehen, da alle Signale innerhalb einer solchen Schwankungsbreite möglicherweise derselben Substanz entsprechen und somit als Bild eines gemeinsamen Massesignals angesehen werden sollten. Um allerdings auch hier die zufälligen Signale (Chemisches Rauschen) von einem wirklichen Signal einer Substanz unterscheiden zu können, spielt die Anzahl der Signale im Verhältnis zur Anzahl der Einzelspektren eines Bildes eine Rolle. Als Beispiel dient eine Messreihe aus einem Bereich von $100\ \mu\text{m}$ mal $100\ \mu\text{m}$ mit einer räumlichen Auflösung von $1\ \mu\text{m}$ mit 10000 Einzelspektren. Aus diesen Einzelspektren wurden die ausgewerteten Massen mit ihrer Intensität den Koordinaten der Messreihe zugeordnet. Erstellt man ein Histogramm über die Anzahl der Signale in einem bestimmten Massenbereich so kann aus den Maxima der Anzahl der Signale auf ein verwertbares Bild in diesem Bereich geschlossen werden. In Abbildung 12 ist die Anzahl der Signale gegen das Masse-Ladungs-Verhältnis aufgetragen.

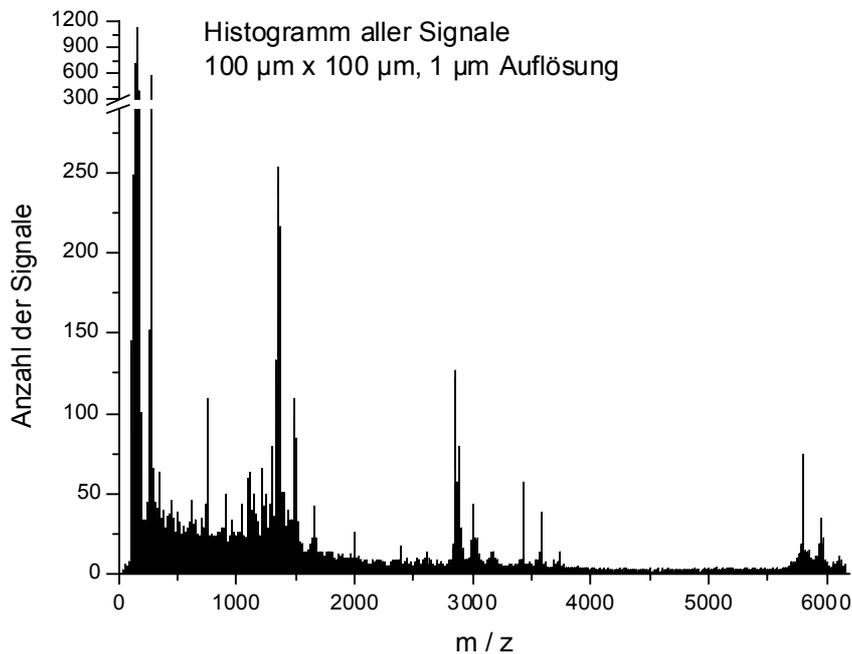


Abbildung 12: Anzahl der erfassten Signale in einem Massenbereich

Die Zuordnung der Signale zu bestimmten Massenfenstern muss derart erfolgen, dass die Massenfenster (z.B. $0,1\ \text{u}$) eine höhere Auflösung haben als die Massen-

genauigkeit der Messungen (Ungenauigkeit mindestens 0.3 u), da sonst zwei benachbarte und aufgelöste Signale in ein Massenfenster fallen und so in der Auswertung nicht mehr zu trennen sind. Jedes der Maxima, das klar aus dem Rauschen in Abbildung 12 heraustritt, kann als sinnvoll verwertbare Masse für ein Verteilungsbild betrachtet werden. Um ein solches Bild zu erstellen werden alle um das Maximum der Signalanzahl liegenden Signale zu einem Verteilungsbild zusammengesetzt (Abbildung 13).

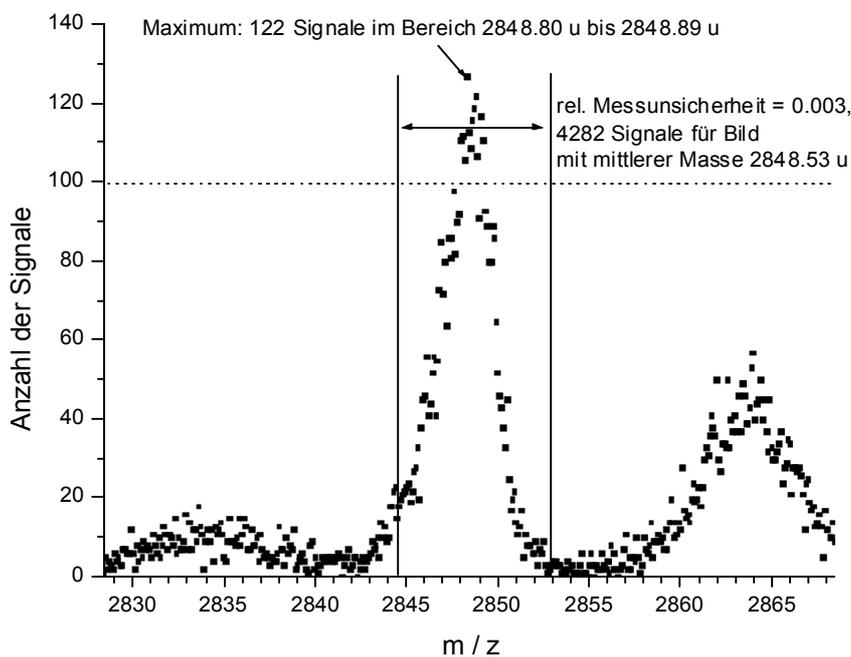


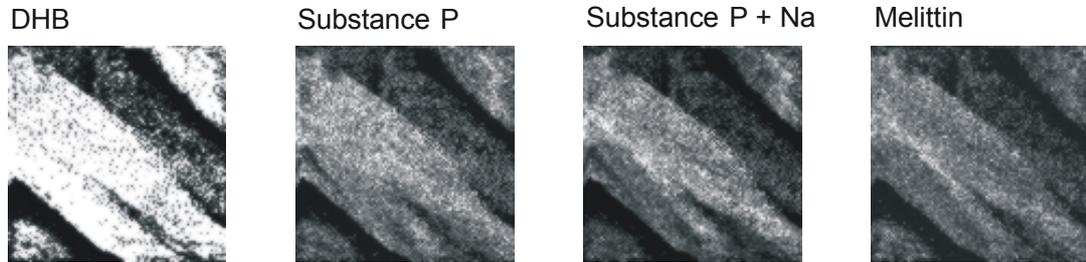
Abbildung 13: Auswahl der Signale zu einem Verteilungsbild

Die Intensitäten werden in 16 Bit Graustufen umgesetzt und repräsentieren jeweils ein Pixel des Verteilungsbildes. Die Massenbreite der zugehörigen Massenfenster eines Bildes wird durch die relative Messunsicherheit (0.003) bzw. durch einen absoluten Mindestwert (0.6 u) der Messung bestimmt und kann im Programm festgelegt werden. Zu jedem Bild wird aus den Massen und Intensitäten der Signale zusätzlich eine intensitätsgewichtete mittlere Masse bestimmt. Das Programm erzeugt auf diese Weise aus allen gefundenen Maxima im Histogramm, angefangen mit dem größten Maximum, bis zu einer selbstgewählten, unteren Grenze Verteilungsbilder. Als Abbruchkriterium wird ein prozentualer Mindestwert

der Anzahl der Signale pro Massenfenster, bezogen auf die Gesamtanzahl der Einzelmessungen, festgelegt. Als Beispiel entspricht ein Prozent der Anzahl der Einzelspektren 100 Signalen pro Massenfenster als Abbruchkriterium. Zusätzlich können auch Messungen ausgewertet werden bei denen bis zu 32 Laserpulse pro Probenstelle aufsummiert werden. Dies führt zu einer Verbesserung der Bildqualität, weil so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert werden kann (Abbildung 14). Da alle Einzelspektren einer solchen Messung gespeichert und aufgearbeitet werden, können sowohl aus allen gemittelten Signalen eine Reihe von Bildern, als auch der erste und jeder weitere Laserpuls pro Probenstelle einzeln bzw. jede mögliche Summation der Laserpulse zu einer Reihe von Verteilungsbildern zusammengefügt werden. Die erstellten Bilder werden wahlweise einzeln oder gemeinsam für den gesamten Bildsatz mit dem intensivsten Signal auf den maximalen Wert des 16 Bit-Graustufenbildes normiert. Letzteres ermöglicht, dass die realen Intensitätsverhältnisse zwischen den Bildern erhalten bleiben, während bei Einzelbild-Normierung durch Bilder mit sehr schwachen Intensitäten mit genügendem Kontrast erzeugt werden können. Die Parameter der Bildaufarbeitung wie z.B. Masse, Größe des Bildes, Breite des Massenfensters, Schwellintensität, maximale Intensität usw. werden sowohl mit dem Bild als auch in einer zum Bildsatz gehörenden Kommentardatei abgespeichert. Das beschriebene Verfahren ermöglicht, von einer Probenstelle einen Satz Verteilungsbildern der intensivsten Signale zu erzeugen, ohne dass eine Vorgabe der erwarteten Massen geschehen muss (Abbildung 15). Um ein Übersichtsspektrum des ausgewählten Probenbereiches zu erhalten, können sowohl Bildpunkte ausgewählt als auch alle Bildpunkte des Bildausschnittes aufaddiert werden.

Zahl der Laserschüsse pro angefahrene Probenstelle

Einzelschuß pro Pixel



4 Laserschüsse gemittelt

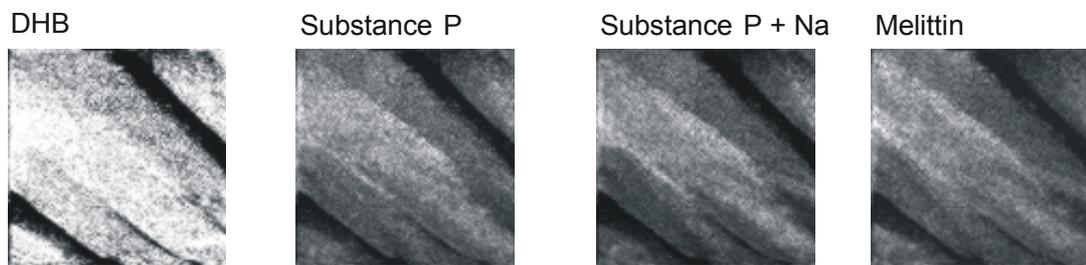


Abbildung 14: Summation der Einzelspektren

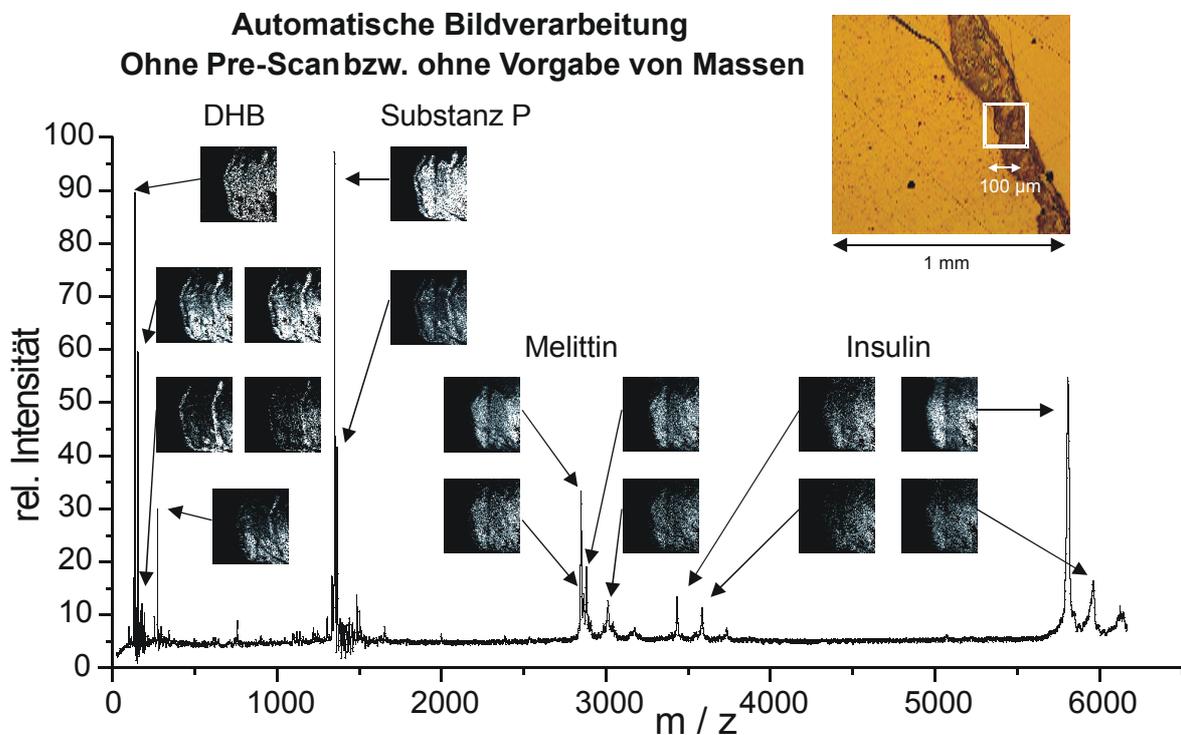


Abbildung 15: Automatische Bildverarbeitung einer Messreihe

In einer geplanten Weiterentwicklung der Auswertesoftware soll eine vollständige Automatisierung dieser Auswertung erfolgen, ohne dass die Daten von zwei getrennten Programmen bearbeitet werden und softwarebedingte Begrenzungen wie z.B. eine maximale Anzahl der Label pro Einzelmessung nötig sind. Weiterhin soll eine Zuordnung der Bildpunkte zu den Einzelspektren des Bildpunktes möglich sein (Abbildung 16).

Zuordnung jedes Bildpunktes [x;y] zu den zu Grunde liegenden Einzelspektren

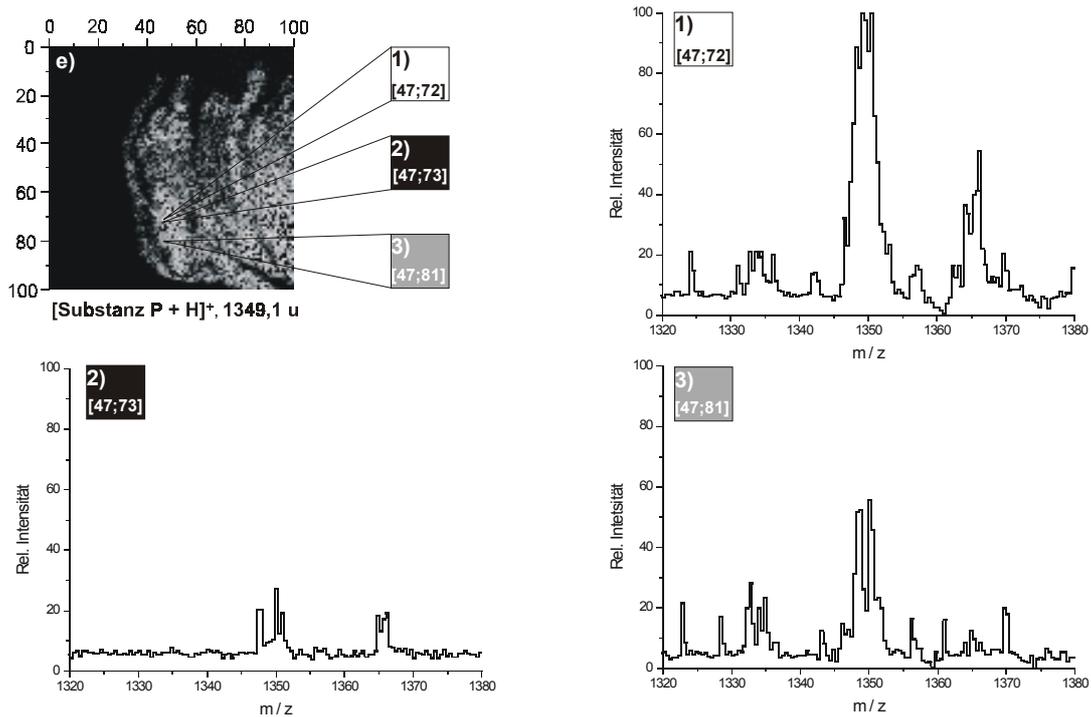


Abbildung 16: Zuordnung Bildpunkt - Massenspektrum

4.2 Dreidimensionale Massenspektrometrie

Die in Kapitel 2.2 dargestellten Bewegungsgleichungen eines linearen Massenspektrometers (Gleichung 5) und die Gleichungen, die sich aus dessen prinzipbedingten Fehlern ergeben (Gleichung 14, Seite 67) zeigen, dass die Flugzeitfehler, die bei der normalen Massenspektrometrie kompensiert werden sollen, im Falle der SMALDI-Massenspektrometrie gezielt genutzt werden können. Die durch die verschiedenen Probenhöhen bedingten Energievariationen der erzeugten Ionen können zur Bestimmung aller drei Raumkoordinaten ihres Herkunftsortes auf der Probenoberfläche genutzt werden [143]. Dabei ist auf eine streng koaxiale Geometrie des Massenspektrometers, sowie der Ionenoptik zu achten. Hier zeigt sich ein Vorteil der koaxialen Anordnung der Optik mit durchbohrten Linsen zum Ionen transfer. Durch den senkrechten Einfall des Laserlichtes auf die Probe sowie die koaxiale Anordnung der Ionenoptik werden Laufzeitunterschiede durch eine unsymmetrische Verdampfungswolke vermieden [98], die die Energievariation aufgrund der Probenhöhe überlagern könnten und eine räumliche Fokussierung des Ionenstrahls auf den Detektor erschweren. Gleichzeitig muss auf Maßnahmen zur Verbesserung der Auflösung wie verzögerte Extraktion oder den Einsatz eines Ionenreflektors verzichtet werden.

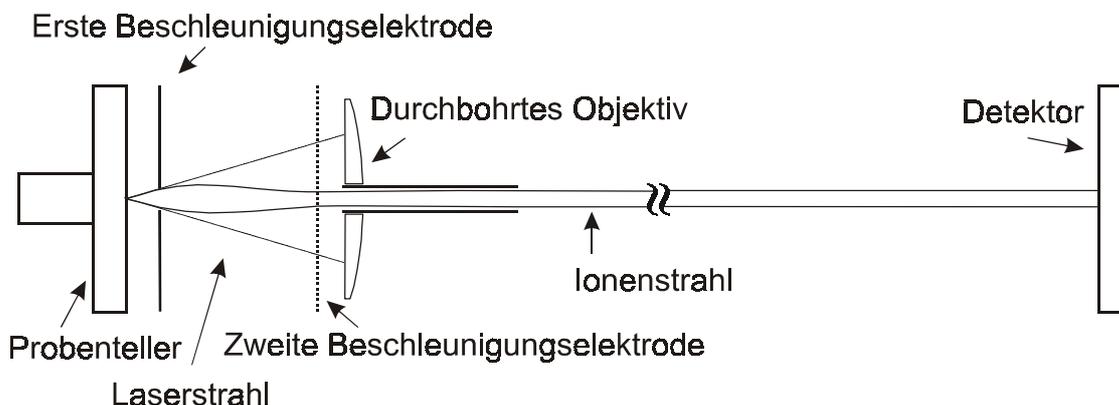


Abbildung 17: Aufbau der Quelle zur dreidimensionalen Massenspektrometrie

Um zu einer Konfiguration zu gelangen, bei der die Startzeitfehler eine geringere Rolle spielen als die Energievariationen, muss die Flugstrecke möglichst lang und die Beschleunigungsspannungen nicht zu hoch gewählt werden. Gleichzeitig ist allerdings eine hohe Feldstärke im Bereich der Probenoberfläche notwendig, um

einen möglichst großen Abfall der resultierenden kinetischen Energie aufgrund der Höhe der Probe zu erzeugen.

Damit die Energievariationen der Ionen aufgrund ihrer Höhe abgebildet werden können, muss die Ionenquelle die folgenden Aufgaben erfüllen:

1. Räumliche Fokussierung des Ionenstrahls aus der Ionenquelle heraus auf den Ionendetektor.
2. Zeitliche Fokussierung des Ionenstrahls auf den Detektor.
3. Erzeugung einer großen Abhängigkeit der Flugzeit vom Entstehungsort der Ionen.

Die in Abbildung 17 gezeigte Ionenquelle besteht daher aus zwei Beschleunigungszone und einem streng coaxialen Aufbau. In der ersten Beschleunigungszone wird eine hohe Feldstärke an der Probenoberfläche erzeugt. An die Probenoberfläche wird dabei ein höheres Potential angelegt als an die erste Beschleunigungselektrode. Aus der Probe freigesetzte Ionen werden in Richtung auf die zweite Elektrode beschleunigt. Zwei freigesetzte Ionen, deren Entstehungsorte sich nur in der Z-Koordinate unterscheiden, erfahren dabei unterschiedliche Beschleunigungen und erreichen somit unterschiedliche kinetische Energien beim Verlassen der Beschleunigungszone. Je weiter der Startort eines Ions in Z-Richtung von der ersten Beschleunigungselektrode entfernt ist, desto größer ist die kinetische Energie, die dieses Ion auf dem Weg vom Probenteller zur ersten Beschleunigungselektrode aufnimmt. Das bedeutet, dass Ionen aus tieferen Probenschichten eine höhere kinetische Energie erhalten als Ionen, die von höheren Startorten der Probenoberfläche aus beschleunigt werden. Eine geringere kinetische Energie des Ions verlängert die Flugzeit, die es benötigt, um den Ionendetektor zu erreichen. Auf der anderen Seite legen Ionen aus erhöhten Startorten insgesamt eine geringfügig kürzere Flugstrecke (Flugstreckenfehler) bis zum Ionendetektor zurück. Bei gleicher kinetischer Energie führt dies zu einer Flugzeitverkürzung des von einem höheren Startort gestarteten Ions auf dem Weg zum Detektor.

Die Fehler die zur Begrenzung von Auflösung und Massengenauigkeit führen, lassen sich wie in Kapitel 2.2 beschreiben in drei Klassen einteilen:

1. Startzeitfehler
2. Energiefehler
3. Flugstreckenfehler

Um zu zeigen wie sich diese drei Fehler auf das Massenaufklärungsvermögen eines Massenspektrometers auswirken, wird die empirisch ermittelte Flugzeitformel (Gleichung 7) auf eine virtuelle Flugzeitformel projiziert, die das experimentell ermittelte Flugzeitverhalten mittels eines gedachten linearen, mit statischen elektrischen Feldern ausgestatteten Flugzeitmassenspektrometers darstellt [46].

$$t = {}^*t_0 + b' \cdot \frac{{}^*L}{\sqrt{{}^*U}} \cdot \sqrt{m/z}$$

Gleichung 8

Es gilt:

* t_0 : virtueller Startzeitpunkt,

* L : virtuelle Flugstrecke und

* U : virtuelle Beschleunigungsspannung.

Dazu wird das Auflösungsvermögen, wie in der Flugzeitmassenspektrometrie üblich, mittels der FWHM-Definition („full width at half maximum“) definiert. Für das Massenaufklärungsvermögen R gilt dann:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \approx \frac{t}{2\Delta t}$$

Gleichung 9

Prinzipiell wird das Massenaufklärungsvermögen R definiert als die höchste Masse bei der die Nachbarmassen (Massenabstand 1 u) nicht oberhalb ihrer halben Sig-

nalhöhe überlappen. Diese Definition ist jedoch nicht bei einer gegebenen gemessenen Masse anwendbar, daher ist eine Näherungsrechnung über die Breite eines zu bestimmenden Massesignals in Masseneinheiten bei halber Signalthöhe praktisch und sinnvoll. Das Massenaufhebungsvermögen R kann auch näherungsweise direkt aus den Flugzeiten der Ionen bestimmt werden.

Flugstreckenfehler spielen in realen Systemen eine Rolle, wenn nicht-ebene bzw. gekippte Detektorsysteme zu schrägen Auftreffflächen der Ionen führen. Da in dem genutzten System auf eine koaxiale Geometrie geachtet wurde, spielen diese Fehler eine untergeordnete Rolle und gehen in die Flugzeitvariationen kaum ein. Es ergibt sich ein nicht zu vernachlässigender Flugstreckenfehler aufgrund der verschiedenen Starthöhen der Ionen, dieser ist jedoch klein gegenüber der Energievariation aufgrund der Höhe und in einem realen System bei Höhenvariationen im μm -Bereich kaum noch messbar.

Die Auswirkungen von Energiefehlern lassen sich auch als eine Halbwertsenergieverteilung zwischen $(^*U_e + \alpha \cdot ^*U_e)$ und $(^*U_e - \alpha \cdot ^*U_e)$ zum Startzeitpunkt beschreiben, die sich bis zum Detektor fortsetzt.

Hierbei gilt:

$$t_{\max} = ^*t_0 + b' \cdot \frac{^*L}{\sqrt{(1-\alpha) \cdot ^*U}} \cdot \sqrt{m/z}; \quad t_{\min} = ^*t_0 + b' \cdot \frac{^*L}{\sqrt{(1+\alpha) \cdot ^*U}} \cdot \sqrt{m/z}$$

Gleichung 10

$$\Rightarrow \Delta t = \frac{\sqrt{(1+\alpha)} - \sqrt{(1-\alpha)}}{\sqrt{1-\alpha^2}} + b' \cdot \frac{^*L}{\sqrt{^*U}} \cdot \sqrt{m/z}$$

Gleichung 11

Da $^*t_0 \ll t_{\text{gesamt}}$, gilt in erster Näherung:

$$\Rightarrow R = \frac{m}{\Delta m} \approx \frac{t}{2\Delta t} \approx \frac{\sqrt{1-\alpha^2}}{2 \cdot (\sqrt{(1+\alpha)} - \sqrt{(1-\alpha)})}$$

Gleichung 12

Bei einer gegebenen Energieverteilung ist demnach das Massenauflösungsvermögen konstant und eine Berechnung der Höhe auf der Basis der Energiefehler massenunabhängig.

Die Startzeitfehler, die sich bei der durch die Ionisation und Desorption bedingte Verteilung der Ionen nicht vermeiden lassen, haben aufgrund der angenommenen statischen elektrischen Felder eine Verteilung die bis zur Detektion erhalten bleibt. Für eine Halbwertsverteilung zwischen $(t_0 + \alpha \cdot t_0)$ und $(t_0 - \alpha \cdot t_0)$ kann angenommen werden:

$$t_{\max} = (1 + \alpha) \cdot t_0 + b' \cdot \frac{L}{\sqrt{U}} \cdot \sqrt{m/z}; \quad t_{\min} = (1 - \alpha) \cdot t_0 + b' \cdot \frac{L}{\sqrt{U}} \cdot \sqrt{m/z}$$

Gleichung 13

$$\Rightarrow \Delta t = 2\alpha \cdot t_0$$

Gleichung 14

$$\Rightarrow R = \frac{m}{\Delta m} \approx \frac{t}{2\Delta t} = \frac{1}{4\alpha} + b' \cdot \frac{L}{4\alpha \cdot t_0 \sqrt{U}} \cdot \sqrt{m/z}$$

Gleichung 15

Das Auflösungsvermögen eines virtuellen Massenspektrometers bei einer konstanten Startzeitverteilung steigt mit längerer Flugstrecke, geringeren Beschleunigungsspannungen und steigenden Massen.

Es ist daher eine Feldstärke zu wählen, die mindestens so groß ist, dass der entstandene Flugstreckenfehler überkompensiert wird durch die verlängerte Flugzeit, die auf Grund der verringerten kinetischen Energie entsteht.

Hierbei gilt:

$$\frac{t_1}{t_2} = \sqrt{\frac{E_{kin2}}{E_{kin1}}}$$

Gleichung 16

mit

t_1 = Flugzeit eines Ions, das von einem Startort z_1 auf der Probenoberfläche gestartet ist,

t_2 = Flugzeit eines Ions, das von einem Startort z_2 vor der Probenoberfläche gestartet ist,

E_{kin1} = kinetische Energie des Ions mit Startort z_1 ,

E_{kin2} = kinetische Energie des Ions mit Startort z_2 .

In der verwendeten Ionenquelle werden Beschleunigungsfeldstärken in der ersten Beschleunigungszone von 750 V/mm verwendet.

Die räumliche Fokussierung des Ionenstrahls wird erzielt durch die Verwendung inhomogener elektrischer Felder um den Ionenstrahl räumlich auf den Ionen-detektor zu fokussieren und auf diese Weise eine effektive Transmission zu erzielen. Die zeitliche Fokussierung erreicht man durch Kombinationen von Felddimensionen (Elektrodenabständen) und Potentialen die in den zwei Beschleunigungsfeldern verwendet werden.

Ausgehend von der Gleichung 5 für ein lineares Massenspektrometer kann abgeschätzt werden, wie sich verschiedene Eigenschaften der Probe auf die Gesamtlaufzeit der Ionen auswirken.

$$t_{gesamt} = (2s + L) \cdot \sqrt{\frac{m}{2Uze}}$$

Gleichung 5

Die Länge der feldfreien Strecke L , da sie ein Geräteparameter ist, ist für diese Abschätzung konstant. Die Masse m des zu untersuchenden Ions sowie die Ladungszahl z des Ions können ebenfalls als invariant angesehen werden, da bei der folgenden Abschätzung nur Ionen innerhalb eines Massesignals betrachten werden sollen. Zur Abschätzung werden reale Parameter einer Messung am Massenspektrometer Lamma 2000 angenommen (Tabelle 2).

| | |
|---|----------|
| Masse m (Substanz P) | 1348.6 u |
| Ladungszahl z | 1 |
| Erste Beschleunigungsstrecke s_1 | 0.004 m |
| Zweite Beschleunigungsstrecke s_2 | 0.008 m |
| Driftstrecke L | 1.326 m |
| Potential an der Probe U_1 | 13000 V |
| Potential an der ersten Beschleunigungselektrode U_2 | 10000 V |
| Potential an der zweiten Beschleunigungselektrode U_3 | 0 V |

Tabelle 2: Daten zur Abschätzung der Gesamtflugzeit

Aus diesen Daten ergibt sich eine errechnete Gesamtflugzeit von 30,952 μs . Die gemessene Zeit in dem verwendeten Beispiel liegt bei 30,936 μs und somit für eine Abschätzung hinreichend richtig.

Da bei diesen Messungen mit einem Fokusbereich von ca. 1 μm gearbeitet wird, kann mithilfe optischer Überlegungen gefolgert werden, dass die gemessenen Ionen aus einem Höhenbereich kommen, der der Tiefenschärfe des Laserfokus von maximal 20 μm entspricht. Wird die Länge des Feldes (gleichbedeutend mit einer entsprechenden Flugstreckenverkürzung) und damit die Beschleunigungsstrecke s_1 um 10 μm variiert, so ergibt sich daraus eine maximale Variation der Gesamtflugzeit der Ionen von ca. 1 ns, da die Ionen nur eine kürzere Zeit in der Beschleunigungszone verweilen, aber die gleiche kinetische Energie nach der Beschleunigung besitzen. Dies ist zu wenig um die in den Messungen vorhandene Verteilung der Signale im Bereich von ca. 30 ns zu erklären. Als zweiter Effekt kommt jedoch eine Potentialänderung am Probenort in Frage, da die Probe nichtleitend ist und so die Feldlinien die Probe nahezu unverändert durchdringen und der Potentialabfall von der Ebene des leitenden Probenhalters sich in erster Näherung linear zur Höhe verhält. Ein Abfall des Potentials führt in der Gleichung 5 zu

einer Reduktion des effektiven Potentials am Startort zur Beschleunigung der Ionen. Ein Herabsenken der Spannung U um 15 V würde zu einer Verringerung der kinetischen Energie der Ionen für $m/z = 1348.6$ u nach der Beschleunigung und damit zu einer Verlängerung der Gesamtlaufzeit um etwa 15 ns führen. Im Gegensatz zur Variation der Beschleunigungsstrecke ergibt sich eine Verlängerung der Flugzeit von erhöhten Stellen der Probe. Dies konnte auch in den Beispielmessungen beobachtet werden. Aus dem linearen Zusammenhang zwischen effektivem Potential bzw. der Energie der Ionen und der Höhe der Probe kann dann eine Kalibrierung der Höhen durch Ermittlung der Abtragraten bei mehreren Laserschüssen pro Probenstelle erfolgen (Abbildung 24). Bei der hier beschriebenen Quelle ergibt sich bei 4 mm Beschleunigungsstrecke und 3 kV Potentialdifferenz ein Wert von $0,75 \text{ V}/\mu\text{m}$.

Zur Analyse eines Einzelbildes mit einem Höhenprofil mit Hilfe des Ulisses Imaging Tools wurden zunächst die Massenfenster eines Signals das normalerweise zu einem Bild zusammengefügt wird (Abbildung 13) so verkleinert, dass das Signal in mehrere Massenfenster aufgeteilt wird und daraus Einzelbilder entstehen (Abbildung 18). Den einzelnen Verteilungsbildern wird dann mit aufsteigender Masse bzw. Zeit ein Farbwert von blau nach rot zugeordnet.

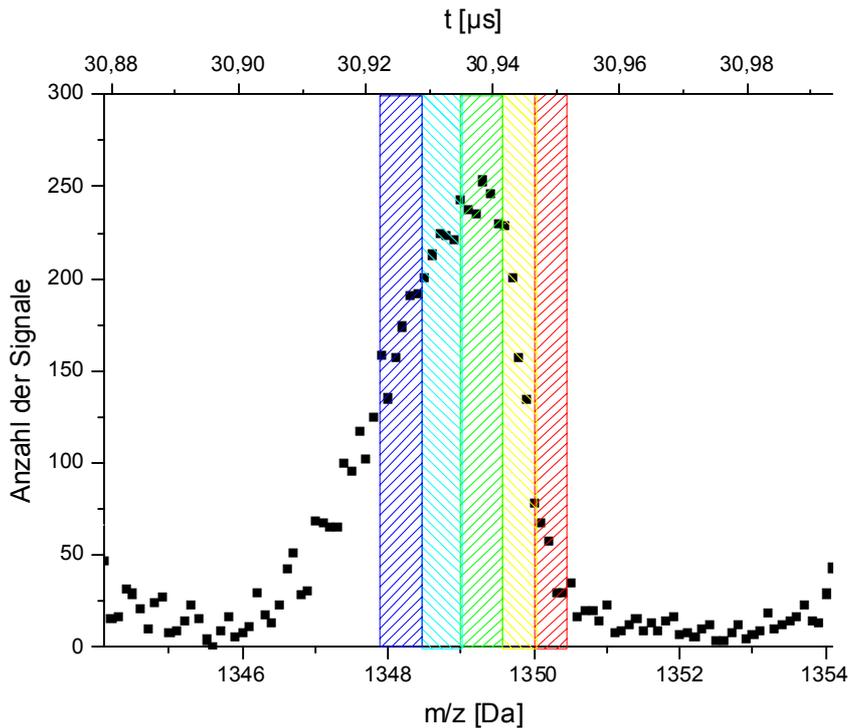
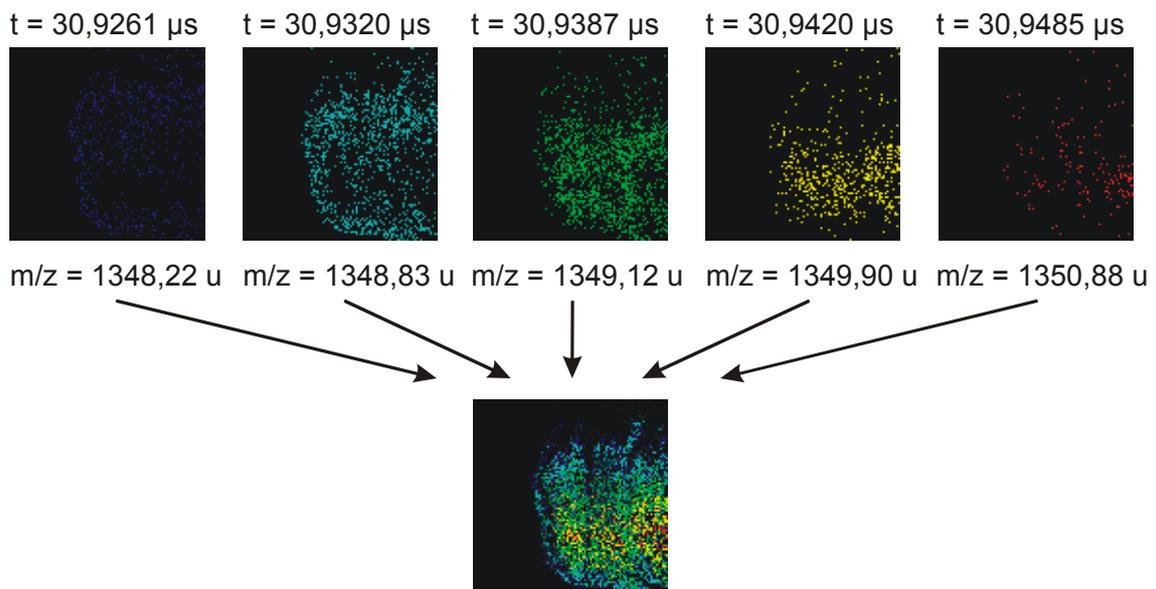


Abbildung 18: Erzeugung von Teilbildern einer Masse

In Abbildung 19 sind fünf der acht Einzelbilder mit den dazugehörigen Massen dargestellt. Es handelt sich um eine Dried-Droplet Präparation mit 2,5-DHB als Matrix und einem Peptidgemisch als Analyt (siehe Kapitel 5.1, Seite 82). Den fünf Einzelbildern mit Signalabständen im Bereich von 5 - 6 ns bzw. Massenabständen im Bereich von etwa $m/z = 0,5 - 0,6$ u werden Farben nach aufsteigender Probenhöhe zugeordnet. Es ist deutlich zu sehen, dass sich die fünf Bilder ergänzen und zu einem Gesamtbild zusammenfügen, das einen 2,5-DHB-Kristall zeigt. Die Signale kleinerer Massen bzw. Zeiten liegen im äußeren Bereich des Kristalls und werden blau dargestellt, während Signale größerer Masse im inneren Bereich des Kristalls liegen und gelb bzw. rot dargestellt sind. Dies lässt im Zusammenhang mit den Überlegungen zum effektiven Potential am Startort der Probe und den daraus folgenden Zeitverschiebungen darauf schließen, dass die Probe im gelben und roten Bereich dicker ist und so ein geringeres, effektiv auf die Ionen wirkendes Potential vorhanden ist. Das farbliche Gesamtbild des Signals zeigt damit nicht nur eine Verteilung dieses Ions in X- und Y-Richtung sondern auch ein Höhenprofil der

Probe in Z-Richtung das durch den farblichen Verlauf von blau nach rot dargestellt wird. Die Abbildung 20 verdeutlicht, dass mit dieser Auswertung Höhenprofile für Massen im Bereich von wenigen Massen bis $m/z = 6000$ u erstellt werden können und der abgebildete Bereich sich auch in optischen Bildern wiederfinden lässt (Abbildung 15, rechts oben).

Verteilungsbilder zu den jeweiligen Zeitfenstern



Gesamtbild der verschiedenen Zeit- bzw. Höhenfenster

Abbildung 19: Verteilungsbild mit Höhenprofil

Verteilungsbilder von Matrix und Analyt mit verschiedenen Aufarbeitungsmethoden

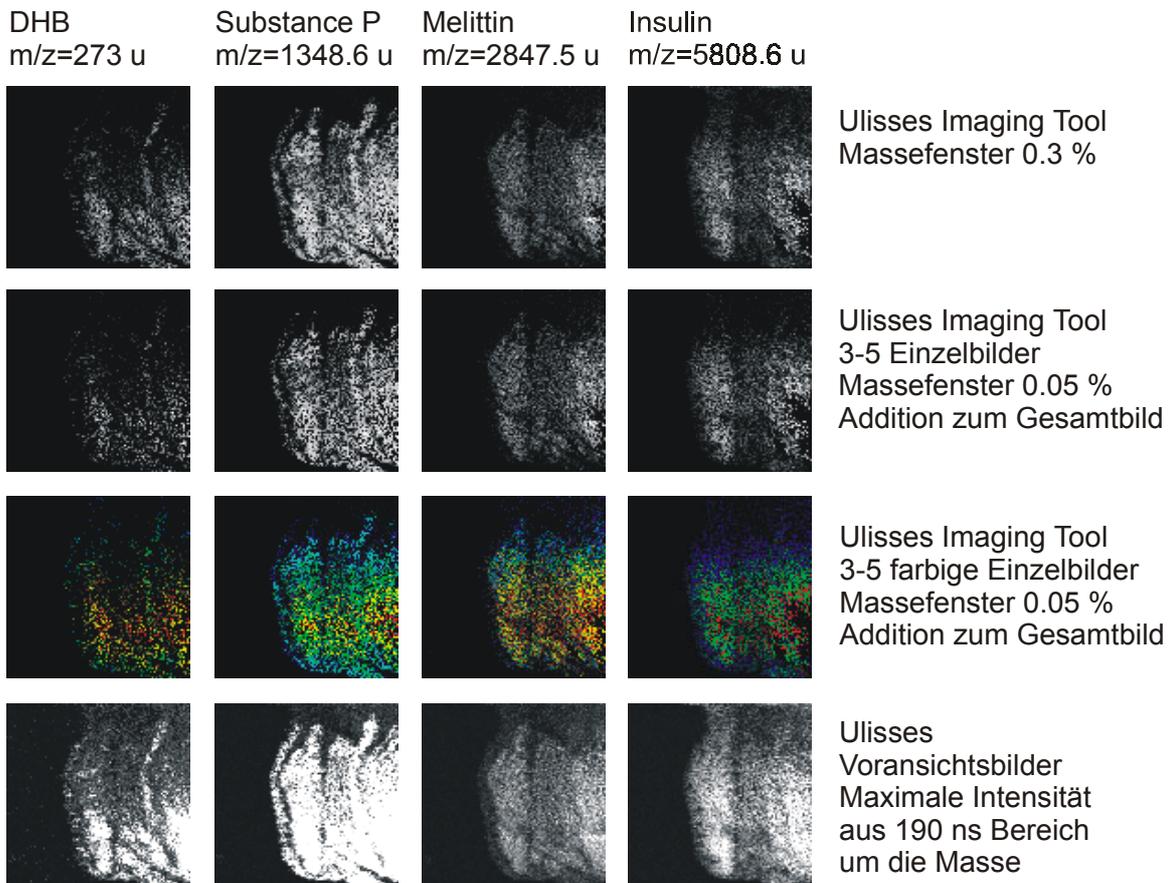


Abbildung 20: Verteilungsbilder mit verschiedenen Erzeugungsmethoden

Der Vergleich der verschiedenen Aufarbeitungsmethoden (Abbildung 20) um ein Verteilungsbild sowohl mit als auch ohne Höhenprofil zu erzeugen zeigt, dass das Zusammensetzen der Einzelbilder zu einem Verteilungsbild mit einem Informationsverlust verbunden ist. Auffällig ist die deutlich erhöhte Intensität der Voransichtsbilder (Abbildung 20, letzte Reihe), die online während der Aufnahme der Einzelspektren erfasst werden, gegenüber den von Imaging Tool erstellten Verteilungsbildern (Abbildung 20, erste Reihe). Dies ist einerseits mit den 190 ns breiten Massenfenstern der Voransichtsbilder zu erklären und andererseits mit den bei den später aufgearbeiteten Bildern gesetzten Grenzen zur Signalerfassung. Durch die breiten Massenfenster werden zum Beispiel bei der Masse 1348,6 u das maximale Signal im Bereich von ± 16 Massen um 1348,6 u als Bildpunkt aufgenommen. Dadurch können auch Nachbarsignale einer anderen Molekülmasse

mit erfasst werden. Als weiterer Faktor gehen die Grenzen zur Erfassung eines Signals in den Einzelspektren in die Auswertung ein. Kleinere Signale die unter dem Schwellwert liegen werden nicht mehr detektiert und führen so zu einer Herabsetzung der Gesamthelligkeit der Verteilungsbilder. Dieses Phänomen kann allerdings durch eine Verbesserung der Signalerfassung beseitigt werden. Genauso können die leeren Stellen bei größeren Massen und hohen Intensitäten (Abbildung 20, Vergleich erste und letzte Reihe, Insulin, $m/z = 5808,6$ u) auf die Begrenzung der maximal pro Einzelmessung erfassten Signale zurückgeführt und in einer späteren Version beseitigt werden. Die Abbildung 20 (zweite Reihe) verdeutlicht, dass auch beim Erstellen von mehreren Einzelbildern eines Massesignals zur Erstellung eines Höhenprofils Signale durch die Wahl der Breite der Massenfenster verloren gehen, oder die Zuordnung eines Signals zu zwei Bildern entstehen kann. Der Vergleich der aufsummierten Einzelbilder (zweite Reihe) mit den Bildern des Gesamtmassensignals (erste Reihe) zeigt, dass bei den aufsummierten Einzelbildern Signale nicht erfasst worden sind und somit für die farbliche Darstellung des Höhenprofils nicht mehr zur Verfügung stehen. Um diesem Phänomen aus dem Weg zu gehen erfolgte in einer weiteren Version der Bildgebungssoftware die Aufarbeitung des Höhenprofils durch eine direkte Zuordnung von Farbwerten zu den Flugzeitabweichungen aus einem Bild.

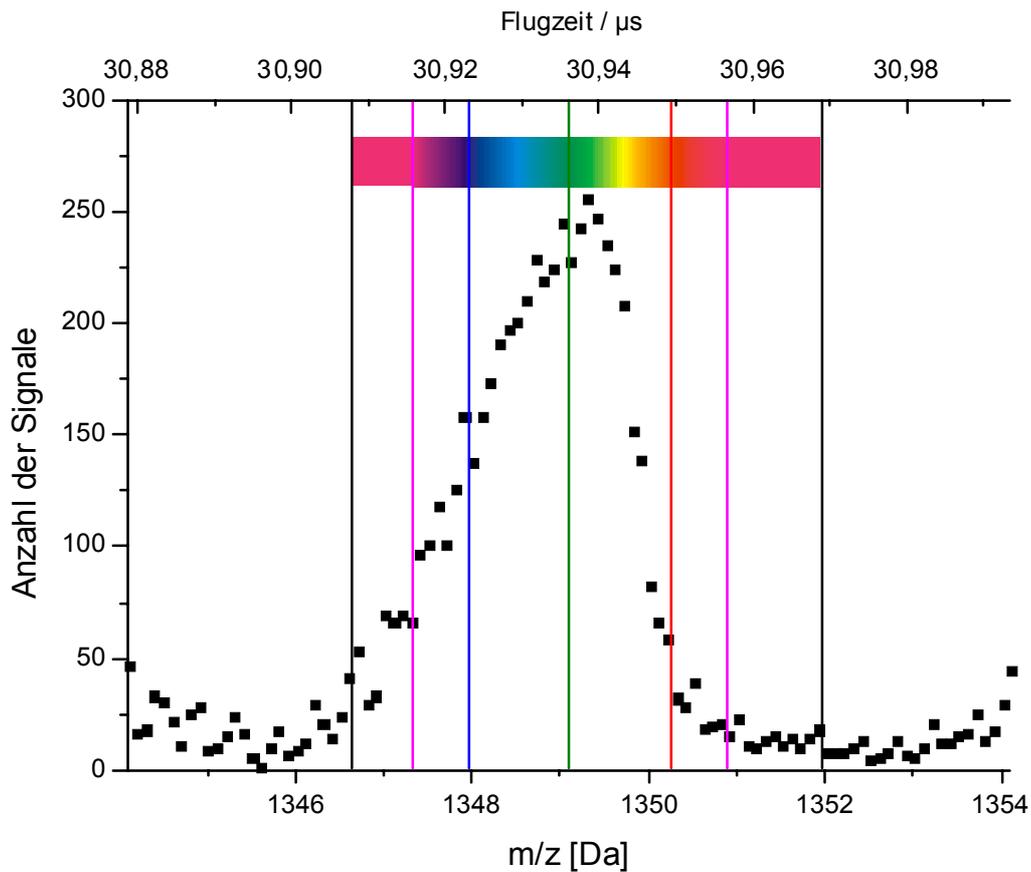


Abbildung 21: Höhenprofil durch Farbwertzuordnung

Hierbei wird die mittlere nach Intensität des Signals gewichtete Masse eines Ionenverteilungsbildes als mittlerer Wert in einer von blau über grün nach rot gehenden Farbskala angesehen (Abbildung 21). Zur Einstellung des optimalen Farbprofils zur Darstellung des Höhenprofils werden weitere Massen zur Festlegung des blauen Farbwertes und des roten Farbwertes gewählt. Einer kleineren Masse bzw. Flugzeit wird die Farbe Blau zugeordnet, und einer größeren Masse als die mittleren Masse wird rot zugeordnet. Aus diesen drei Punkten kann nun jeder Masse innerhalb des Ionenverteilungsbildes ein Wert innerhalb der Farbskala zugeordnet werden. Bei einer Masse unterhalb des blauen oder oberhalb des roten Farbwertes wird die Zuordnung zunächst linear fortgesetzt, bis die Farbe Magenta erreicht wird. Alle kleineren oder größeren Massen werden dann konstant in Magenta dargestellt. Abbildung 22 zeigt die verschiedenen Aufarbeitungen

und zweidimensionalen Darstellungen der Ionenverteilungsbilder. Sowohl eine Darstellung der Masseintensitäten als auch der Höhen in Graustufen sowie die Kombination beider Informationen durch die Farbzuordnung der Höhe ist möglich. Durch die direkte Zuordnung der Farbwerte werden die Höhenprofile im Vergleich zu Abbildung 20 (dritte Reihe) klarer dargestellt, und eine dreidimensionale Darstellung (Abbildung 23) veranschaulicht den in diesem Beispiel abgebildeten Matrixkristall sehr gut im Vergleich zum lichtoptischen Bild (Abbildung 15, rechts oben).

Verteilungsbilder einer MALDI-Präparation
 100 µm x 100 µm mit 1 µm lateraler Auflösung

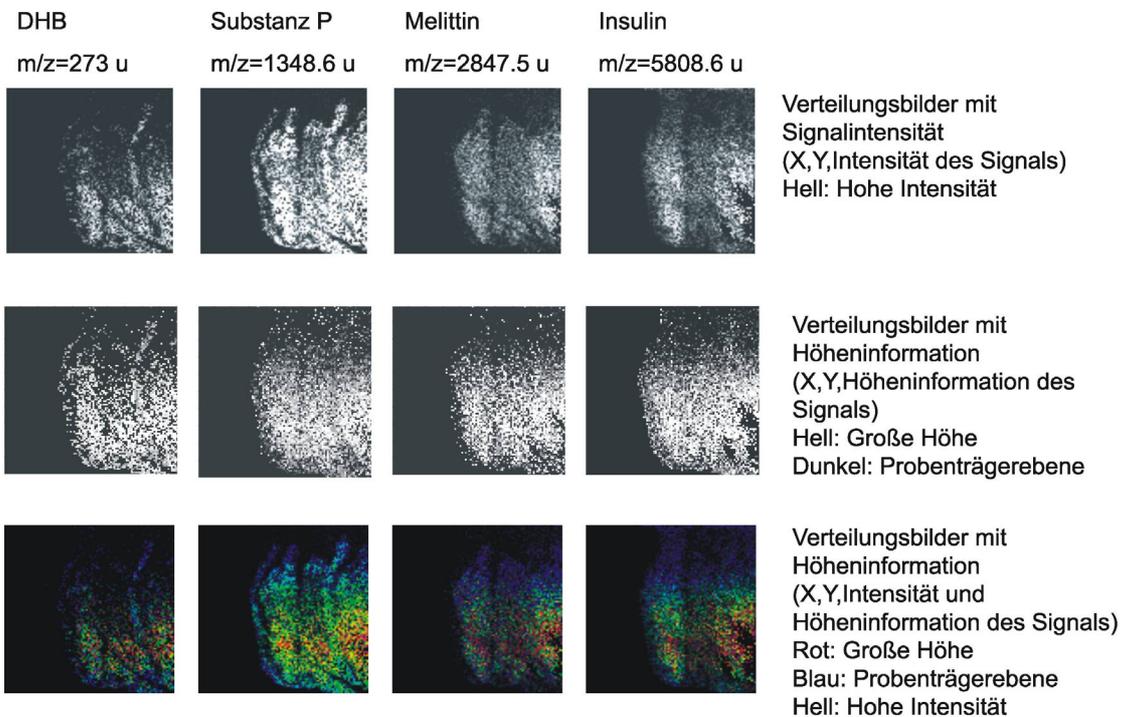


Abbildung 22: Intensitäts-, Höhenprofil und Kombination

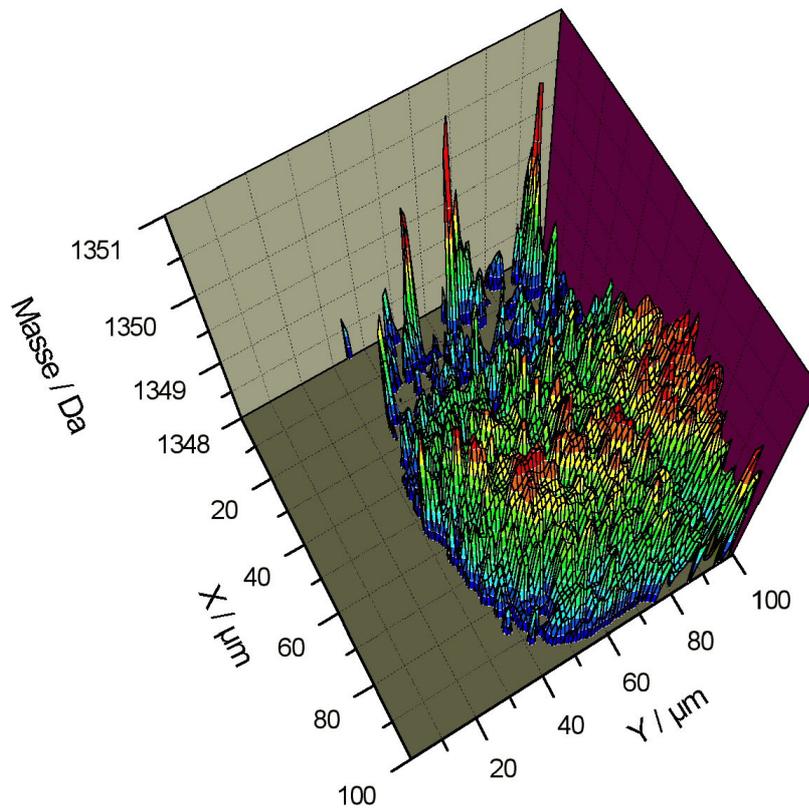


Abbildung 23: Dreidimensionale Darstellung der Proben-topologie

Da allerdings von diesem Kristall eine ganze Reihe verschiedener Bildern zu verschiedenen Massen existiert wird deutlich, welche Fülle von Informationen in diesem eigentlich fünfdimensionalen Datensystem enthalten sind. Je nach Darstellung können drei oder vier ausgewählte Dimensionen herausgegriffen werden, um bestimmte analytische Aussagen wie z.B. die Verteilung einer Substanz oder die Topologie der Probe zu visualisieren.

Zusätzlich konnte aus Messungen an Standardproben die Ablation der Probenoberfläche pro Laserschuss ermittelt werden. Durch die Software ist es möglich ein Bild, das aus mehreren Laserschüssen pro Pixel besteht, in die Bilder der Einzelschüsse zu zerlegen und für jedes dieser Bilder eine mittlere nach Intensität gewichtete Masse zu ermitteln. Diese gemittelten Massen zeigen ebenso eine Verschiebung, da die aufeinanderfolgenden Massenspektren durch die Abtragung von Substanz aus einer jeweils tieferen Schicht der Probe kommen.

In Abbildung 24 sind die Verteilungsbilder von Substanz P aus einer Peptidmischung zu sehen. Aus den Verschiebungen der mittleren Massen der Hauptbestandteile lassen sich die Abtragraten für vier Laserschüsse berechnen. Aus den relativen Massenverschiebungen ist eine Berechnung der Energievariation und somit auch ein Kalibrierung der Höhe möglich. Mit dieser Variation lassen sich die effektiven Potentiale auf der Oberfläche und damit durch den bekannten Abfall des Potentials von $0,75 \text{ V}/\mu\text{m}$ auch die Abtragraten berechnen. Daraus ergibt sich der Zusammenhang zwischen der relativen Abweichung von der mittleren Masse und der relativen Höhe der Probe zu:

$$(M_{\text{ave}}/M_{\text{obs}})/H = 5 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^{-1}$$

M_{ave} : Mittlere Masse des Ionenverteilungsbildes

M_{obs} : Masse des Molekülsignals am Probenort

H: relative Höhe des Probenorts

Die Abtragraten von $0,3 - 0,5 \mu\text{m}$ pro Laserschuss entsprechen den Erwartungen für einen Laserfokus von ca. $1 \mu\text{m}$.

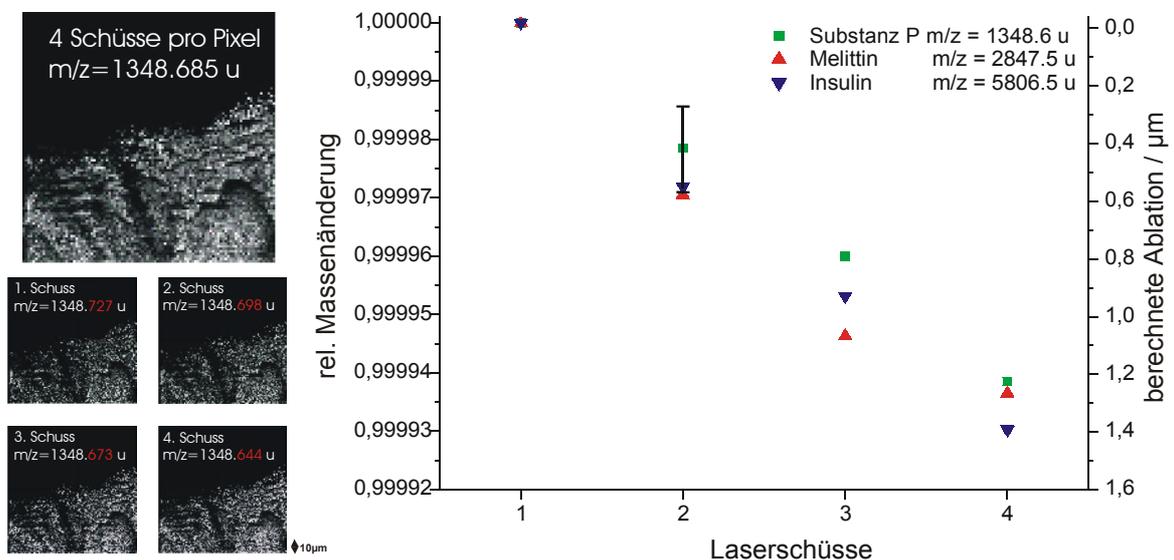


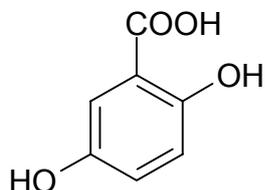
Abbildung 24: Kalkulierte Abtragraten für mehrfachen Laserbeschuss

5 Grundlagenuntersuchungen zu Präparationsmethoden für SMALDI-MS an Oberflächen

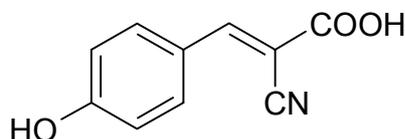
Bei der orts aufgelösten Analyse von biologischen oder synthetischen Proben ist die Präparation der Probe ein entscheidender Schritt, der die erreichbare Empfindlichkeit, die Massenauflösung und die effektive laterale Auflösung der Messung limitiert. Die Ergebnisse belegen die Notwendigkeit einer Optimierung der Präparationstechniken, um eine bessere Analytik von z.B. Zelloberflächen, kultivierten Einzelzellen, Geweben, Zellbestandteilen oder synthetisch hergestellten, biologisch aktiven Oberflächen zu erreichen.

Zum besseren Verständnis muss zunächst der prinzipielle Unterschied zwischen einer standardisierten MALDI-MS Präparation und der Präparation einer Oberfläche erläutert werden. Bei der Präparation nach einem Standardverfahren liegt der Analyt meist in gelöster Form vor, oder wird in eine gelöste Form gebracht. Dies erleichtert die notwendigen Voraussetzungen für eine MALDI-Präparation erheblich, da jetzt die Probe mit der Matrix gemischt werden kann oder eine Vermischung von Analyt und Matrix auf dem Probeteller vor dem Auskristallisieren stattfindet. Dadurch findet eine Separation der einzelnen Analytmoleküle voneinander durch die Matrix statt. Die Matrix sollte in einem molaren Überschuss von etwa 1000:1 vorliegen, um so die Analytmoleküle räumlich zu trennen und dadurch die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Analytmolekülen zu minimieren. Wenn die zu untersuchenden Substanzen auf einer Oberfläche liegen und eventuell an diese Oberfläche gebunden sind, muss bei der Präparation erreicht werden, dass eine ausreichende Vermischung des Analyten und der Matrix stattfindet, um die räumliche Trennung der Moleküle zu gewährleisten. Da die Analyten in der festen Phase auf der Oberfläche vorliegen ist eine Vermischung mit der Matrix prinzipiell nur möglich, wenn die Matrix in gelöster Form auf die Oberfläche einwirkt und den Analyten löst. Dies bedeutet gleichzeitig, dass bei einer normalen MALDI-Präparation die räumliche Lokalisation der Substanzen durch diesen Schritt vollständig verloren geht, da die Flüssigkeit bis zu mehreren Minuten auf der Oberfläche verbleibt, bevor das Lösungsmittel verdampft. Der Informationsgewinn, der durch die hohe räumliche Auflösung des Gerätes erzielt

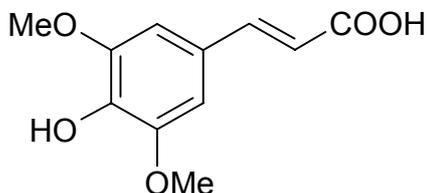
wird, geht dann durch die Präparation im vorhinein verloren. Im weiteren Verlauf dieses Kapitels werden mehrere Strategien erläutert, um eine ausreichende Vermischung von Analyt und Matrix zu erreichen. Gleichzeitig sollte die Ortsinformation im Bereich von 1 μm , also der Auflösung, die mit dem Massenspektrometer Lamma 2000 erreicht werden kann, erhalten bleiben. Es ist also darauf zu achten, dass die Wanderung des Analyten in X- bzw. Y-Richtung geringer als 1 μm bleibt und gleichzeitig ein Einbau der Analytmoleküle in die Matrix stattfindet. Da beides diffusionsgesteuerte Prozesse sind, bedeutet dies, dass die aufgebrauchte Matrixschicht eine Dicke von 1 μm nicht wesentlich überschreiten darf. Andernfalls sind die Analyten durch Laserdesorption nicht oder kaum noch zu erreichen, da sie unter einer Schicht von analytfreier Matrix liegen. Im wesentlichen werden zwei Strategien verfolgt um die Matrix aufzubringen: Die Matrix wird entweder in Lösung fein versprüht auf die Probenoberfläche aufgebracht oder zunächst im trockenen Zustand auf die Probe aufgebracht und dann weiter behandelt. Die Untersuchungen konzentrieren sich auf die drei bei MALDI-MS gebräuchlichsten Matrices (Abbildung 25).



2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)
99%, Fluka, Buchs, Schweiz



α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (CHCA)
97%, Sigma-Aldrich, Frankfurt



Trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxycimtsäure
(Sinapinsäure, SA), 97%, Fluka, Buchs, Schweiz

Abbildung 25: Strukturen und Namen der untersuchten Matrices

Die wichtigsten Faktoren für eine MALDI-Präparation biologischer oder synthetischer Oberflächen sind die Migration, der Einbau des Analyten in die Matrix und die Größe der Matrixkristalle (Abbildung 26). Zunächst muss der prinzipielle Nachweis erbracht werden, dass MALDI-MS mit Matrixkristallen im Größenbereich von 1 μm ebenso möglich ist wie mit größeren Kristallen normaler Standard-MALDI-Präparationen.

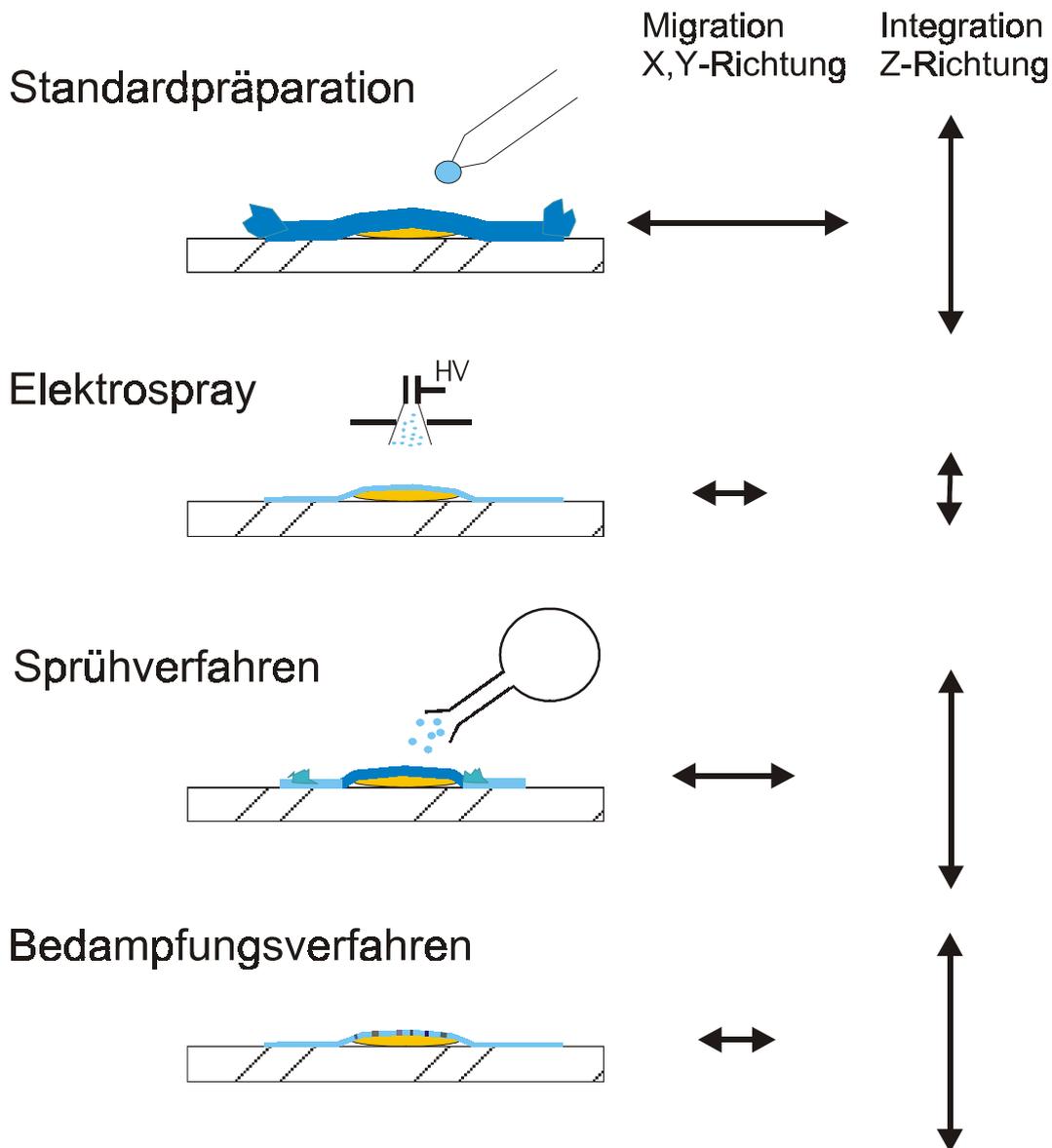


Abbildung 26: Verschiedene Verfahren zur Präparation von Oberflächen

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden zunächst die Standardmethoden zur Probenpräparation in Hinblick auf Kristallgröße, Migration und Verhalten des Ana-

lyten bei Einbau in den Kristall beschrieben. Der zweite Abschnitt behandelt die verschiedenen Möglichkeiten die Matrix auf die Oberfläche auszusprühen. Der dritte Abschnitt stellt eine Methode vor, die Matrix zunächst trocken aufzubringen und so zu bearbeiten, dass ein ausreichender Einbau des Analyten in die Matrix geschieht und gleichzeitig Migration minimiert wird. Für diese Untersuchungen werden die Peptide bzw. Oligosaccharide als Analytengemisch aus Tabelle 3 verwendet.

| Name | m (mo.) | B&B | Firma |
|---|------------|----------------------|--|
| Cellotriose (O-β-D-Glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-D-glucose) | 504,168 u | - | Sigma-Alrich Frankfurt |
| Vasopressin[Arg ⁸] (H-CYFQNCPRG-NH ₂) | 1085,454 u | 960 (Hydrophil) | Bachem AG Weil am Rhein |
| Dynorphin 1-9 (H-YGGFLRRIR-OH) | 1136,657 u | -2360 (Hydrophob) | Bachem AG Weil am Rhein |
| Lipotropin 1-10 (H-ELAGAPPEPA-OH) | 950,471 u | 1500 (Hydrophil) | Bachem AG Weil am Rhein |
| Anti-Inflammatory Peptide (H-HDMNKVLDL-OH) | 1083,538 u | -1450 (Hydrophob) | Bachem AG Weil am Rhein |
| Substance P (H-RPKPQQFFGLM-NH ₂) | 1346,728 u | -1790 (Hydrophob) | Sigma-Alrich Frankfurt |
| Melittin (H-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂) | 2844,754 u | -4470 (Hydrophob) | Serva Electrophoresis Heidelberg |
| Human Insulin A-Kette: H-GIVEQCCTSICSLYQLENYCN-OH B-Kette: H-FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT-OH) | 5803,638 u | -7960 (Hydrophob) | Sigma-Alrich Frankfurt |

Tabelle 3: Verwendete Peptide und Oligosaccharide für Analytgemische

5.1 Standardpräparationen für MALDI-MS

Zunächst werden zwei Standardpräparationen für MALDI-MS untersucht, um Segregationsphänomene und Kristallgrößen innerhalb einer solchen Präparation zu untersuchen. Die Kristallisationsprozedur der sogenannten „Dried-droplet“ Präparation führt zu einer etwa ein bis zwei Millimeter großen kreisförmigen Probe, deren Rand aus größeren Kristallen und deren innerer Bereich aus feineren Kristallen besteht. Vor der Präparation wird der Probenteller intensiv gesäubert, um eine Kontamination des Tellers mit anderen Substanzen, insbesondere Natrium- und Kaliumionen, zu vermeiden. Dazu wird er mehrmals mit verschiedenen Lösungsmitteln (Aceton (ACS, Merck, Darmstadt), Isopropanol (LiChrosolv, Merck, Darmstadt), Wasser (ACS, Sigma-Aldrich, Frankfurt), Ethanol (Uvasol, Merck, Darmstadt)) und einem staubfreien Papiertuch gereinigt. Anschließend wird der Probenträger mit Ethanol benetzt und unter einem heißen Luftstrom getrocknet. Auf den noch warmen Probenträger werden 0,5 µl der Analytgemischlösung (typische Konzentrationen: $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l bis $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) getropft. Danach gibt man 0,5 µl DHB-Lösung (10 mg/ml in 60:40 Ethanol/ 0,1 % TFA) zu dem Tropfen hinzu und vermischt sie. Abhängig von der gewünschten Dauer des Kristallisationsvorgangs wird der Probenteller entweder an der Luft mehrere Minuten, oder unter einem heißen Luftstrom in wenigen Sekunden getrocknet. Die Größe der entstehenden Kristalle hängt dabei stark von der Geschwindigkeit des Eintrocknens bzw. der Kristallisation ab. Wird der Probenteller an Luft getrocknet, entsteht ein ausgeprägter Rand der Probe, der aus großen bis zu mehreren 100 µm langen Kristallen besteht. Durch die Erhöhung des Wasseranteils in der Matrixlösung kann dieser Effekt, gegeben durch den wesentlich geringeren Dampfdruck des Wassers, noch verstärkt werden. Da der innere Teil der Probe während der Kristallisation des Randes immer noch mit Flüssigkeit bedeckt ist, entstehen die Kristalle im inneren Bereich erst kurz bevor die Probe eintrocknet. Dabei bildet sich in kurzer Zeit ein Schicht von vielen sehr kleinen Kristallen. Diese Schicht lässt sich klar vom Rand der Probe, meist durch einen schmalen Bereich zwischen Rand und feinkristallinem Innerem in dem fast keine Kristalle vorhanden sind, differenzieren.

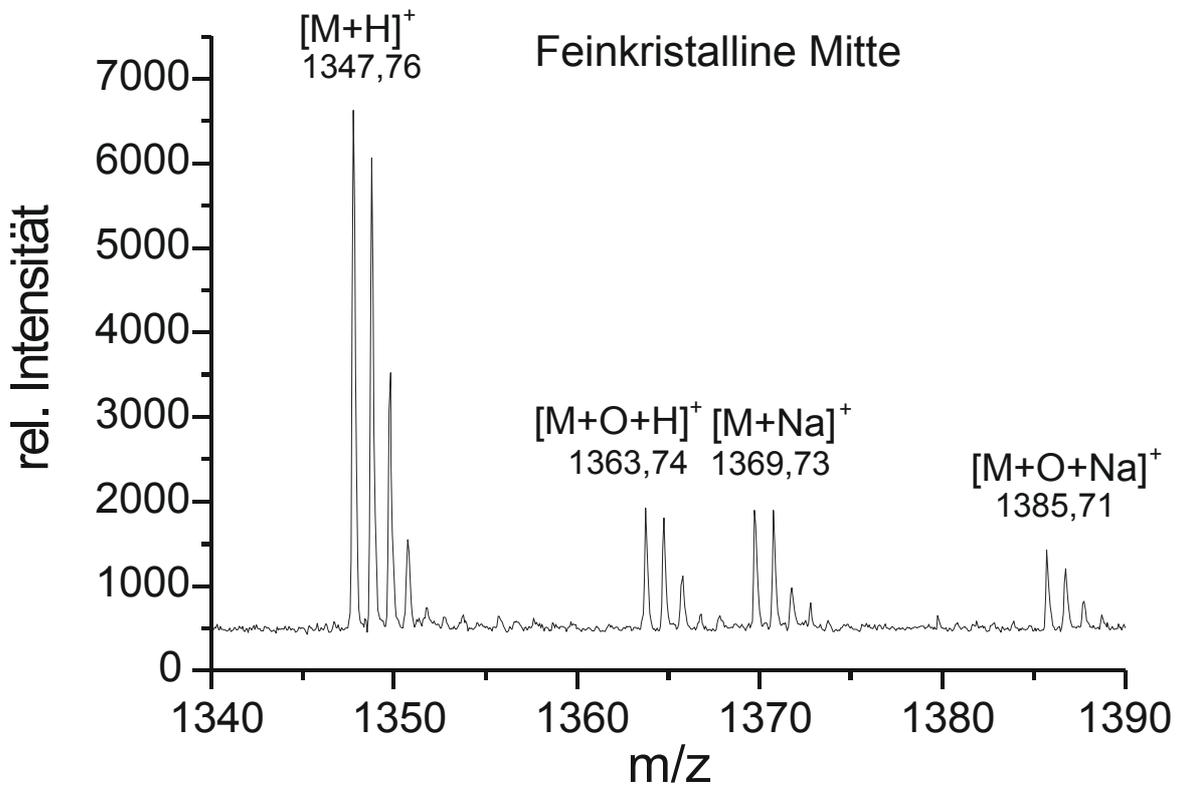
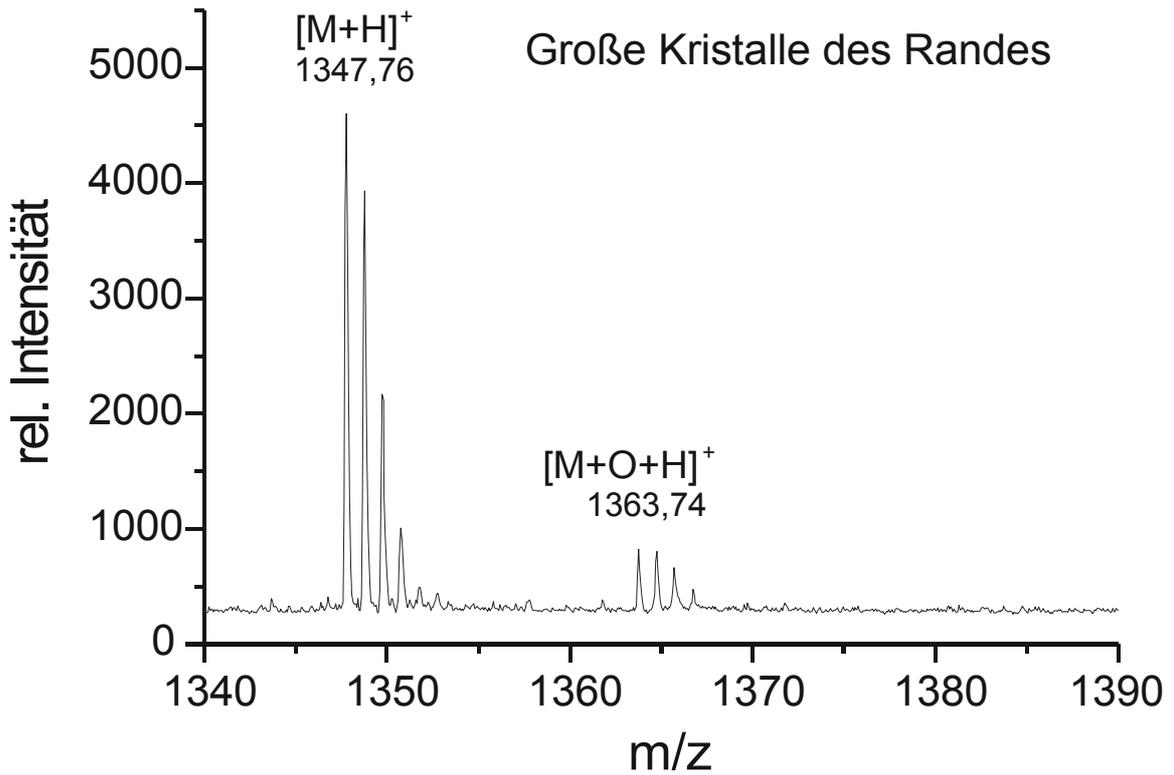


Abbildung 27: Vergleich zwischen Rand und Mitte einer Dried-Droplet Präparation

Es kann schon auf sehr einfache Weise gezeigt werden, dass durch die Art und Weise des Kristallisationsvorganges innerhalb der Probe eine Trennung der Analyten vor sich geht. Bereits aufsummierte Massenspektren vom Rand und vom inneren Bereich der Probe zeigen (Abbildung 27), dass die fast unvermeidlichen Verunreinigungen einer Probe durch Natrium- oder Kaliumionen im Inneren der Probe stärker lokalisiert sind als am Rand. Es findet also eine Auftrennung des Analyten nach seiner Hydrophobizität bzw. seiner Polarität statt. Da die Analyten, hier meist Peptide, eine unterschiedliche Polarität aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung vorweisen, ist ihre Affinität zu den verschiedenen polaren Lösungsmitteln unterschiedlich. Die Matrix ist in diesem Fall in einem Wasser-Ethanol Gemisch gelöst (Wasser: polares Lösungsmittel, Ethanol schwach polares Lösungsmittel). Bei der Auskristallisation der Probe wird aufgrund des höheren Dampfdruckes zunächst vorwiegend Ethanol verdampft und es reichern sich die hydrophilen Anteile des Analyten im flüssigen Rest der Probe in der Mitte an, bevor auch dieser eintrocknet. Dieselben Phänomene finden auch im Mikromaßstab statt. Natrium wird vorwiegend an den Stellen innerhalb einer Probe gefunden, an denen auch der fast ausschließlich mit Natriumanlagerungen nachgewiesene Zucker lokalisiert. Abbildung 28 zeigt, dass Natrium und Zucker (Cellotriöse) ähnlich verteilt sind, während das hydrophobe Peptid Vasopressin[Arg8] eine deutlich andere Verteilung aufweist. Dabei wird eine „Dried-droplet“ Präparation verwendet. Es wird 1 µl Peptid und Zucker in Ethanol / Wasser (1:1, $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) auf den Probenträger gegeben und mit 1 µl Matrix (DHB) in Ethanol/ Wasser (2:3, 20 µg/ml) auf dem Teller vermischt. Die Probe kristallisiert dann unter einem warmen Luftstrom in ca. einer Minute an der Raumluft aus. Dabei kann eine Entmischung der Analyte nach ihrer Hydrophobizität bzw. ihrer Polarität beobachtet werden. Gleichzeitig ist die Geschwindigkeit der Auskristallisation ein entscheidender Faktor für die Verhältnisse in den Kristallen.

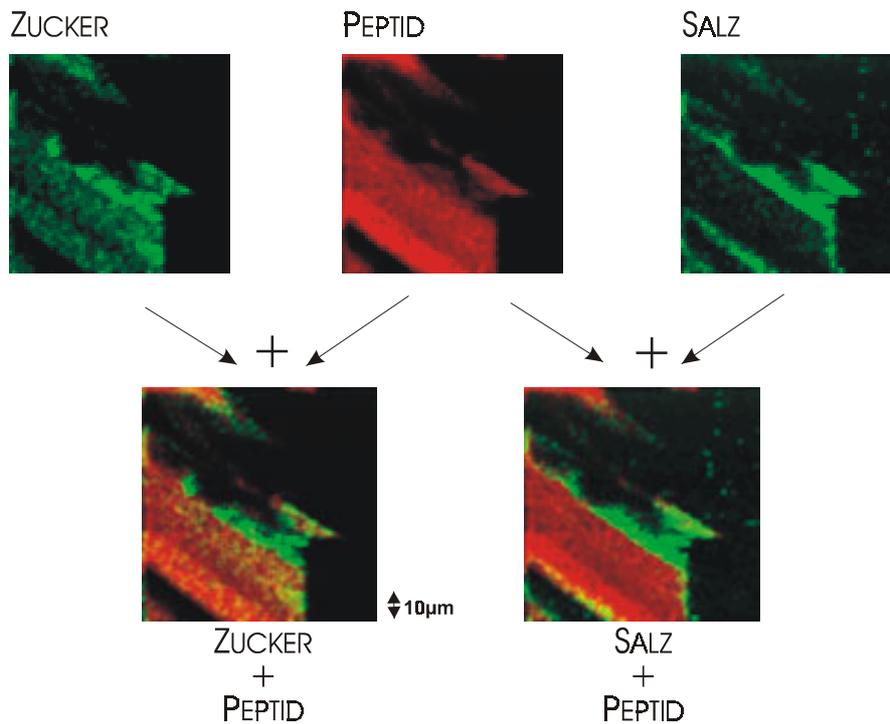
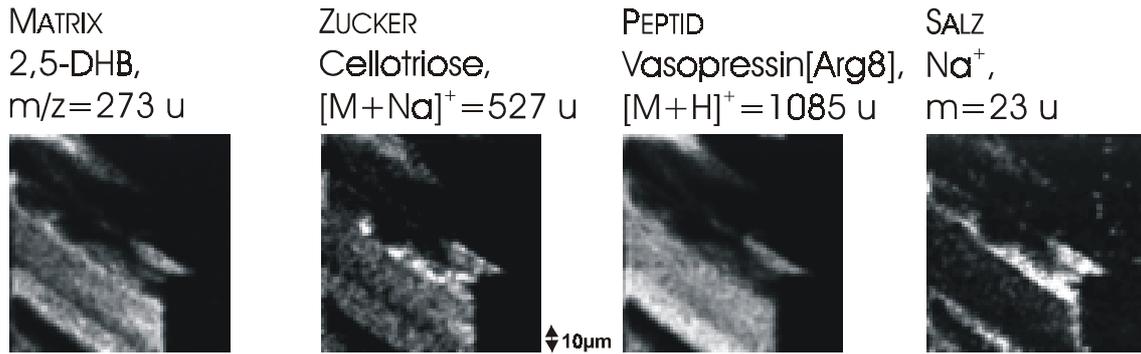


Abbildung 28: Zucker, Peptid, Salz

Abbildung 29 stellt die Verteilungsbilder eines Peptidgemischs aus dem stark hydrophilen Liptropin 1-10 und dem stark hydrophoben Anti-Inflammatorischen Peptid dar. Es wurde eine „Dried-droplet“ Präparation verwendet. 1 μl Peptidgemisch in Ethanol / Wasser (1:1, $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) wurde auf den Probenträger gegeben und mit 1 μl Matrix (DHB) in Ethanol/ Wasser (2:3, 20 $\mu g/ml$) auf dem Teller vermischt. Die Probe kristallisiert dann ca. fünf Minuten an der Raumluft aus. Durch die langsame Auskristallisation entstehen am Rand der Probe große DHB-Kristalle mit einer Größe bis zu 500 μm . Dabei wurde ein Bereich von 100 μm mal 100 μm mit einer Auflösung von 1 μm abgerastert. Die Graustufenverteilungsbilder zeigen eine

unterschiedliche Verteilung der Peptidsignale innerhalb eines großen Kristalls. Die linke Seite der Bilder wird von einem Kristall dominiert, der größer ist als der Bildausschnitt. In der Mitte ist eine schmale Nadel mit einer Breite von ca. 10 μm zu sehen. Während innerhalb des großen Kristalls das hydrophile Peptid den oberen rechten Teil dominiert, ist das hydrophobe Peptid im linken unteren Bereich zu finden. Dies wird besonders deutlich, wenn in einem Falschfarbenbild der blaue Kanal der Intensität der Masse des Lipotropins und der rote Kanal der Intensität der Masse des Anti-Inflammatorische Peptid zugeordnet wird. In Abbildung 29 ist im rechten Bild eine klare Segregation der beiden Analyten durch den roten und blauen Teil des Kristalls dargestellt. Werden alle drei Graustufenbilder zu einem Farbbild kombiniert kann auch in diesem Bild die Segregation der Peptide demonstriert werden, während die Intensität des Matrixsignals gleichmäßig über den Kristall verteilt ist.

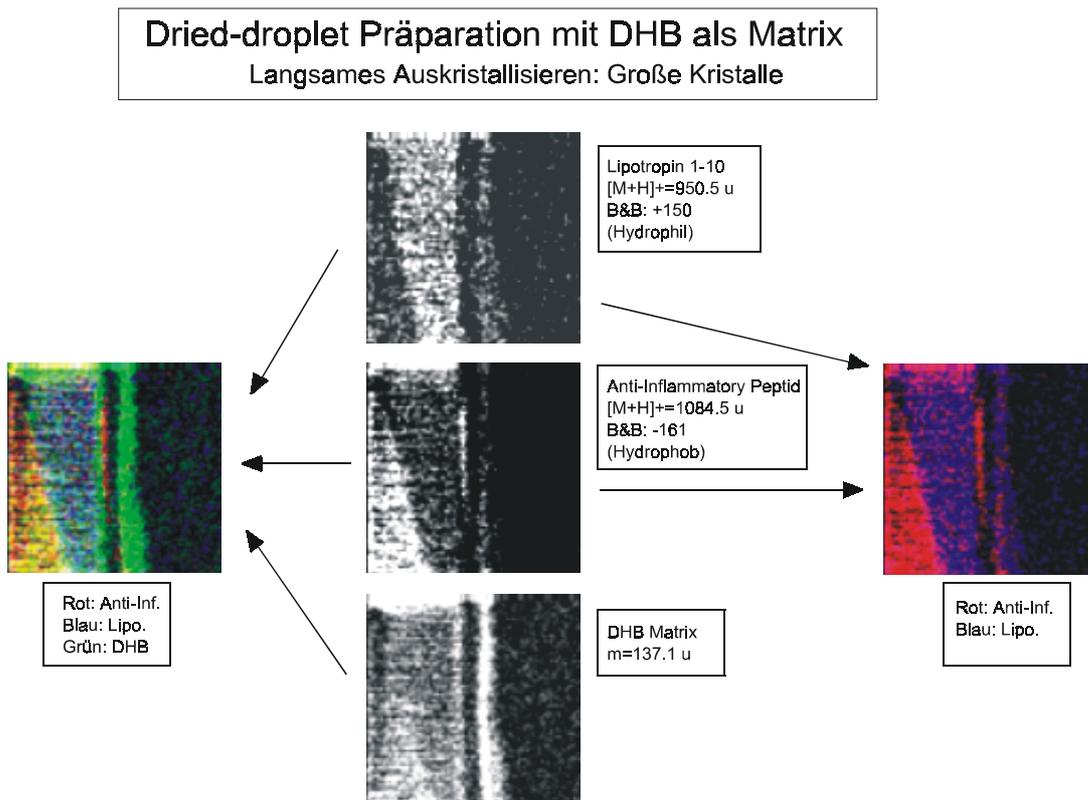


Abbildung 29: Langsame MALDI Präparation

Anders als die eben erläuterte Probenpräparation führt eine abgewandelte Methode dazu, dass innerhalb der Kristalle kaum Segregationseffekte beobachtet

werden. In Abbildung 30 ist ein Peptidgemisch aus Dynorphin 1-9 (hydrophob) und Vasopressin [Arg8] (hydrophil) in denselben Lösungsmittelverhältnissen und mit derselben Matrixlösung präpariert worden. Allerdings wurde nun eine rasche Kristallisation durchgeführt. Durch das Aufheizen des Proben Tellers vor der Probenpräparation, bzw. durch Trocknen der Probe unter einem heißen Luftstrom kann eine sehr schnelle Auskristallisation in etwa 5 - 10 Sekunden erreicht werden. Die dadurch entstehenden Kristalle sind erheblich kleiner als die bei langsamer Kristallisation erzeugten. Die Graustufenbilder des abgerasterten Bildausschnittes von 100 µm mal 100 µm zeigen die Verteilung der beiden Analyten und der Matrix. Innerhalb der Kristalle, die eine Größe von 10 µm bis 50 µm haben, sind die beiden Peptide weitgehend homogen verteilt. Das linke Farbbild weist kaum rote oder blaue Stellen auf, die auf eine Entmischung hindeuten würden und besteht hauptsächlich aus der Kombinationsfarbe violett. Unter Einbeziehung der dritten Komponente (Matrix) mit dem Farbton Grün zeigt sich, dass die Kristalle mit Ausnahme eines grünen Randes weiß erscheinen, gleichbedeutend mit einer Gleichverteilung von Analyt und Matrix.

Dried-droplet Präparation mit DHB als Matrix

Schnelles Auskristallisieren: Kleine homogene Kristalle

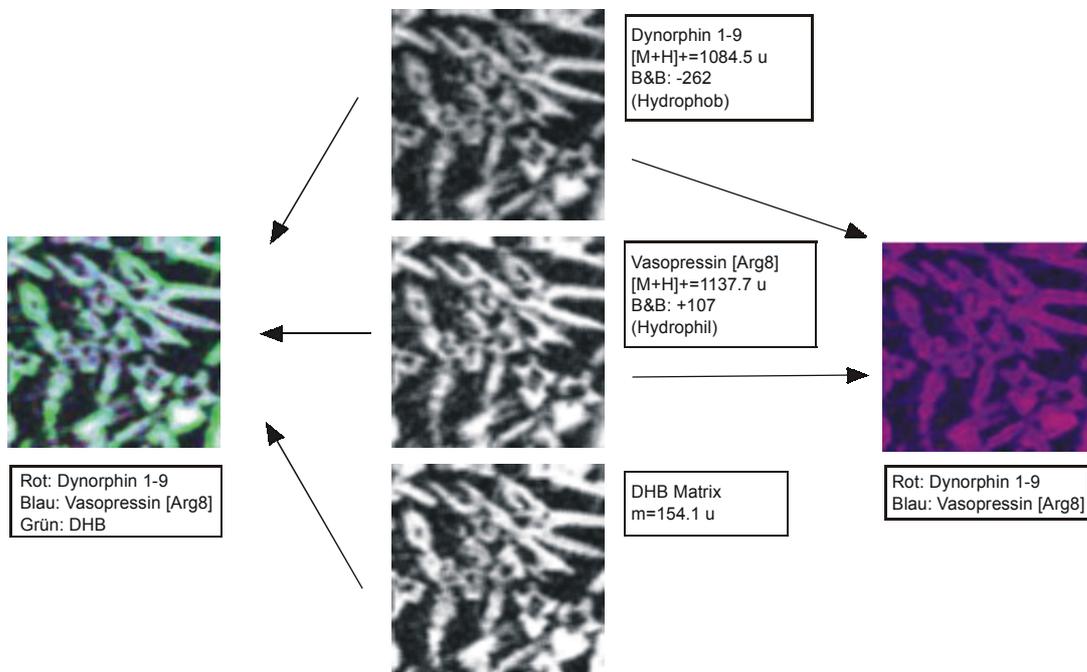


Abbildung 30: Schnelle MALDI Präparation

Auch im Vergleich unterschiedlich großer Peptide zeigt sich, dass innerhalb der größeren Matrix-Kristalle die Analyten inhomogen verteilt sein können und sich während der Präparation trennen. Ebenso können auch innerhalb mikrokristalliner Matrix die Analyten inhomogen verteilt sein. Neben der Zeit die das Matrix-Analyt-Gemisch zum Eintrocknen benötigt, der Hydrophobizität bzw. der Polarität spielt auch die Größe der Peptide eine Rolle. Dies wird in Abbildung 31 und Abbildung 32 deutlich [144]. Ein Peptidgemisch aus Substanz P, Melittin und humanem Insulin ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, 1:2:4) in Wasser/Ethanol (1:1) wird mit DHB (20 mg/ml, Wasser/Ethanol, 6:4) präpariert. Es werden 0,5 μ l Analyt und 0,5 μ l auf dem Probenteller gemischt und unter einen warmen Luftstrom in ca. 1 Minute getrocknet. Die Probe zeigt einen Rand mit großen Kristallen und einen feinkristallinen inneren Bereich der Probe. Auch hier wurde ein Bereich von 100 μ m mal 100 μ m mit einer Schrittweite von 1 μ m abgerastert, allerdings ist die laterale analytische Auflösung dieser Bilder aufgrund einer Verbesserung der optischen Qualität des Laserfokus erkennbar höher als in Abbildung 29 und Abbildung 30. In den auf-

gearbeiteten Farbbildern (Abbildung 28) ist eine inhomogene Verteilung der Analyten innerhalb eines Kristalls zu erkennen, obwohl bei diesen Peptiden der Unterschied in der Hydrophilie nicht so groß ist wie in dem ersten Beispiel. Die gefundenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Untersuchungen die an Matrix-Kristallen von Horneffer et al. [124] durchgeführt wurden. Die Bilder, die von Kristallen mittels konfokaler Mikroskopie gemacht wurden, weisen nicht auf eine unterschiedliche Verteilung der Analyten innerhalb des Kristalls hin. Zu diesen Untersuchungen sind die Kristalle allerdings über einen viel längeren Zeitraum gezüchtet worden und erheblich größer, so dass von einer Kristallisation aus dem chemischen Gleichgewicht heraus ausgegangen werden kann. Eine inhomogene Verteilung wird bei der MALDI-Matrixpräparation offenbar erst durch die schnelle Eintrocknung der Probe verursacht. Darauf weisen auch die Messungen in Abbildung 30 hin.

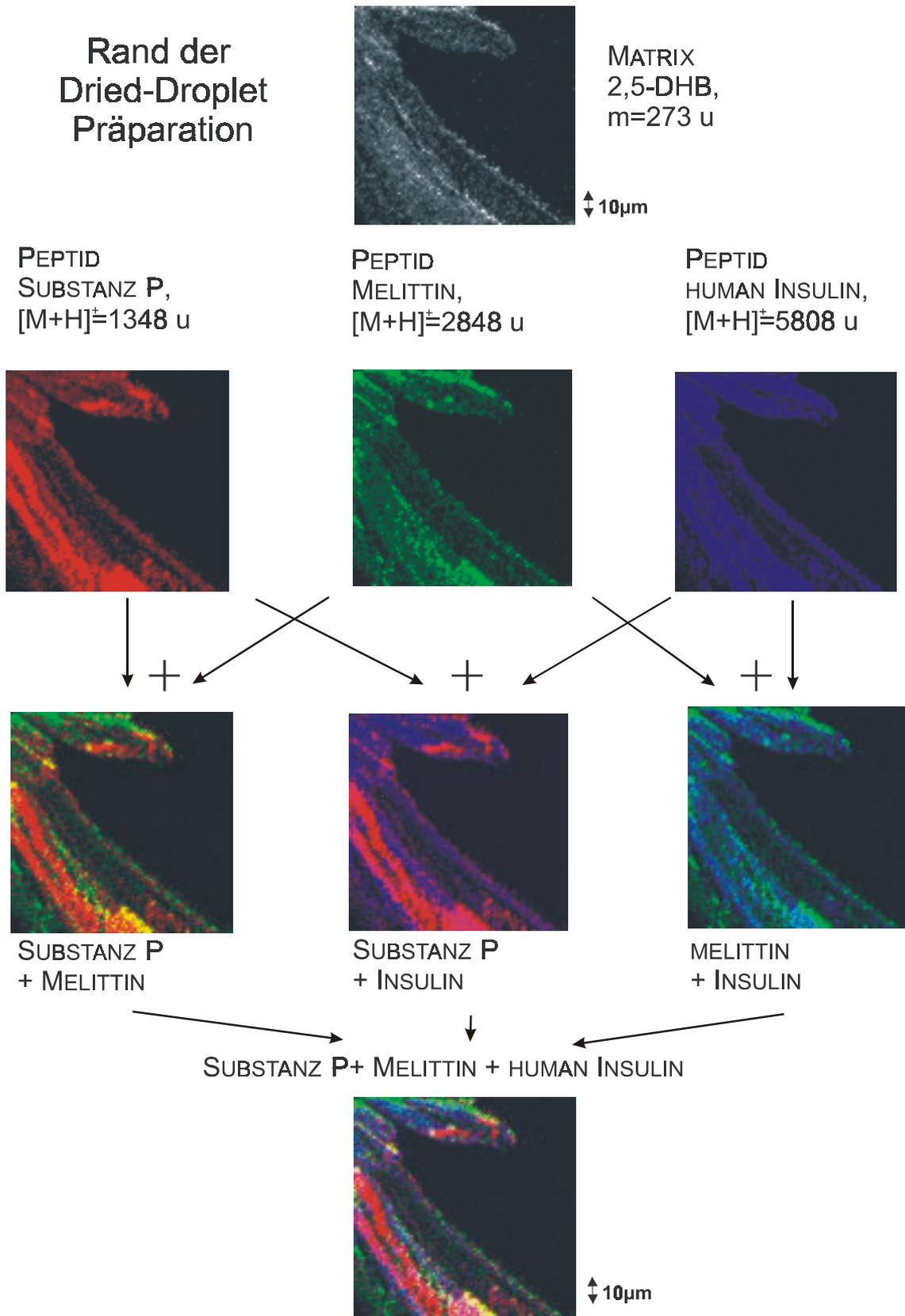


Abbildung 31: Rand einer Dried-droplet Präparation

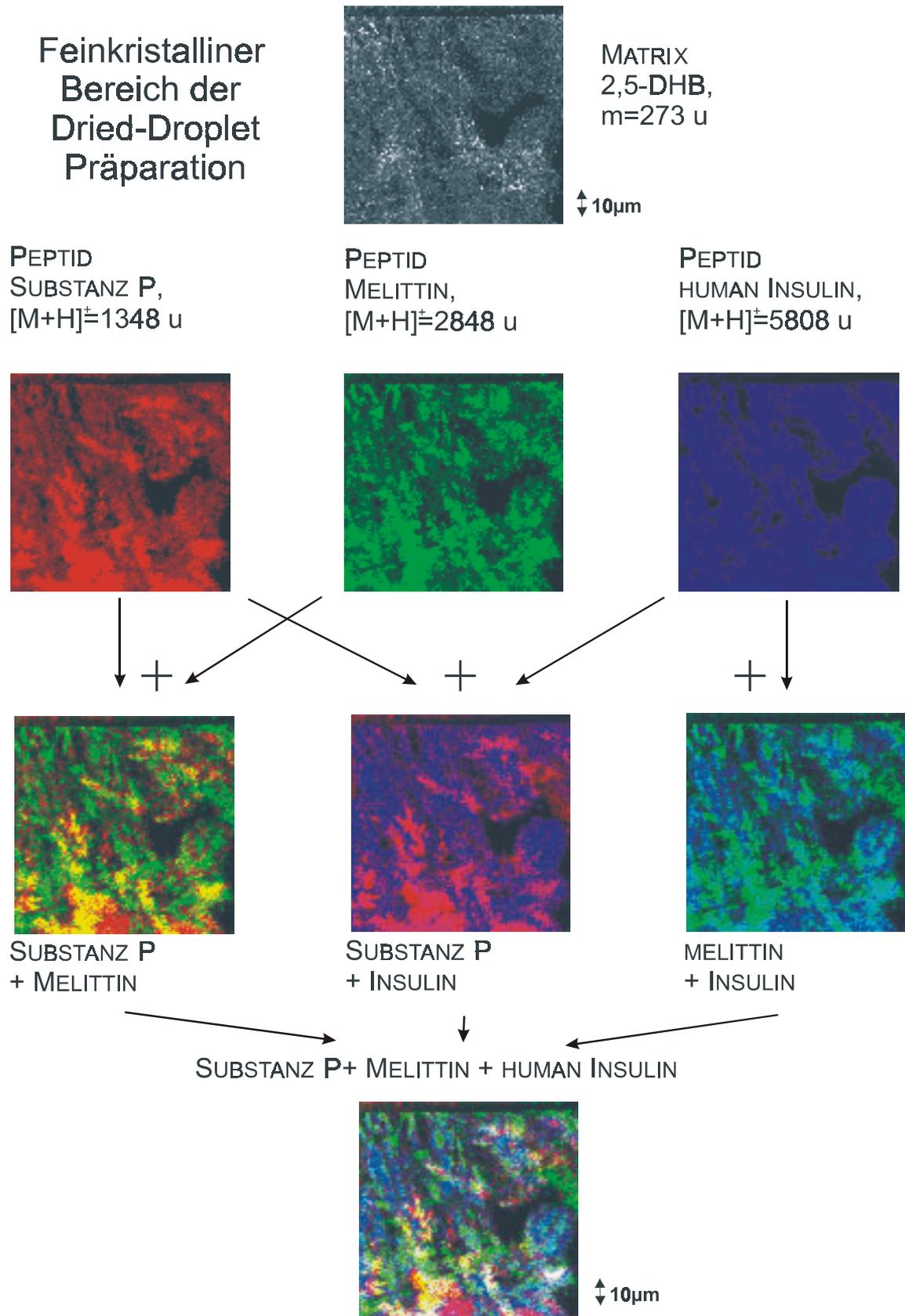


Abbildung 32: Innere Kristalle einer Dried-droplet Präparation

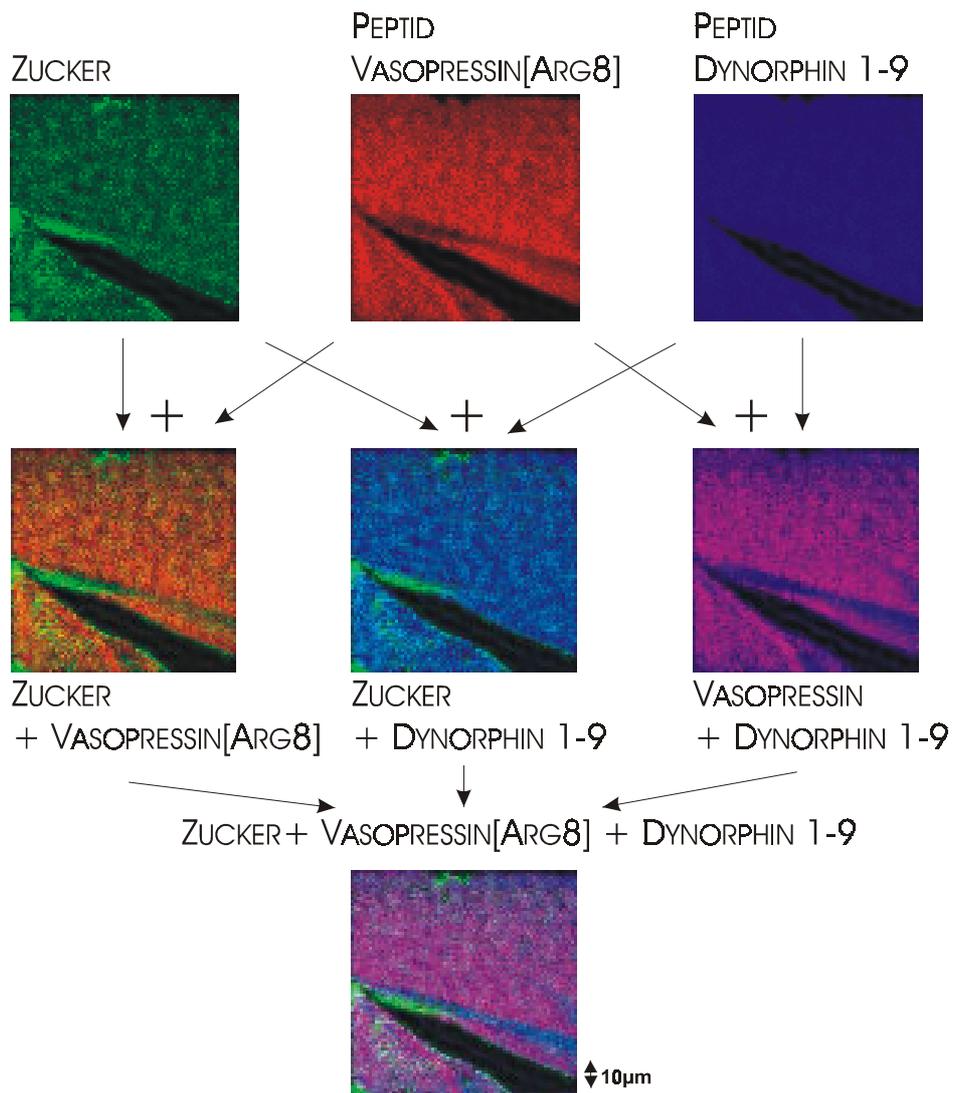
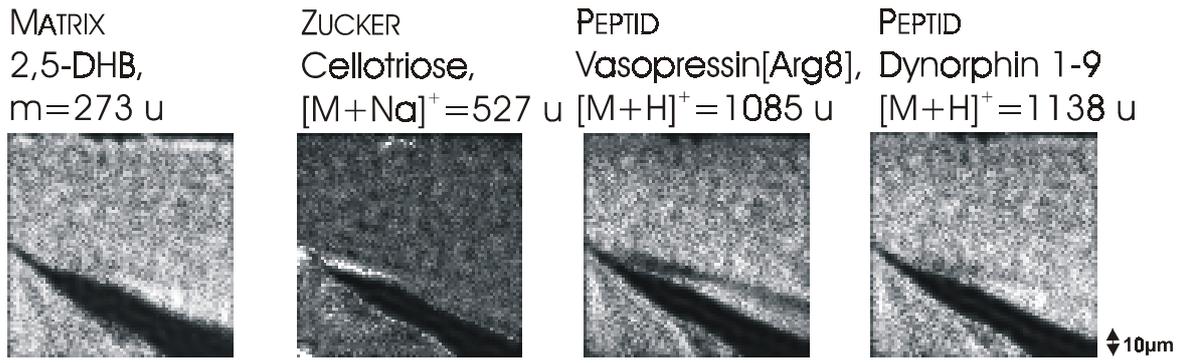


Abbildung 33: Zucker, Peptid

5.2 Sprühmethoden

In diesem Kapitel werden verschiedene neue Sprühmethoden vorgestellt, mit denen man die Oberfläche für SMALDI Massenspektrometrie präparieren kann. Dabei handelt es sich um Methoden, bei denen die Matrix als Mikrotröpfchen in flüssiger Phase auf die Oberfläche gelangt und dort auskristallisiert. Zuerst werden Präparationen vorgestellt, die mit einem Pumpzerstäuber durchgeführt wurden. Der zweite Teil beschäftigt sich mit einer Apparatur zur feinen Zerstäubung der Matrix mit Luft, Stickstoff oder Helium, und der letzte Teil umfasst weitere Methoden wie Elektrospraypräparation bzw. Aerosolbedampfung.



Abbildung 34: Pumpzerstäuber

Zur Präparation der Proben mit Matrix wurden verschiedene Pumpzerstäuber aus handelsüblichen Quellen getestet. Die Zerstäuber lieferten unterschiedliche Ergebnisse in Hinsicht auf Tröpfchengröße bzw. Verteilung der Tröpfchengröße und die Handhabung der Zerstäuber. Am Besten eigneten sich Zerstäuber aus dem Parfümeriebereich, da sie zum Einen den gleichmäßigsten Tropfennebel erzeugten, und zum Anderen mit ihrer kleinen Füllmenge von ca. 20 ml eine vertretbare Menge an Matrixlösung erforderten (Abbildung 34). Durch das Drücken

des Kopfes wird über eine Steigleitung aus dem Vorratsbehälter Flüssigkeit angesaugt, die durch eine Düse vernebelt wird. Mit diesem Zerstäuber wurde Matrixlösung auf vergoldete Probenträger versprüht. Für die Matrixlösung wurden verschiedene Lösungsmittelgemische aus zum Beispiel Ethanol, Aceton und Wasser in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen eingesetzt. Es stellte sich allerdings schnell heraus, dass ein hoher Wasseranteil zu einer sehr langen Eintrocknungszeit und somit zu einer, während der Eintrocknungsphase, sichtbaren Verwirbelung und starken Migration des Analyten führt. Die besten Ergebnisse ließen sich mit einer reinen Aceton- oder Ethanolösung erzielen. Als ebenfalls ungünstig erwies sich das direkte Besprühen der Probenträger aus kurzer Entfernung (< 10 cm). Durch die kurze Distanz wird sehr schnell eine große Menge Flüssigkeit auf einen kleinen Teil der Probenoberfläche aufgebracht, was dazu führt, dass die Probe mit einem Flüssigkeitsfilm bedeckt ist, der auch sichtbare Verwirbelungen zeigt.

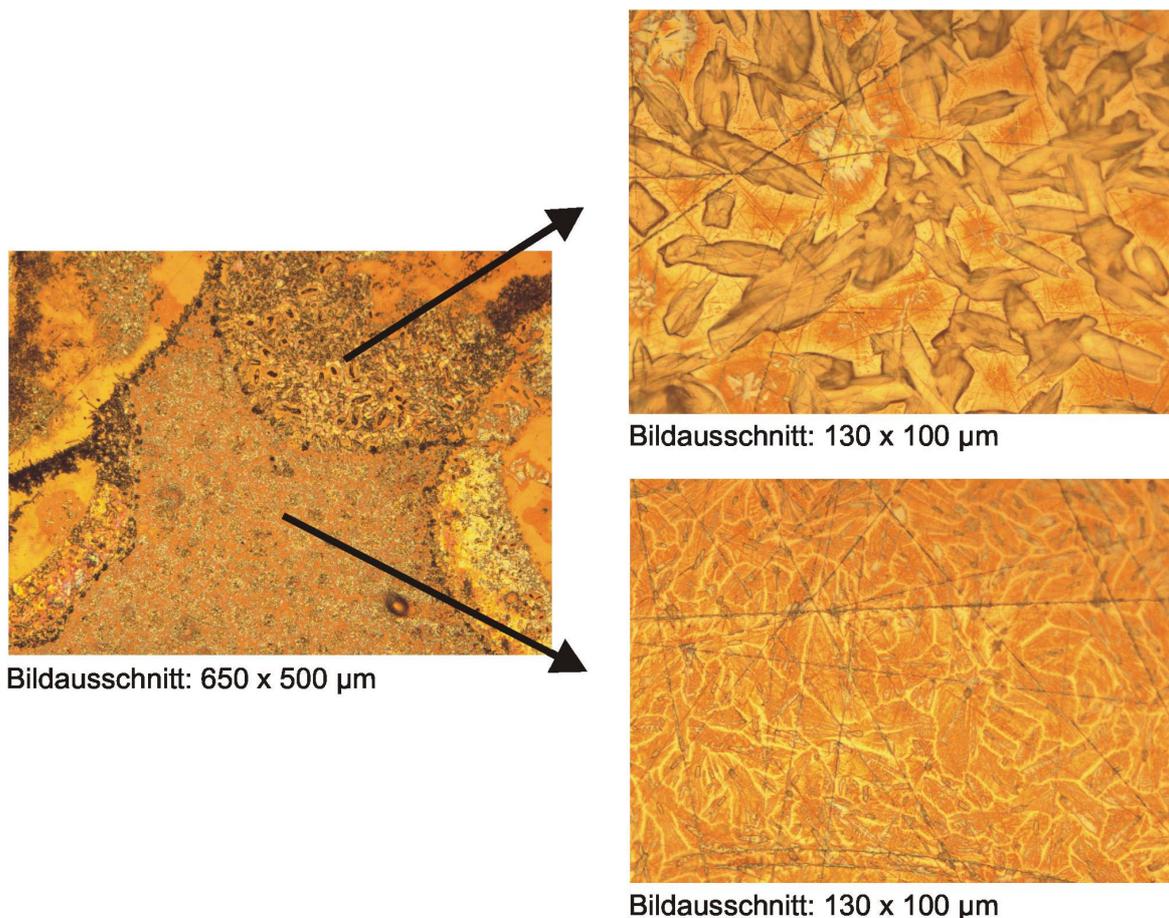


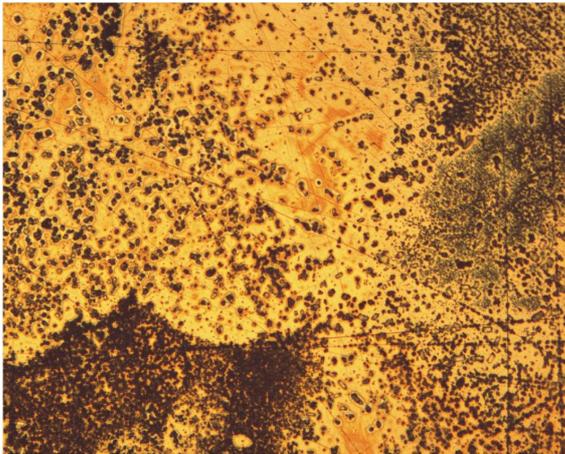
Abbildung 35: DHB-Kristalle gesprüht mit Pumpzerstäuber

Die homogensten Matrixschichten wurde erreicht, wenn horizontal mit einem Abstand von ca. 30 - 40 cm und 10 cm oberhalb zur Probe hin gesprüht wurde. Der Abstand waagrecht zur Probe bewirkt, dass eventuell entstandene große Flüssigkeitstropfen, die die Probe zu stark benetzten würden, aufgrund ihres Gewichts den Probenteller nicht mehr erreichen.

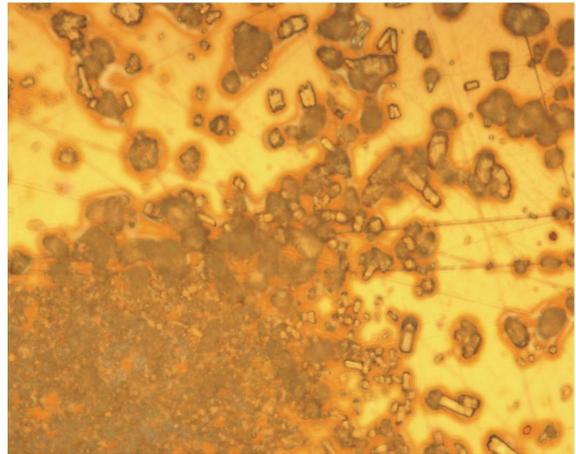
Abbildung 35 zeigt einen vergoldeten Probenträger der mit einer DHB-Lösung (20 mg/ml in Ethanol) fünfmal hintereinander besprüht worden ist. Auf der Oberfläche existieren Bereiche mit unterschiedlich auskristallisierter Matrix. Die Form und Größe der Kristalle hängt von der Menge der Flüssigkeit ab, die an dieser Stelle auf den Probenträger versprüht worden ist. Das rechte obere Bild zeigt einen Bereich in dem große Tropfen auf der Oberfläche aufgetroffen sind und sich ein separater Flüssigkeitsbereich gebildet hat, der unabhängig vom Rest der Probe eingetrocknet ist. Dies führt zu einer klaren Abgrenzung dieses Bereichs (Abbildung 35, linkes Bild). Die Kristalle haben in diesem Bereich eine Größe von etwa 20 µm mal 5 µm und zeigen eine deutliche Höhenstruktur. Zwischen den Kristallen existieren matrixfreie Bereiche in etwa der gleichen Größenordnung, so dass lediglich eine 50 % Bedeckung der Probe resultiert. Der untere Teil der Probe ist mit kleineren Tropfen benetzt worden und zeigt ein anderes Kristallisationsverhalten. Im rechten unteren Bild der Abbildung 35 ist die Matrix wesentlich homogener verteilt als in den anderen Bereichen der Oberfläche. Hier sind Kristalle sehr schnell gewachsen. Aufgrund dieses schnellen Wachstums fand, anders als im oberen rechten Bild, kein merklicher Transport von flüssiger Matrixlösung zu den wachsenden Kristallen hin statt. Daher sind die unbedeckten Zwischenräume in diesem Teil der Präparation mit 1 bis 2 µm wesentlich kleiner. Auch die Kristalle sind mit 10 µm mal 5 µm kleiner und deutlich flacher auf der Oberfläche gewachsen.

Sinapinsäure (SA) und α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA) wurden ebenfalls auf die Goldprobenträger versprüht um erhaltenen Matrixkristalle zu untersuchen. Abbildung 36 stellt die Sinapinkristalle einer mit einem Pumpzerstäuber besprühten Oberflächen dar. Dabei wurde als Matrixlösung eine gesättigte Sinapinlösung in Ethanol verwendet. Die entstandenen Kristalle sind wesentlich kleiner als die

DHB-Kristalle im obigen Beispiel, aber ebenfalls sehr inhomogen auf der Oberfläche verteilt.

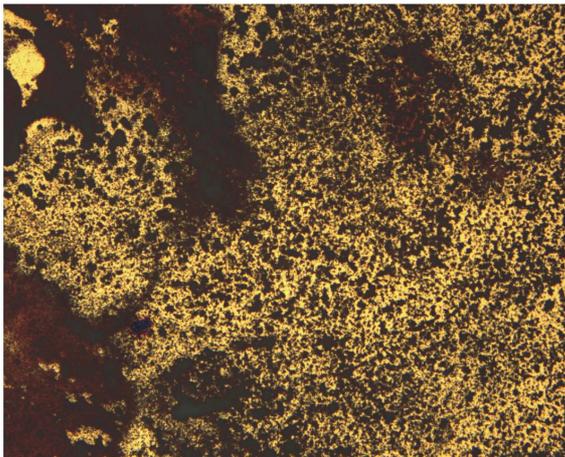


Bildausschnitt: 650 x 500 µm

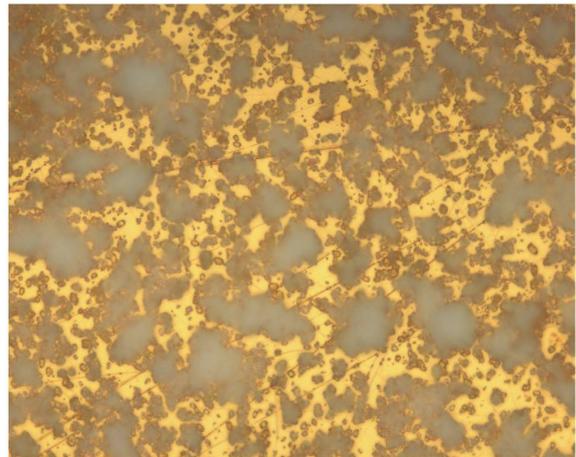


Bildausschnitt: 130 x 100 µm

Abbildung 36: Sinapinsäurekristalle gesprüht mit Pumpzerstäuber



Bildausschnitt: 650 x 500 µm



Bildausschnitt: 130 x 100 µm

Abbildung 37: CHCA-Kristalle gesprüht mit Pumpzerstäuber

Auch bei diesen Präparationen sind die unterschiedlichen Benetzungen und resultierenden Bedeckungen durch verschiedene Flüssigkeitsmengen zu erkennen (Abbildung 36, linkes Bild), allerdings zeigt sich kein deutlich unterschiedliches Kristallisationsverhalten der Matrix. Die Matrixkristalle haben eine Größe von ca. 5 µm und wachsen teilweise auch aus der Probenebene heraus (rechtes Bild). Zwischen den Kristallen treten sehr große Bereiche (20 - 30 µm) auf, die unbedeckt sind. In Abbildung 37 ist eine ähnliche Situation für die bei der Besprühung

mit dem Pumpzerstäuber entstandenen CHCA-Kristalle zu erkennen. Bei der abgebildeten Probe wurde eine Matrixlösung von 20 mg/ml CHCA in Ethanol verwendet. Die Kristalle sind auch bei dieser Probe sehr inhomogen verteilt (Abbildung 37, linkes Bild) und haben eine Größe von 1 - 5 μm . Genau wie bei Sinapinkristallen wachsen auch die CHCA-Kristalle aus der Probenebene heraus und neigen zu einer Verklumpung zu größeren Kristallverbänden.

Die massenspektrometrische Untersuchung solcher Matrixkristalle wies bei allen drei verwendeten Matrices keine Unterschiede zu normalen Dried-Droplet- Präparationen auf. Die Signalintensitäten sowohl der Matrix als auch der zuvor aufgebrauchten Analyten zeigten keine signifikanten Unterschiede. Wie in Kapitel 6.4 detaillierter erläutert können mit dieser Präparationsmethode biologische Proben untersucht werden. Die Präparationsmethode ist allerdings in der praktischen Handhabung nicht sehr zuverlässig. Die große Inhomogenität der erzeugten Tröpfchen führt zu einer schwer kontrollierbaren Benetzung der Oberflächen und damit zu einer schwer kontrollierbaren Migration und Kristallisation auf der Oberfläche (Abbildung 74).

Eine andere Methode um einen feineren und gleichmäßigen Nebel an Matrixtröpfchen zu erzeugen, bietet der Einsatz eines Zerstäubers mit hoher Gasströmung beim Austritt der Flüssigkeit. Die Matrixlösung wird mit einer Hamiltonspritze (250 μl) aufgenommen und in eine sich verjüngende Glasröhre geschraubt (Abbildung 38, linkes Bild). Die Spitze der Hamiltonspritze endet in der Öffnung der Glasröhre, deren Innendurchmesser nur ca. doppelt so groß ist wie der Außendurchmesser der Spritze (Abbildung 38, rechtes Bild). Eine weitere Öffnung an der Glasröhre ermöglicht den Zufluss eines Gases (z.B. Druckluft, Stickstoff, Helium). Der hohe Gasstrom an der Spitze der Spritze führt zu einem sehr feinen Zerstäuben der Matrixlösung.

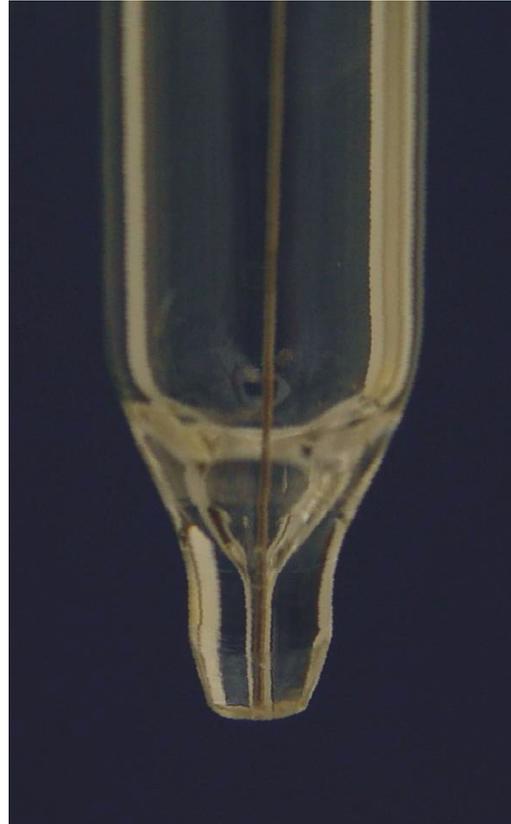
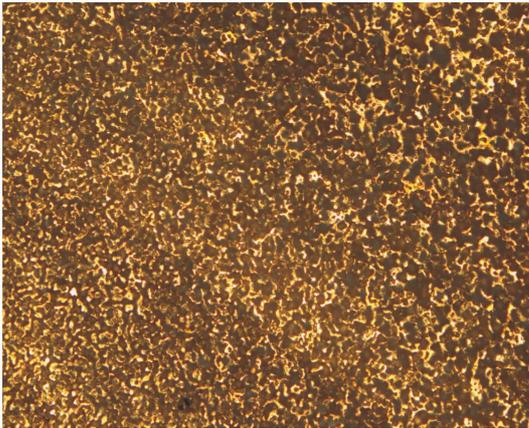


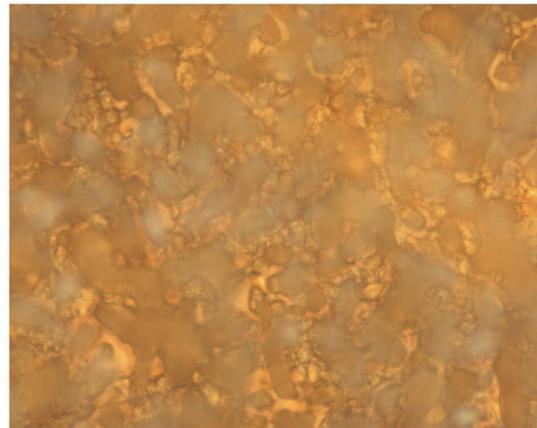
Abbildung 38: Zerstäuber mit Gasstrom

Durch die gering eingesetzten Matrixmengen können Proben ganz gezielt mit der Matrix besprüht werden. Die Proben werden in einem Abstand von 2 cm senkrecht von oben mit einem Gasdruck von 0,5 bar besprüht. Bei dieser Entfernung ist noch klar sichtbar, dass das Lösungsmittel die Oberfläche erreicht. Eine Füllmenge der Hamiltonspritze (250 μl) reicht aus, um ca. 15 Sekunden lang zu sprühen und eine Fläche von 1,5 cm^2 zu benetzen. Der Abstand der Probe zum Zerstäuber hat entscheidenden Einfluss auf die Kristallisation der Matrix auf der Oberfläche. Da die gebildeten Tröpfchen kleiner sind als beim Pumpzerstäuber, können sie schon während des Fluges durch das Abdampfen des Lösungsmittels kristallisieren und als amorpher Feststoff auf die Probe gelangen. Dies würde jedoch die Vermischung von Analyt und Matrix unmöglich machen und so die Messung des Analyten erschweren. Wird der Abstand zur Probe zu groß gewählt, so bildet sich eine amorphe Schicht auf dem Probenträger wie sie in Abbildung 39, obere Reihe zu sehen ist. Aus dieser Schicht ist durch die mangelhafte Vermischung der Analyt nur noch sehr schwer nachweisbar.

Abstand: 4 cm

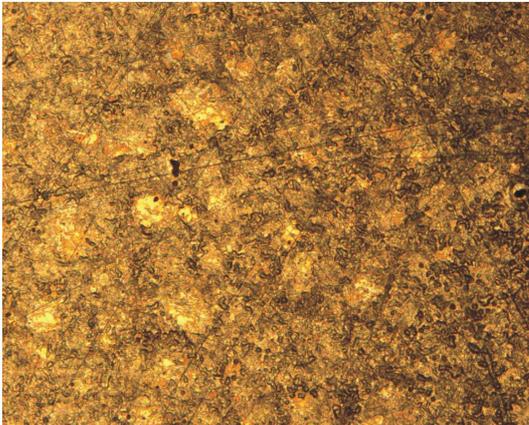


Bildausschnitt: 650 x 500 μm

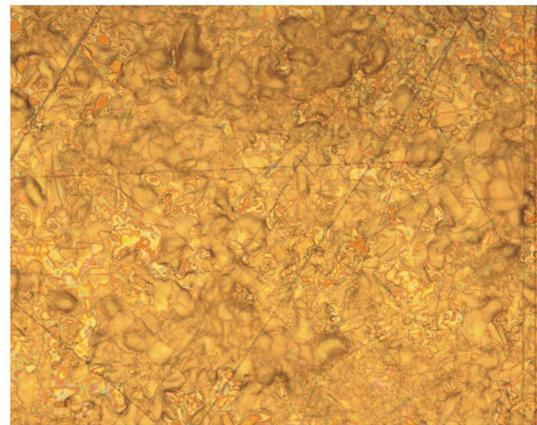


Bildausschnitt: 130 x 100 μm

Abstand: 2 cm

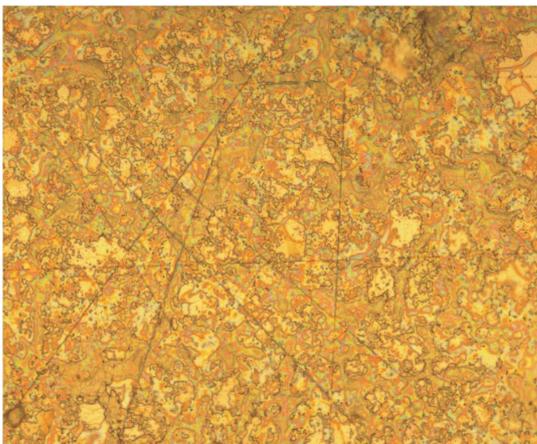


Bildausschnitt: 650 x 500 μm

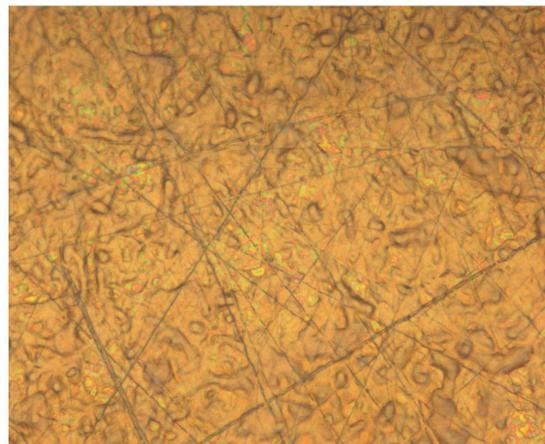


Bildausschnitt: 130 x 100 μm

Abbildung 39: DHB-Kristalle: verschiedene Abstände des Zerstäubers
(obere Reihe: 4 cm, untere Reihe: 2 cm)



Bildausschnitt: 130 x 100 μm



Bildausschnitt: 130 x 100 μm

Abbildung 40: Sinapinsäure- und CHCA-Kristalle mit Zerstäuber gesprüht

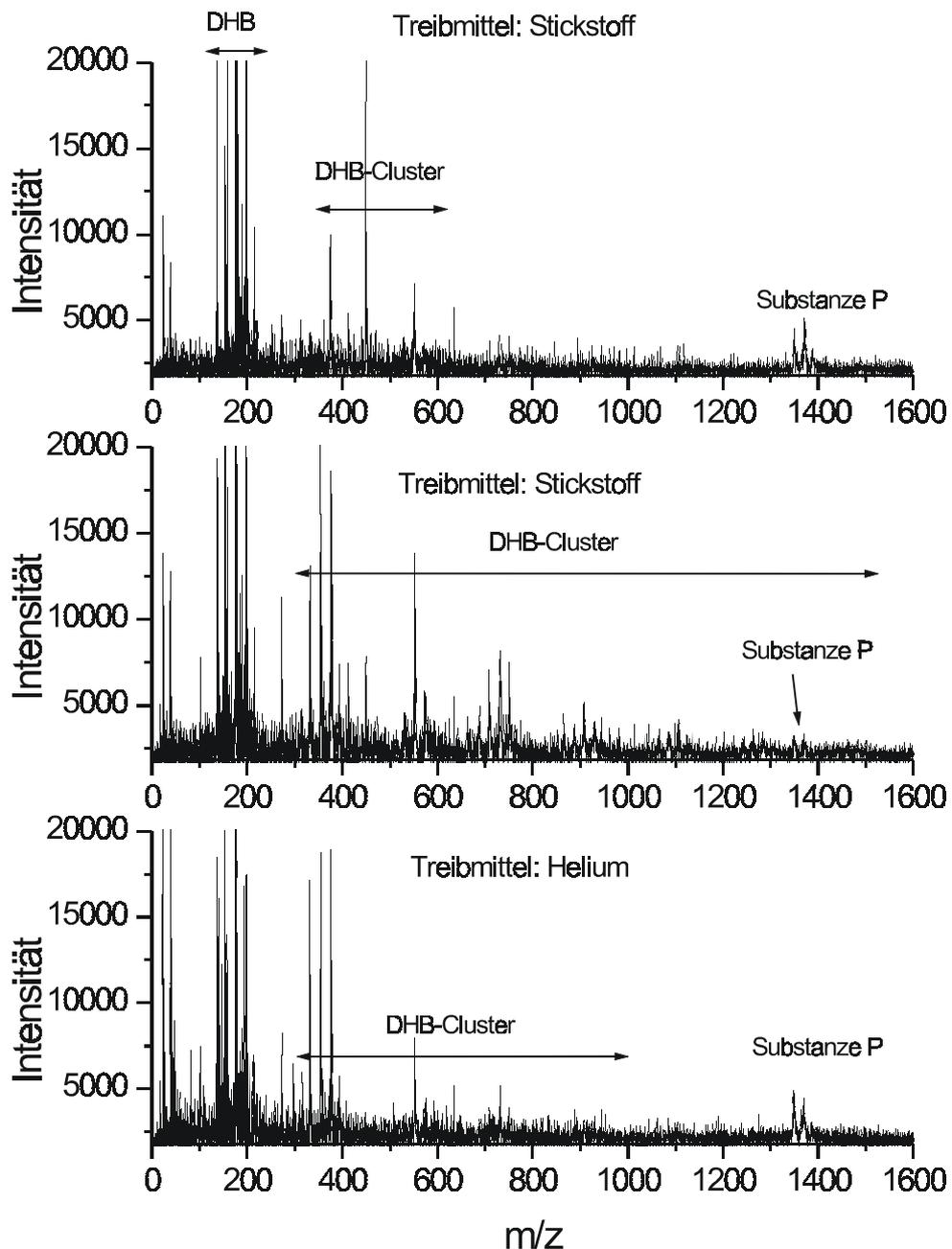


Abbildung 41: Bildung von DHB-Clustern bei verschiedenen Treibmitteln

Bei einem Abstand von ca. 2 cm und einer gleichmäßigen Verteilung kann mit dieser Präparationstechnik eine homogene Matrixschicht auf der Probenoberfläche erzeugt werden (Abbildung 39, untere Reihe), die zu gut messbaren Analytensignalen führt. Die Matrixschicht wurde mit einer Matrixlösung von 20 mg/ml

DHB in Ethanol erzeugt. Als Treibgas kann sowohl Stickstoff als auch Helium verwendet werden. Genauso wie DHB können auch Sinapinsäure und CHCA mit dem Zerstäuber versprüht werden (Abbildung 40). Während die Matrixschichten aus CHCA sehr ähnlich aussehen wie die aus DHB und zu einer fast vollständigen Bedeckung der Oberfläche führen, kristallisiert Sinapinsäure in kleineren Kristallen aus. Die Sinapinsäureschicht weist nur eine Bedeckung von 70 - 80 % auf und es existieren Zwischenräumen in einer Größe von 5 bis 10 μm zwischen diesen Kristallen. Massenspektren der Matrixschichten unterscheiden sich nicht von normalen Dried-Droplet-Präparationen, solange der Abstand zwischen Zerstäuber und Probe nicht zu groß gewählt wird. Durch den mangelhaften Einbau des Analyten in die Matrix bei großen Abständen kann der vorher aufgebrauchte Analyt nur noch schwer nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von Luft als Treibmittel fällt bei den gebildeten Matrixschichten auf, dass diese meist eine Gelbfärbung aufweisen. Dies deutet auf eine Oxidation der Matrix hin, wie sie auch bei längerer Lagerung von Matrixlösungen auftritt. Durch den feinen Tropfennebel wird die Reaktion mit Luftsauerstoff begünstigt. Die Funktion der Matrix kann durch die Oxidation beeinträchtigt werden und eine Oxidation der Analyten auf der Probe ist nicht auszuschließen. Weiterhin kann ein vermehrtes Auftreten von größeren DHB-Clustern und gleichzeitig eine Reduktion des Analytsignals in den Spektren beobachtet werden (Abbildung 41). Deshalb ist die Verwendung von Luft als Treibmittel zu vermeiden. Die erzielten Matrixschichten konnten mit SMALDI-Massenspektrometrie nur eingeschränkt vermessen werden, da die Intensitäten der Peptidsignal, wahrscheinlich aufgrund einer zu trockenen Präparation, sehr gering waren. In Abbildung 42 werden die Massensignale eines Gemischs aus den drei Peptiden Substanz P, Melittin und Insulin dargestellt, die vor der Besprühung mit DHB auf einem Probenträger aufgebracht und getrocknet werden. In dem Gemisch wurden die einzelnen Komponenten mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l in Ethanol/Wasser (1:1) gelöst und dann im Verhältnis 1:2:4 (Substanz P, Melittin und Insulin) gemischt. Das Ionenverteilungsbild für Insulin ist nicht dargestellt, da kein Signal gemessen werden konnte. Der Rand des vorher aufgebachten Punktes des Gemischs kann im Falschfarbenbild noch erkannt werden. Weitere Untersuchungen zu dieser Methode sind notwendig um eine bessere Sig-

nalintensität bei Einzelschussspektren zu erzielen. Die Optimierung des Abstands um ein optimales Anlösen der Oberfläche ohne Migration zu erhalten, stellt aufgrund der minimalen Lösungsmengen die auf die Oberfläche gelangt ein Problem dar, das in weiteren Experimenten gelöst werden muss.

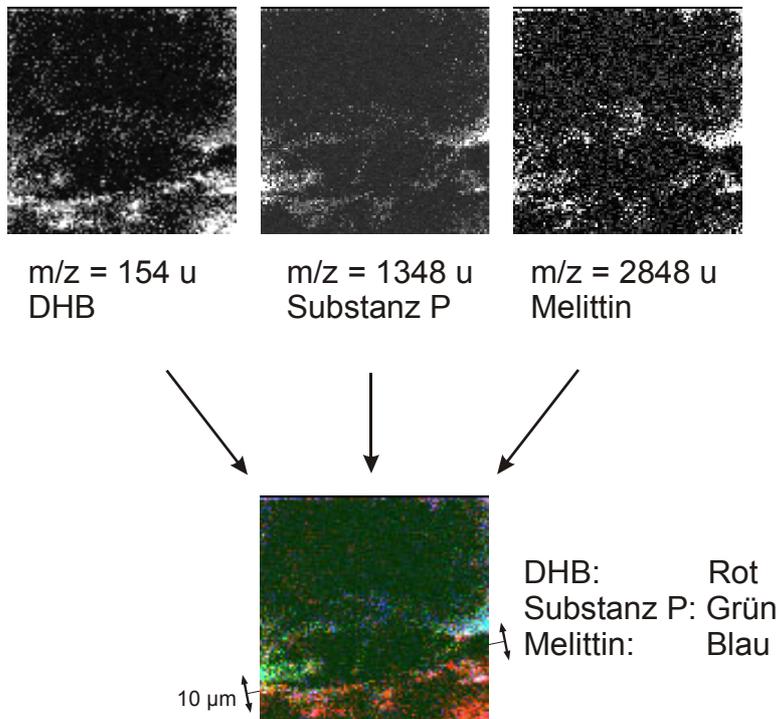


Abbildung 42: Ionendistributionen der Grenze eines präparierten Peptidpunktes mit gesprühter DHB-Schicht (100 x 100 µm, 1 µm Schrittweite)

Eine weitere naheliegende und ähnliche Methode der Probenbedeckung mit Matrix ist der Einsatz einer Elektrosprayquelle. Beim Elektrosprayprozess werden genauso wie beim Zerstäuben im Gasstrom feine Tröpfchen erzeugt, mit der die Probe benetzt wird. Untersuchungen zu dieser Präparationsmethode wurden bereits früher durchgeführt, brachten aber Probleme bei der praktischen Handhabung mit sich [131]. Wie auch beim Besprühen der Probe mit einem Zerstäuber gelangt bei zu großer Entfernung die bereits dehydrierte Matrix als amorpher Feststoff auf die Probenoberfläche. Es konnten zwar homogene Beschichtungen erzeugt werden, allerdings war der resultierende Einbau des Analyten in die Matrix schlecht. Wird die Elektrosprayedel näher an die Probe herangefahren, so gelangt die Matrix zwar in gelöstem Zustand auf die Oberfläche, jedoch wird diese dabei so feucht, dass es zu elektrischen Überschlüssen zwischen Nadel und Ober-

fläche kommt. Aufgrund dieser Untersuchungen wurden keine Versuche mit Elektrospray-Beschichtung im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Bei der Aerosolbedampfung handelt es sich um eine dritte Möglichkeit eine Oberfläche mit Matrix zu benetzen. Hierzu wurde ein Ultraschallvernebler benutzt um einen Probenträger mit den Matrixaerosoltröpfchen zu benetzen. Über ein ca. ein Meter langes Rohr lagern sich die größeren Tröpfchen zunächst ab, so dass nur kleine Tröpfchen mit einem Durchmesser bis zu 2 μm die Oberfläche erreichen. Aufgrund der im System bestehenden hohen Luftfeuchtigkeit trocknen diese Tröpfchen während des Transports nicht ein. Die so erzeugten DHB-Kristalle waren für die hochauflösende rasternde Massenspektrometrie bislang zu groß. Ihre Größe lag bei ca. 20 bis 30 μm (Abbildung 59, Kapitel 6.2). Weitere Untersuchungen zu dieser Methode sind noch erforderlich.

5.3 Bedampfungsmethoden

Eine andere Möglichkeit zum Aufbringen der Matrix auf die zu untersuchende Probe besteht im Verdampfen der Matrix als Feststoff und anschließendem Ablagern auf der Probe. Die Bedampfung der Probenträger erfolgte mit der in Kapitel 3.3 beschriebenen Verdampfungsanlage. Dabei wurden die drei Matrices 2,5-DHB (Schmelzpunkt: 236 °C – 238 °C), Sinapinsäure (Schmelzpunkt: 203 °C – 205 °C) und CHCA (Schmelzpunkt: 252 °C) verwendet. Alle drei Matrices wurden zunächst auf ihre Beständigkeit beim Erhitzen untersucht. Dazu wurde ein Probenträger 15 mm oberhalb des Schiffchens, in dem sich die Matrix befand, mit der Probenträgerseite nach unten montiert. Die eingesetzten Matrixmengen um das Schiffchen zu befüllen lagen im Bereich von 50 mg. Bei vorsichtigem Erhitzen des Schiffchens konnten mit dieser Menge bis zu fünf Proben präpariert werden. Schon die ersten Versuchen zeigten, dass es nicht notwendig ist die Matrices bis zum Schmelzpunkt zu erhitzen, da sich bereits bei niedrigeren Temperaturen durch Sublimation bei Normaldruck eine Schicht auf dem Probenträger ablagert. Schon bei Temperaturen in einem Bereich von 80 °C bis 130 °C sublimiert genügend Material um eine feinkristalline Schicht auf dem Probenträger zu bilden (Abbildung 43, rechtes Photo). Als problematisch erweist sich das erste Erhitzen der Matrix im Schiffchen. Da alle drei Matrices einen Anteil an Kristallwasser enthalten, verdampft bei zu schnellem Erhitzen das Kristallwasser sehr schnell und führt zu einer explosionsartigen Verteilung des gesamten Materials. Die gebildeten Teilchen sind dann so groß, dass sie nicht am Probenträger haften. Die aufgewachsenen Schichten wurden anschließend mit dem Massenspektrometer „Lamma 2000“ vermessen. Die DHB-Schicht wurde zunächst gebildet, indem die Matrix in der Bedampfangsanlage auf 130 °C für 12 Minuten bei Atmosphärendruck erwärmt wurde. Die Schicht auf dem Träger zeigt im Massenspektrometer ein weitgehend normales Spektrum (Abbildung 44, oben). Im niedrigen Massenbereich von $m/z = 46$ u bis 137 u finden sich in geringer Intensität Abbauprodukte von 2,5-DHB. Im Gegensatz zu den Massenspektren einer MALDI-Präparation sind im Spektrum mehr DHB-Cluster im Massenbereich von $m/z = 300$ u bis 600 u zu sehen. Weitere Versuche zeigten, dass die Bildung von Abbauprodukten und Clustern unterdrückt werden kann, wenn die Sublimation der Matrix bei einem

reduzierten Druck und damit auch bei einer reduzierten Temperatur erfolgt (Abbildung 44, unteres Spektrum). Als optimaler Wert für die Sublimation von DHB ergab sich ein Druck von 1 mbar. Daraus folgt für DHB eine Temperatur von 48 °C zur Sublimierung. Der Probenträger wurde 5 Minuten bedampft. Die beiden anderen Matrices, Sinapinsäure und CHCA zeigten ein ähnliches Verhalten. Sinapinsäure sublimiert bei Normaldruck ab ca. 90 °C, bei einem reduzierten Druck von 1 mbar bei 45 °C. CHCA sublimiert bei ca. 110 °C unter Normaldruck und bei 1 mbar bei 53 °C. In den Massenspektren finden sich ebenfalls Abbauprodukte und Cluster der Matrices. Die Schichten, die auf die Probenträger aufgedampft wurden, erwiesen sich als wenig stabil gegenüber mechanischer Belastung (Abbildung 43, linkes Photo). Schon der Beschuss mit dem hochfokussierten Stickstofflaserstrahl reichte aus um größere Teile aus den Schichten herauszubrechen. Insbesondere war dies bei Sinapinsäure und CHCA zu beobachten (Abbildung 48, obere Reihe).

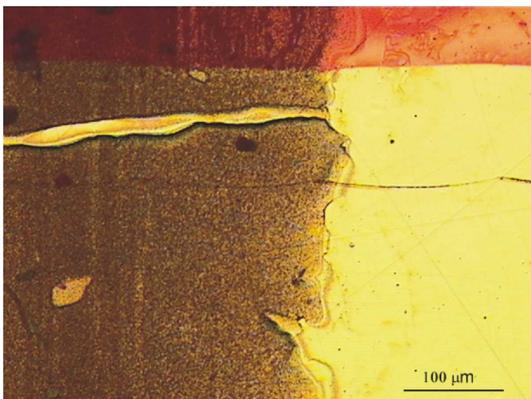


Bild: 650 x 500 µm

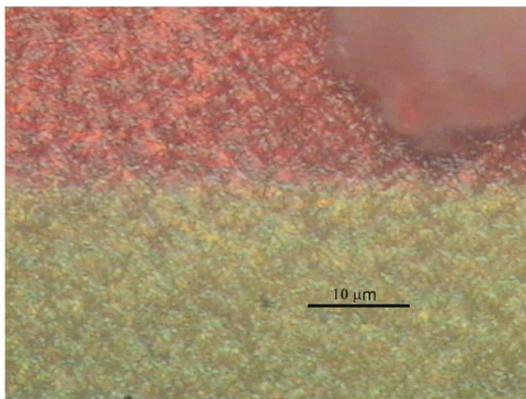


Bild: 65 x 50 µm

Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahme eines bedampften Probenträgers Goldträger mit Farbstoff eines Filzstiftes (oberer Bildteil) und Bedampfung DHB (linker Bildteil)

Bei einer Laserenergie nahe der Schwelle der Ionendetektion konnten die Beschädigungen der Schichten derart reduziert werden, dass Messungen mit einem Fokusbereich und einer analytischen Auflösung von 1 µm möglich waren. Der vorher auf den Probenträger aufgebrachte rote Farbstoff eines Filzstiftes verdeutlicht, dass durch das Aufbringen der Matrix eine vor der Präparation

aufgebrachte Substanz nicht über die analytische Auflösung hinausgehend migriert. Die deutliche Grenze zwischen Farbstrich und Goldoberfläche bleibt auch nach der Bedampfung mit Matrix erhalten und zeigt im Auflösungsbereich von 1 μm keine Migration.

Um die erzeugten Matrixschichten in Hinblick auf ihre Fähigkeit zu überprüfen, mit ihnen MALDI-Massenspektrometrie von Oberflächen zu betreiben, wurde vor der Bedampfung auf den Probenträger ein Gemisch aus den drei Peptiden Substanz P, Melittin und Insulin aufgebracht. Es wurden die einzelnen Komponenten mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l in Ethanol/Wasser (1:1) gelöst und dann im Verhältnis 1:2:4 (Substanz P, Melittin und Insulin) gemischt. Dieses Gemisch zeigte im Massenspektrum bei normaler MALDI-Präparation ein Massenspektrum mit guter, etwa gleich hohe Signalintensität für alle drei Komponenten. Auf den Probenträger wurde 1 μl des Gemischs aufgebracht. Nach ca. 10 Minuten war der Tropfen vollständig eingetrocknet, so dass eine Bedampfung mit Matrix durchgeführt werden konnte. Nach der Bedampfung des Probenträgers mit Matrix wiesen die Massenspektren zunächst nur sehr geringe Signalintensitäten der drei Substanzen auf. Bei normalen Bestrahlungsstärken, wie sie auch bei MALDI-Messungen verwendet werden, konnten keine Massensignale der Peptide detektiert werden. Erst bei deutlich erhöhter Bestrahlungsstärke und Aufsummierung von 200 bis 400 Einzelspektren wurden schwache Massensignale erkennbar (Abbildung 45). Bei diesen Bestrahlungsstärken sind verstärkt Abbauprodukte und Cluster der Matrix zu beobachten. Die geringe Intensität der Peptidsignale (Abbildung 45) kann mit der mangelhaften Vermischung der Analyten mit der Matrix erklärt werden. Der Einbau des Analyten in den Matrixkristall ist zwar zur Messung nicht zwingend notwendig [122], allerdings ist, bedingt durch den kleinen Laserfokus, der Bereich aus dem Matrix und Analyt gleichzeitig desorbiert werden sehr klein. Bei der Aufsummierung der Einzelspektren wurde beobachtet, dass die Signalintensitäten der Peptide innerhalb von mehreren Einzelmessungen stark schwanken. Bei mehrfachem Beschuss derselben Probenstelle ist zunächst nur Matrix im Massenspektrum zu sehen. Nach 5 – 10 Laserschüssen werden die Analyten für 2 – 3 Schüsse im Spektrum sichtbar. Danach geht die Signalintensität für diese Probenstelle insgesamt herunter. Dieses Phänomen deutet auf eine

mangelhafte Integration des Analyten in die Matrix hin. Erst wenn die bedampfte Schicht nahezu abgetragen ist, wird für wenige Laserschüsse Analyt und Matrix gemeinsam desorbiert. Im Anschluss daran ist die Probe an dieser Stelle aufgebraucht.

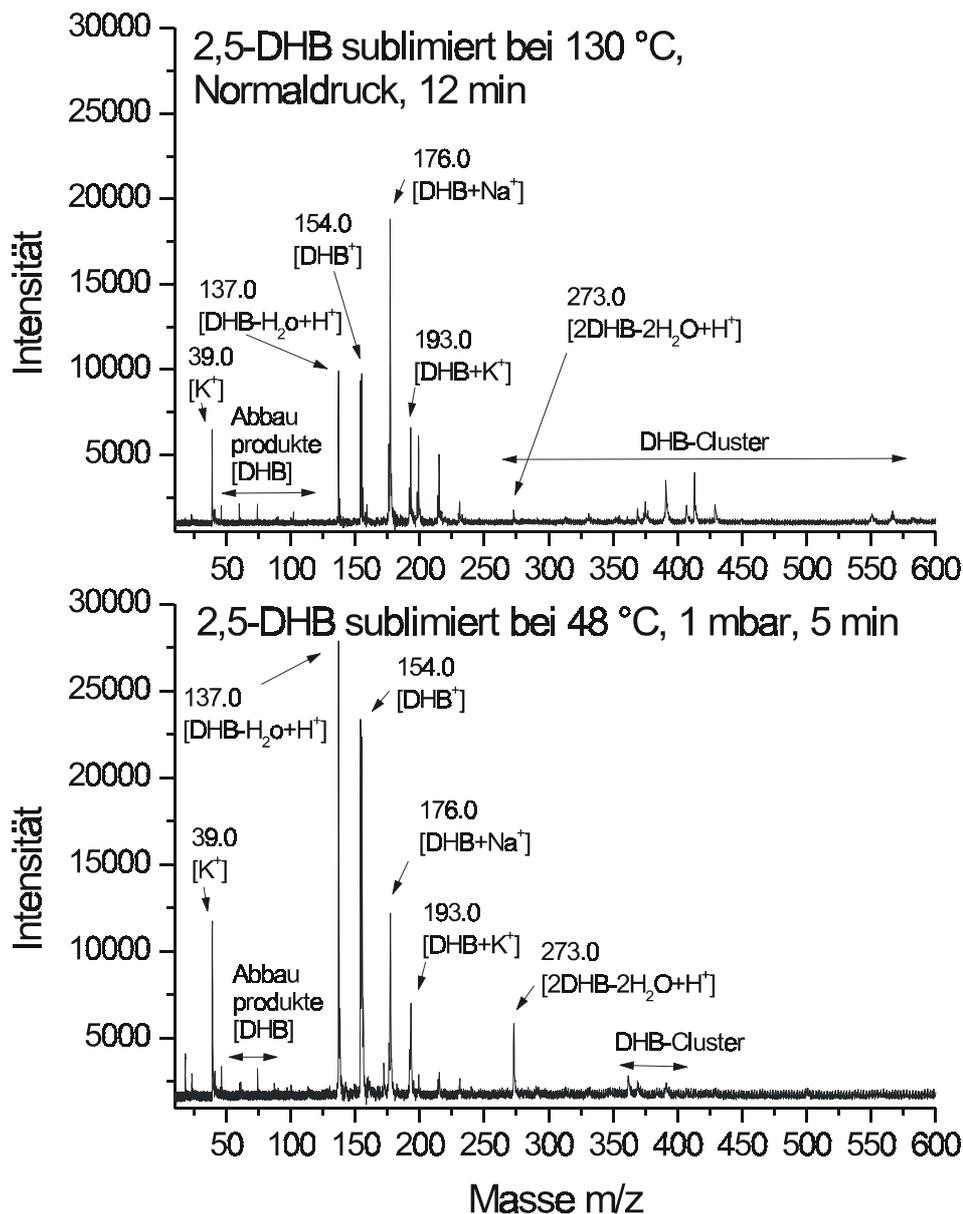


Abbildung 44: Massenspektren von thermisch sublimierter und re-kondensierter Matrix (2,5-DHB) bei 130 °C und 48 °C

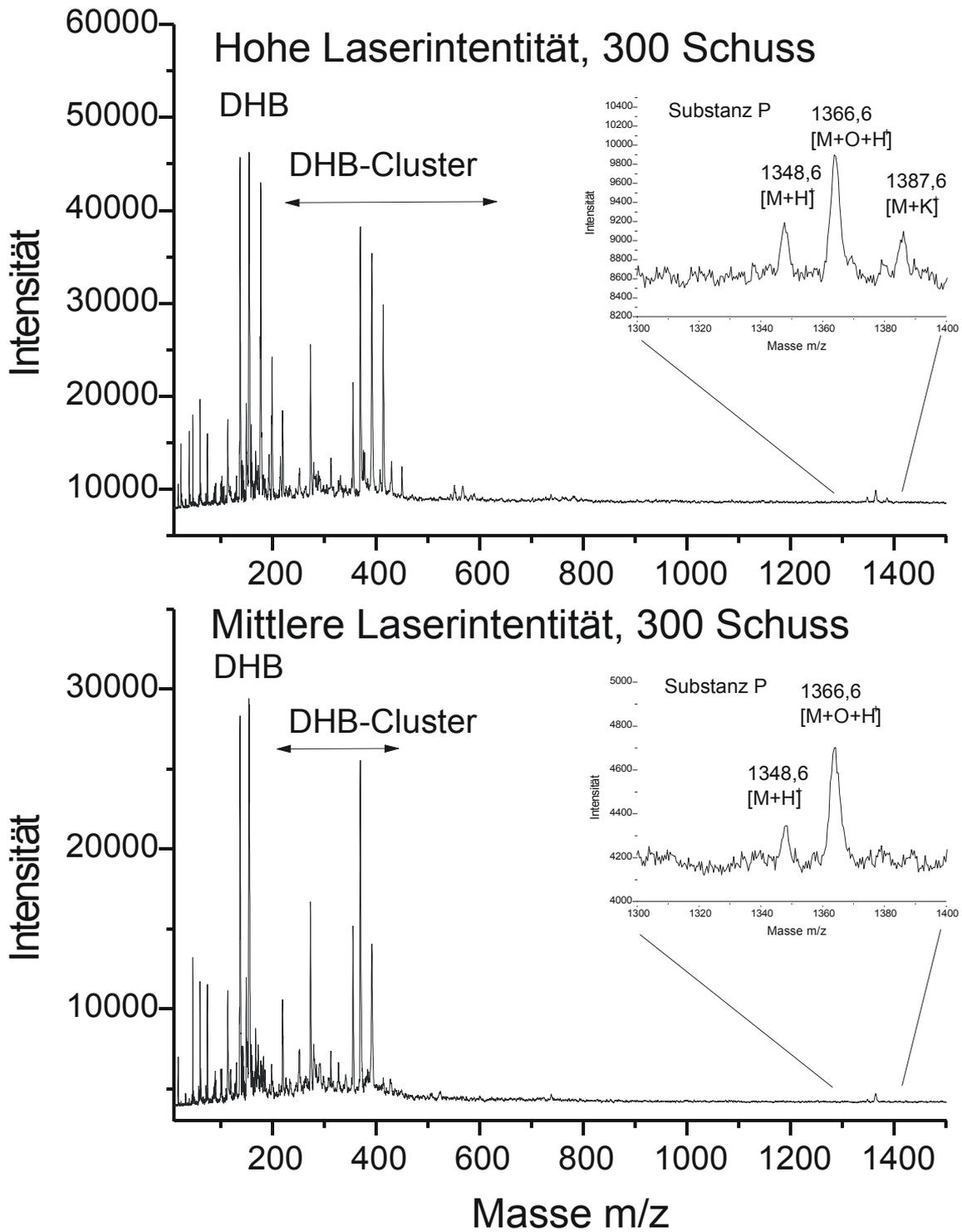


Abbildung 45: MALDI - Massenspektren einer Peptid-Mischung nach Bedampfung mit thermisch sublimierter und re-kondensierter Matrix (2,5-DHB) bei hoher und mittlerer Laserintensität

Die naheliegende Reduzierung der Schichtdicken auf weniger als 1 μm , erwies sich in der verwendeten Konfiguration als nicht sinnvoll, da die Matrixschichten schon nach wenigen Minuten unter Hochvakuum im Gerät verdampfen. Aufgrund der im Moment noch erforderlichen Messzeiten von 10 bis 90 Minuten ist eine rasternde Massenspektrometrie mit diesen Schichten nicht möglich. Allerdings gilt es, diese Möglichkeit der Präparation für Geräte mit Atmosphärendruck-MALDI-Quellen zu testen, da hier unter Normaldruck keine Verdampfung der Schichten erfolgt.

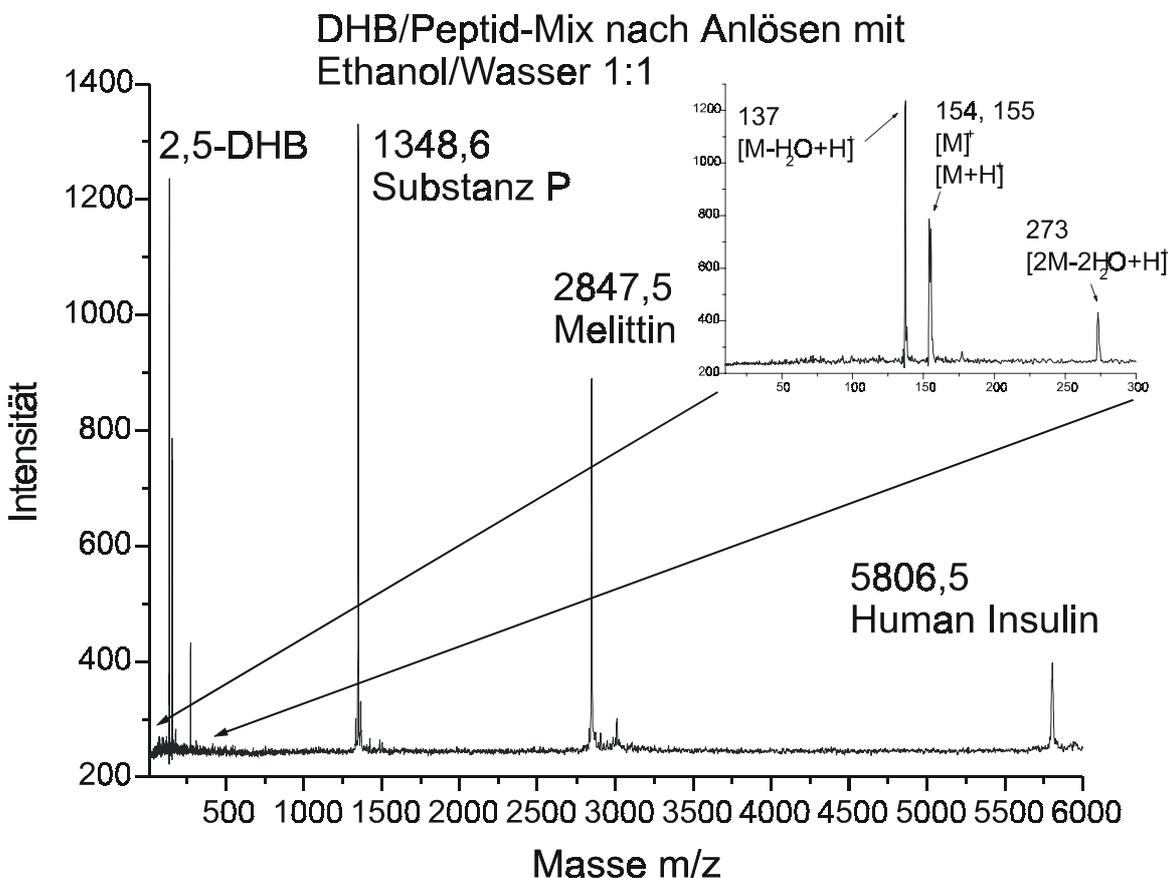


Abbildung 46: MALDI-Massenspektrum von angelöster Bedampfung

Abbildung 46 zeigt, dass die Matrix auch nach der Sublimation chemisch weitgehend unverändert vorliegt und ihre Funktion im Desorption/Ionisationsprozess nach wie vor erfüllt. Der Probenträger wurde dazu mit einem Tropfen des Peptidgemischs beladen. Nach dem Eintrocknen des Tropfens wurde die Matrixschicht aufgedampft. Anschließend wurde die erzeugte Matrixschicht im Bereich des eingetrockneten Tropfens mit 1 μl Ethanol/Wasser (1:1) wieder aufgelöst und durch

einen warmen Luftstrom erneut getrocknet. Die entstandenen Matrixkristalle zeigten nun das typische Aussehen einer normalen MALDI-Präparation. Auch die resultierenden Massenspektren unterschieden sich nicht von den typischen Massenspektren einer normalen MALDI-Präparation. Durch die jetzt wieder mögliche Reduzierung der Bestrahlungsstärke waren in diesem Spektrum keine Matrixcluster zu beobachten. Bemerkenswert ist, dass jetzt auch keine Abbauprodukte der Matrix zu sehen waren (Abbildung 46, Ausschnitt).

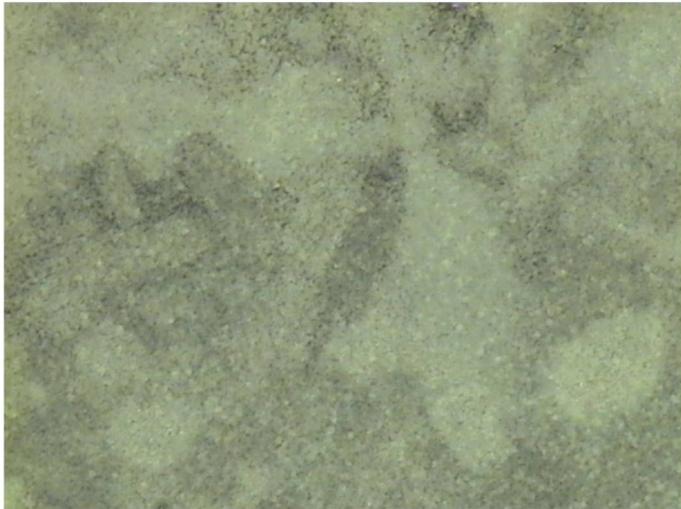
Die Bedampfung und das anschließende Lösen und Rekristallisieren der Matrixschicht zeigte sich somit als sinnvolle Strategie zur Matrixpräparation unter Erhalt von Nachweisempfindlichkeit und Ortsauflösung. Die Trennung der Präparation in zwei Schritte (Aufdampfen der Matrix und Integration des Analyten) stellt dabei einen entscheidenden Punkt dar, um eine weitreichende Kontrolle über die Präparationsbedingungen zur Erzeugung einer homogenen Matrixschicht mit Integration des Analyten zu erzielen. Um eine verbesserte Integration des Analyten in die aufgedampfte Matrixschicht zu erreichen, wurden die Probenräger einer feuchten Umgebung ausgesetzt. Dazu wurden die fertig bedampften Probenräger in einen geschlossenen Glasbehälter gegeben. Unter die Probenräger wurde ein fusselfreies Papiertuch gelegt, das mit destilliertem Wasser getränkt war. Der Behälter wurde dann von unten erhitzt, so dass sich eine mit Wasser gesättigte Atmosphäre um den Probenräger bildete. Bei der Wahl des Behälters war zu beachten, dass das gebildete Kondenswasser am Deckel und am Rand des Behälters abläuft und nicht auf die Probe tropfen kann. Der Behälter wurde zum Erhitzen in ein Sandbad mit Temperaturkontrolle gestellt. Um eine übersättigte Atmosphäre für mehrere Tage erhalten zu können, musste der Behälter gut abgedichtet werden, um ein Austrocknen zu verhindern. Die ersten Versuche wurden mit 1 ml destilliertem Wasser und einer Temperatur des Sandbades von 65 °C durchgeführt. Spätere Versuche wurden mit 0,5 ml Wasser und höheren Temperaturen durchgeführt, da durch die Reduzierung der zugegebenen Wassermenge die Kondensation am Deckel begrenzt werden konnte und so die Gefahr von Tropfenbildung verringert wurde. In den ersten Versuchen zeigte sich nach zwei bis drei Tagen der Inkubation eine erkennbare Umkristallisation der Matrixschichten abhängig von der Wahl der Matrix (Abbildung 47, Abbildung 48). Während DHB

optisch deutliche Veränderungen aufwies, waren die Veränderungen bei Sinapinsäure und CHCA gering. Interessant ist, dass sich die mechanische Stabilität der Matrixschichten abhängig vom Grad der Umkristallisation verändert. Die Inkubation von Sinapinsäure- und CHCA-Schichten führte eher zu einer Destabilisierung der Schicht, die sich nun leichter in großen Stücken vom Probenteller ablösen lies. Da augenscheinlich kaum Umkristallisation stattfand, wurden die Schichten vermutlich nur vom Wasser unterwandert, was zu einer leichten Ablösbarkeit der Schichten führte.

Träger mit DHB
bedampft



Träger mit DHB
bedampft und
3 Tage
befeuchtet



Träger mit DHB
bedampft und
14 Tage
befeuchtet

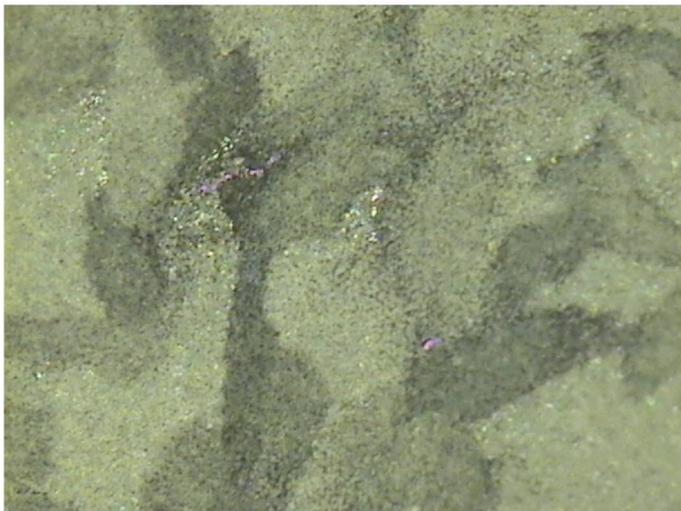


Abbildung 47: Inkubation von DHB-Schicht mit Wasser

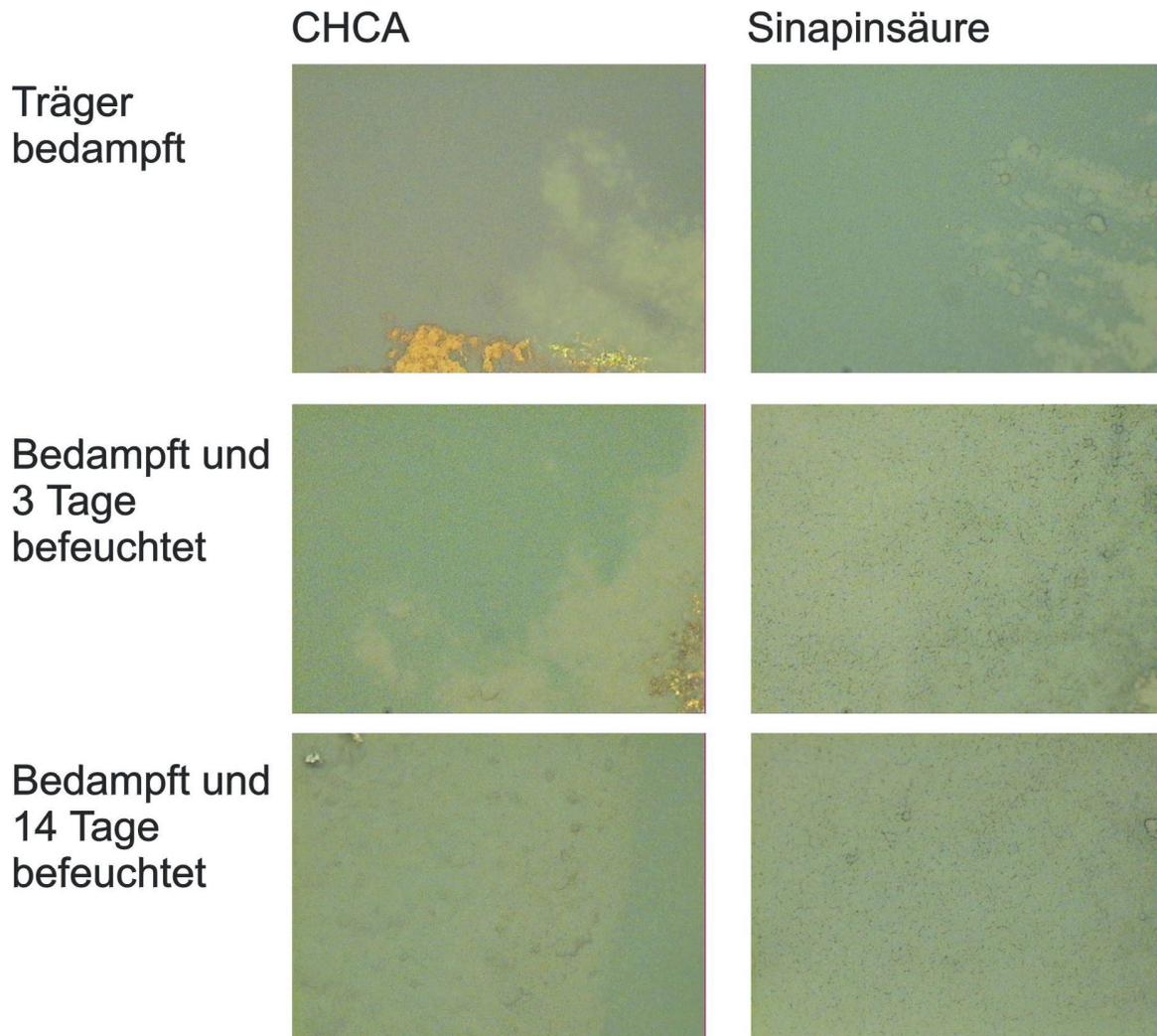


Abbildung 48: Inkubation von Sinapinsäure- und CHCA-Schicht mit Wasser

Die inkubierten Schichten aus DHB kristallisieren wesentlich schneller um. Schon nach wenigen Stunden wurden erste Veränderungen sichtbar, und nach 14 Tagen war der Prozess vollkommen abgeschlossen. Das unterschiedliche Verhalten der drei Matrices ist ohne Frage durch ihre unterschiedliche Wasserlöslichkeiten bedingt. Während sich Sinapinsäure und CHCA sehr schlecht in Wasser lösen, ist DHB gut wasserlöslich. Die DHB-Schicht wurde durch die Umkristallisation wesentlich stabiler und das Herauslösen von großen Teilen durch mechanische Belastungen oder durch Laserbeschuss wurde verhindert. Die Kristallisation konnte durch die Erhöhung der Temperatur der feuchten Atmosphäre beschleunigt werden. Versuche mit einer Temperatur von 125 °C des Sandbades führten schon nach 24 Stunden zur Umkristallisation, und nach drei Tagen konnte keine weitere

Veränderung der Probenoberfläche festgestellt werden. Eine weitere Erhöhung der Temperatur scheint aufgrund der Schmelztemperaturen der verwendeten Matrices von 200 bis 260 °C nicht mehr sinnvoll. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass die Temperaturen, die an der Probe erreicht werden, deutlich niedriger liegen als am Boden des Inkubationsbehälters. Höhere Temperaturen als 70 °C am Probenteller sind im Hinblick auf die zu vermessenden Proben zu vermeiden, da ab diesen Temperaturen die Denaturierung von Proteinen einsetzt und so bei biologischen Proben unerwünschte Veränderungen eintreten.

Goldträger mit Filzstiftstrich Bedampfung DHB und Befeuchtung

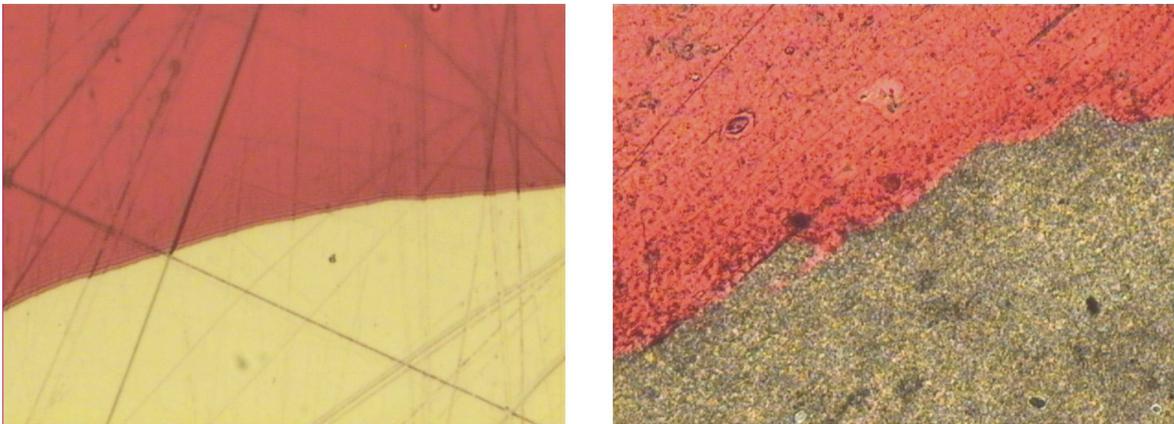


Bild: 650 x 500 µm

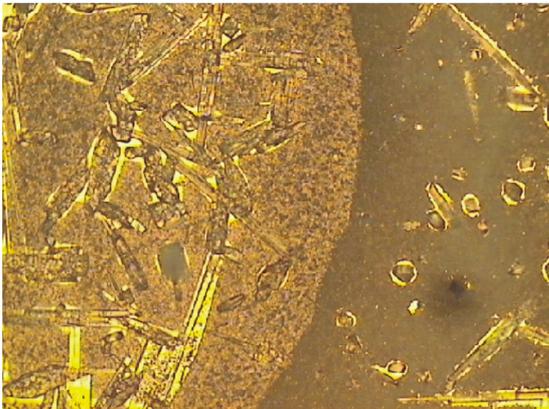
Abbildung 49: Filzstiftstrich vor und nach Präparation mit DHB

Die Randbegrenzung eines Filzstiftstriches in Abbildung 49 (linkes Photo) zeigt sowohl vor als auch nach der Bedampfung mit Matrix und Inkubation mit Wasser (rechtes Photo) weiterhin eine scharfe Grenze zwischen Farbe und unbehandeltem Probenträger. Trotz der Veränderung durch die Präparation kann bei dieser Art der Behandlung davon ausgegangen werden, dass die laterale Verteilung der Analyten auf der Oberfläche der Probe innerhalb der Auflösung des rasternen Lasers erhalten bleibt.

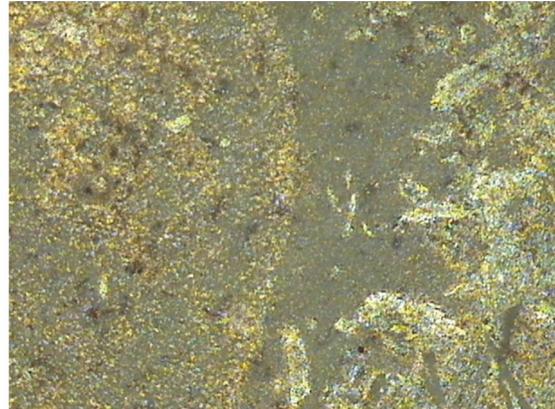
Die Veränderung der Schichten durch Inkubation mit Wasser hängt auch von den Proben selber ab. Schon beim Auftragen von Peptidgemischen auf die Oberfläche und anschließender Präparation zeigte sich ein unterschiedliches Kristallisations-

verhalten der Matrix, vergleicht man Bereiche innerhalb und neben dem aufgetragenen Peptidgemisch. (Abbildung 50). Auf einem Goldprobenträger, der zuvor großflächig mit einem verdünnten roten Farbstoff bestrichen worden war, wurde 1 µl des Peptidgemischs aus Substanz P, Melittin und Insulin aufgetragen. Nachdem der Tropfen eingetrocknet war, wurde der Träger fünf Minuten mit DHB bei 48 °C in der Bedampfungsanlage bedampft. Danach wurde er 24 Stunden bei einer Sandbadtemperatur von 125 °C mit Wasser inkubiert. Die Grenze des zuvor eingetrockneten Tropfens war nach dem Bedampfen mit Matrix und auch nach der Inkubation der Probe mit Wasser noch deutlich zu erkennen (Abbildung 50). Auch eine deutliche Umkristallisation der Matrix war zu beobachten. Dennoch blieb die scharfe Grenze des vorher aufgegebenen Peptidgemischs erhalten. Dieses Beispiel zeigt, dass eine Präparation ohne eine merkliche Wanderung des Peptidgemischs möglich ist.

Goldträger mit Peptidgemisch Bedampfung DHB



Vor Inkubation mit Wasser
Bild: 650 x 500 µm



Nach Inkubation mit Wasser

Abbildung 50: Veränderung des Randes des Peptidgemischtropfens

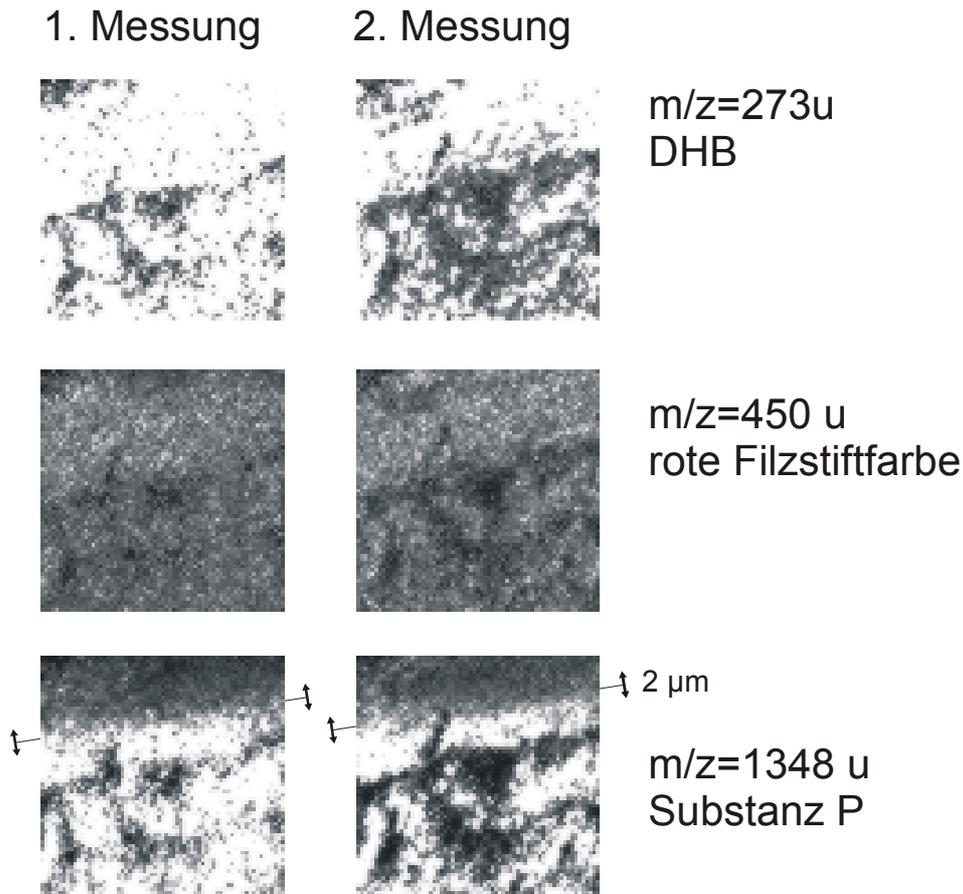


Abbildung 51: Ionenverteilungsbilder der Grenze eines präparierten Peptidgemischs (100 x 100 μm , 1 μm Schrittweite)

Abbildung 51 zeigt, dass eine laterale analytische Auflösung von etwa 2 μm mit dieser Präparationsmethode mittels SMALDI-Massenspektrometrie erreicht werden kann. Es wurden zwei Messungen der gleichen Probenstelle durchgeführt. Ein Bereich von 100 μm mal 100 μm wurde mit einer Schrittweite von 1 μm abgerastert. Jeweils ein Laserschuss pro Rasterschritt wurde auf die Probe abgegeben und ein Massenspektrum aufgenommen. In Abbildung 51 sind die Intensitätsverteilungen für drei Massen dargestellt. Die obere Reihe zeigt das Massesignal der aufgetragenen Matrix DHB ($[2 \cdot \text{DHB} - 2 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+ = 273 \text{ u}$), die mittlere Reihe gehört zu dem zuvor aufgetragenen verdünnten roten Farbstoff ($m/z = 450 \text{ u}$) und die untere Reihe gehört zum Peptid Substanz P ($m/z = 1348,6 \text{ u}$). Die Verteilung der einzelnen Komponenten zeigt, dass sowohl die Matrix als auch der rote Farbstoff gleichmäßig verteilt sind. Da genau der Rand des eingetrockneten Tropfens abgerastert wurde, ist Substanz P als ein Analyt des Peptidgemischs nicht gleich-

mäßig verteilt. Deutlich ist eine Grenze im oberen Bereich des Bildes von ca. 3 μm Breite zu sehen, in dem die Intensität des Substanz P Massesignals auf Null abfällt. Die erzielten Intensitäten dieser Messungen fallen deutlich intensiver im Vergleich zur Sprühmethode (Kapitel 5.2, Abbildung 42) aus. Dies lässt auf einen wesentlich besseren Einbau des Analyten von der Oberfläche in die entstehenden Matrixkristalle schließen. Eine zweite Messung der gleichen Probenstelle belegt, dass die Matrixschicht relativ dünn ist (kleiner 2 μm), da sie schon teilweise abgetragen ist. Um eine geringe laterale Migration des Analyten zu erreichen sind diese dünnen Schichten notwendig. Der Einbau in wesentlich dickere Matrixschichten mit verwertbaren Signalintensitäten hat zwangsläufig eine höhere Migration zur Folge. Ebenfalls zu sehen ist die erwartete Abhängigkeit der Intensität des Peptidsignals vom Matrixsignal. Die Messungen verdeutlichen die Möglichkeit einer Aufbereitung komplexer biologischer oder synthetischer Oberflächen mit der beschriebenen Präparationsmethodik (siehe auch Kapitel 6.2, Abbildung 60 bis Abbildung 63). Eine Optimierung der Präparationsdauer, also eine effektivere Inkubation der Probe mit Lösungsmittel steht noch aus. Dennoch steht mit dieser Präparationsmethode schon jetzt und erstmals ein Verfahren zur Verfügung, mit dem SMALDI-Massenspektrometrie mit einer lateralen analytischen Auflösung von 2 μm durchgeführt werden kann.

6 Anwendungsbeispiele SMALDI-MS

In diesem Kapitel werden die Möglichkeiten der SMALDI-Massenspektrometrie anhand einiger Beispiele erläutert und aufgezeigt, dass diese Methodik aufgrund ihrer vielseitigen Anwendbarkeit und Entwicklungsmöglichkeiten in Zukunft eine entscheidende Rolle in der Massenspektrometrie einnehmen wird.

Die Methodik kann zur Untersuchung des MALDI-Prozesses genutzt werden und somit zur Weiterentwicklung und Optimierung der (nicht orts aufgelösten) MALDI-Massenspektrometrie beitragen. Verschiedene Präparationsmethoden und Kristallisationsversuche können zur Aufklärung der Mechanismen des Desorptions/Ionisations-Prozesses genutzt werden.

Desweiteren werden erste Ergebnisse zur Untersuchung funktionalisierter Oberflächen präsentiert. Dabei werden die Grundlagen zur Herstellung und Analyse mikrostrukturierter Probenträger zur schnellen Erkennung von krankheitsrelevanten Markern erarbeitet.

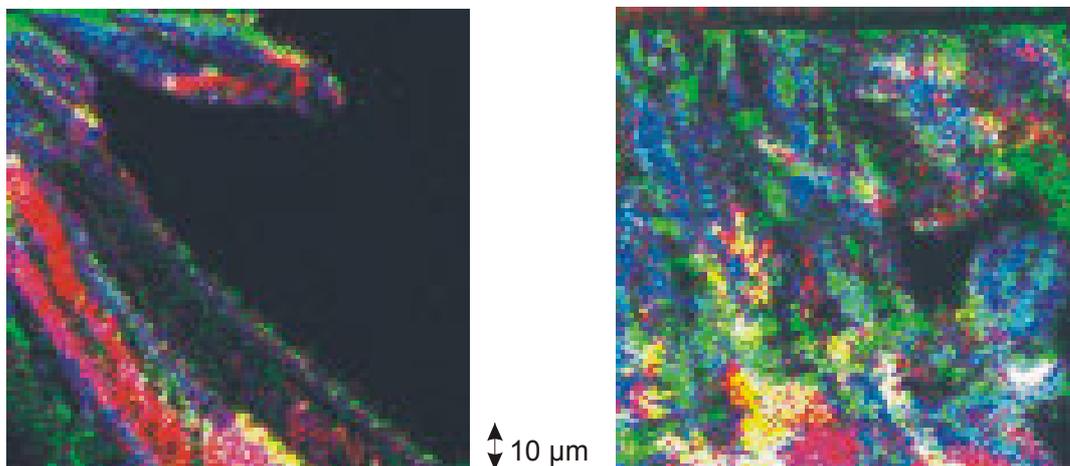
Neben synthetischen Oberflächen sind auch biologische Objekte für die Analyse mit SMALDI-Massenspektrometrie im mikroskopischen Maßstab interessant. Verschiedene Gewebeschnitte aus dem Pflanzen- und Tierreich können auf einfache Weise mit LDI-Massenspektrometrie untersucht werden. Die Vermessung von Gewebeschnitten und ausgewählten Gewebeteilen (z.B. Mikrodissektion) durch SMALDI-Massenspektrometrie gestaltet sich wegen der zusätzlich notwendigen Matrixpräparation etwas diffiziler. Als gut zugänglich erwies sich die Analyse von kultivierten Einzelzellen, die auf einem Probenträger aufgewachsen sind. Das Ziel ist die Bestimmung der Verteilung einzelner Analyten auf Gewebeteilen oder Einzelzellen zur Charakterisierung biologischer Strukturen. Mit der Erstellung von typischen Profilen sollte beispielsweise eine Erkennung von Krebszellen möglich werden.

6.1 Untersuchungen an MALDI-Präparationen

Erste Ergebnisse zu den Grundlagen des MALDI-Prozesses wurden bereits in Kapitel 5.1 präsentiert. Die Ergebnisse sind ohne Frage nicht nur für die hochauflösende SMALDI-Massenspektrometrie, sondern ebenso für die normale MALDI-MS von großer Bedeutung. Abbildung 52 stellt unterschiedliche Verteilungen innerhalb von Standardpräparationen dar. Die Verteilung der Analyten sowohl innerhalb der Probe als auch innerhalb der Einzelkristalle hängt vom Probenort und seinen Kristallisationsbedingungen ab. Im Zentralbereich der Probe (Abbildung 52, rechtes Bild) liegt eine heterogene Verteilung der Analyten vor. Obwohl ein feinkristalliner Bereich mit Kristallgrößen von ca. 10 μm dargestellt ist, kann man eine Gleichverteilung (Weiß) kaum beobachten. Am Rand der Probe (Abbildung 52, linkes Bild) ist dieses Verhalten bei großen Kristallen noch ausgeprägter. Bereits hier findet eine Segregation der Analyten während des Kristallisationsvorgangs statt. Strategien um diese Entmischung zu vermeiden, sind eine geeignete Wahl des Lösungsmittels bzw. das Erwärmen der Probe, um eine schnelle Kristallisation zu erreichen (vgl. Abbildung 29, Abbildung 30).

Rand einer MALDI-Präparation

Zentralbereich einer MALDI-Präparation



Überlagerungsbilder der lateralen Verteilung von Substanz P (Rot), Melittin (Grün) und Insulin (Blau): 100 μm x 100 μm , Rasterweite 1 μm

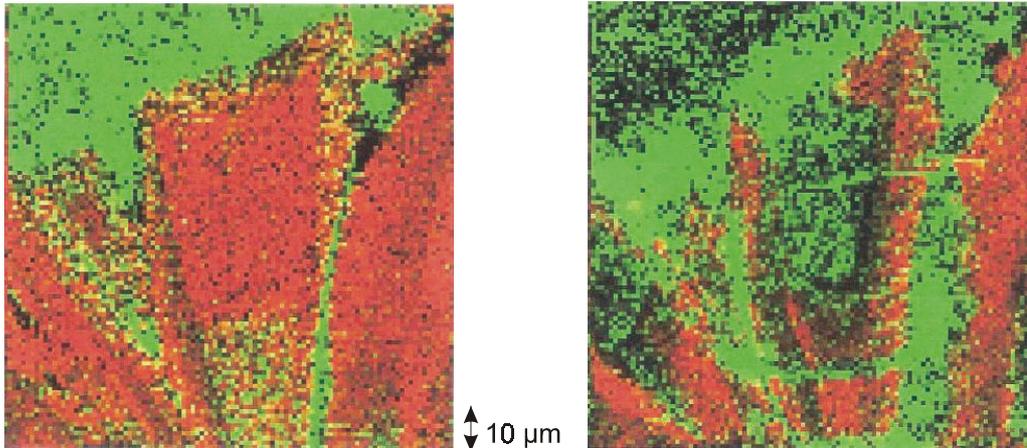
Abbildung 52: Unterschiedliche Verteilungen innerhalb einer DHB-Präparation

Gleichzeitig zeigt dieses Beispiel, warum es mit einer solchen inhomogenen Verteilung der Analyten auf einer Größenskala bis in den Millimeterbereich grundsätzlich schwierig ist, MALDI-Massenspektrometrie quantitativ zu betreiben. Die Quantifizierung ist in der MALDI-Massenspektrometrie schon sehr früh als äußerst problematisch erkannt worden [145][146][147]. Durch die starke Segregation wird zwangsläufig auch die Intensität des Massensignals stark schwanken und somit zu großen Fehlern in der Zuordnung zwischen Signalintensität und Menge des Analyten führen.

Dass die MALDI-Präparation in Wahrheit ein effizienter Reinigungs- und Trennschritt ist, wird mithilfe von SMALDI-Untersuchungen sehr deutlich. Der Einbau des Analyten in die Matrix und das entgegengesetzte Verhalten von Salzen wird in Abbildung 53 erkennbar. Der Analyt (Substanz P) ist in diesem Überlagerungsbild dem roten Farbkanal und Natrium dem grünen Farbkanal zugeordnet. Deutlich ist zu erkennen, dass kaum Signale von beiden Substanzen (Gelb) vorhanden sind. Genau wie beim Kristallisationsverhalten liefern die beiden Substanzklassen ein komplementäres Bild. Substanz P wird in den Kristall eingebaut, während Natrium im amorphen bzw. mikrokristallinen Bereich oder nur am äußeren Rand der großen Kristalle zu finden ist. Der Einbau von Analytmolekülen in den wachsenden Kristall, sowie der Ausschluss von Natrium, Kalium und anderen Alkalimetallen wird als entscheidend für die hochempfindliche Durchführbarkeit von MALDI-MS-Experimenten angesehen [148][149][122]. Der Abtrag der Probe wird in Abbildung 53 sehr gut verdeutlicht. Nach der fünften Abrasterung der Probe ist der mehrere Mikrometer dicke Kristall fast vollständig abgetragen. Die Abtragraten pro Laserschuss lassen sich auch mit Hilfe der 3D-Bilder von Standardpräparationen vermessen, da eine Bestimmung der Topologie der Probe aufgrund der Massenverschiebungen bzw. der Zeitverschiebungen für die nichtleitenden MALDI-Proben möglich ist (vgl. Kapitel 4.2, Abbildung 24) Aufgrund der ermittelten Abtragraten im Bereich von 300 bis 500 nm pro Laserschuss wird eine fast vollständige Abtragung des Kristalls nach fünf Messungen beobachtet (Abbildung 53).

1. Messung

5. Messung



Überlagerungsbilder der lateralen Verteilung von Natrium (Grün) und Substanz P(Rot): 100 µm x 100 µm, Rasterweite 1 µm

Abbildung 53: DHB-Kristall nach einer bzw. fünf Messungen [125]

Die Untersuchung des Kristallisationsverhaltens der Matrix mit der rasternden Massenspektrometrie dient der Verbesserung der Präparationstechniken für MALDI. Ebenfalls im Mittelpunkt des Interesses steht die Mikropräparation im Pikomol-Maßstab, um mit wesentlich weniger Probeneinsatz ein noch gutes Ergebnis für z. B. die Identifizierung eines Proteins aus einem Probengemisch zu bekommen [150]. Abbildung 54 zeigt die Verteilungsbilder einer Mikropräparation von β -Cyclodextrin mit Hilfe der Tintenstrahltechnik [125]. Dazu wurde ein handelsüblicher Tintenstrahldrucker (HP Deskjet 500c) derart modifiziert, dass die Lösungen auf einen Probensteller gespottet werden können. Bei dieser Tintenstrahltechnik wird in einem kleinen Volumen ein Flüssigkeit sehr schnell erhitzt, so dass ein Tropfen aus der Düse geschossen wird. Dabei wurde für den Tropfen eine Lösung von $2,5 \cdot 10^{-4}$ M β -Cyclodextrin in $2,5 \cdot 10^{-2}$ M DHB in Ethanol / Wasser 1:1 verwendet. Es wurden ca. 2 pL der Lösung pro Probenpunkt auf den Probensteller gespottet. Dies entspricht einer Probenmenge von 500 amol β -Cyclodextrin pro Probenpunkt. Der Aluminiumprobenträger wurde mit einer Rasterweite von 1 µm abgerastert und Verteilungsbilder für β -Cyclodextrin, Natrium, DHB und Aluminium (Probenstellermaterial) aufgenommen. Der Probenfleck hatte einen Durchmesser von 25 – 30 µm und zeigte einen deutlichen, etwa 5 µm dicken Rand, in dem hauptsächlich Natrium zu sehen war.

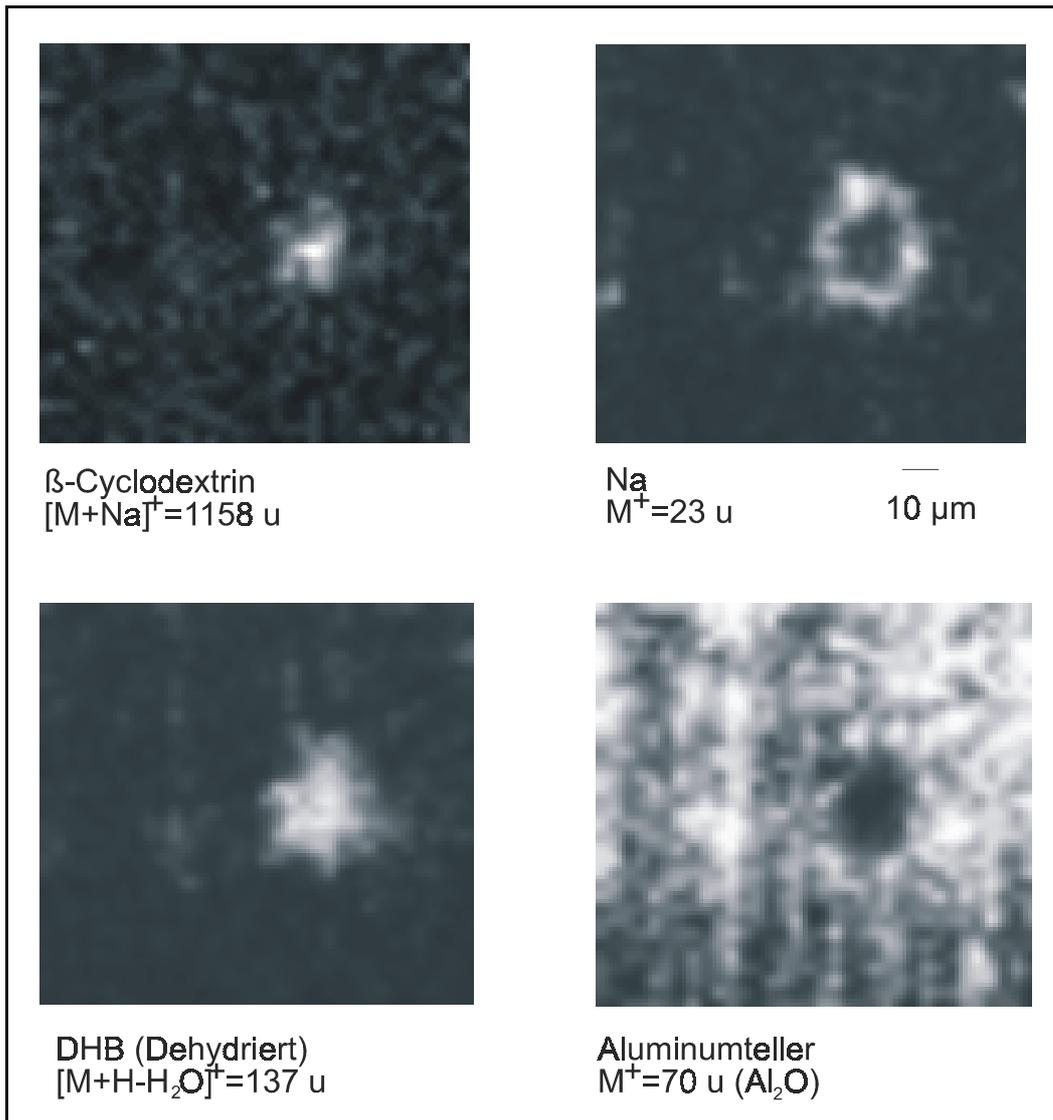


Abbildung 54: SMALDI-MS Verteilungsbilder einer Mikropräparation mit Hilfe eines Tintenstrahldruckers [125]

Mithilfe der in Kapitel 4.1 beschriebenen Datenauswertungsmethode wurden die Ergebnisse im Hinblick auf mikroskopische Probeneigenschaften eingehender untersucht. Das obere Bild der Abbildung 55 ist eine Überlagerung der β-Cyclodextrinverteilungsbildes (rot) mit einem Bild für Natrium (grün). Obwohl das Oligosaccharid sich nur als natriumangelagertes Ion nachweisen lässt, sind die Salzverunreinigungen räumlich getrennt vom Analyten. Dies wird deutlich durch das Fehlen von gelben Pixeln, die für das Vorhandensein beider Massensignale im selben Massenspektrum stehen. Im unteren Überlagerungsbild der Abbildung 55 wird Cyclodextrin ausschließlich gemeinsam mit der Matrix (gelb, keine roten

Bildpunkte) beobachtet, während Natrium nicht zusammen mit der Matrix auftritt (keine hellblauen Bildpunkte). Dies legt nahe, dass Oligosaccharide mit Alkali-anlagerung nur aus dem mikrokristallinen inneren Bereich einer Probe beobachtet werden, da diese Substanzklasse in der Regel nicht in die Kristalle eingebaut werden [103], aber im mikrokristallinen Bereich eine Alkali-Anlagerung zur Desorption und Ionisation ausreichend ist.

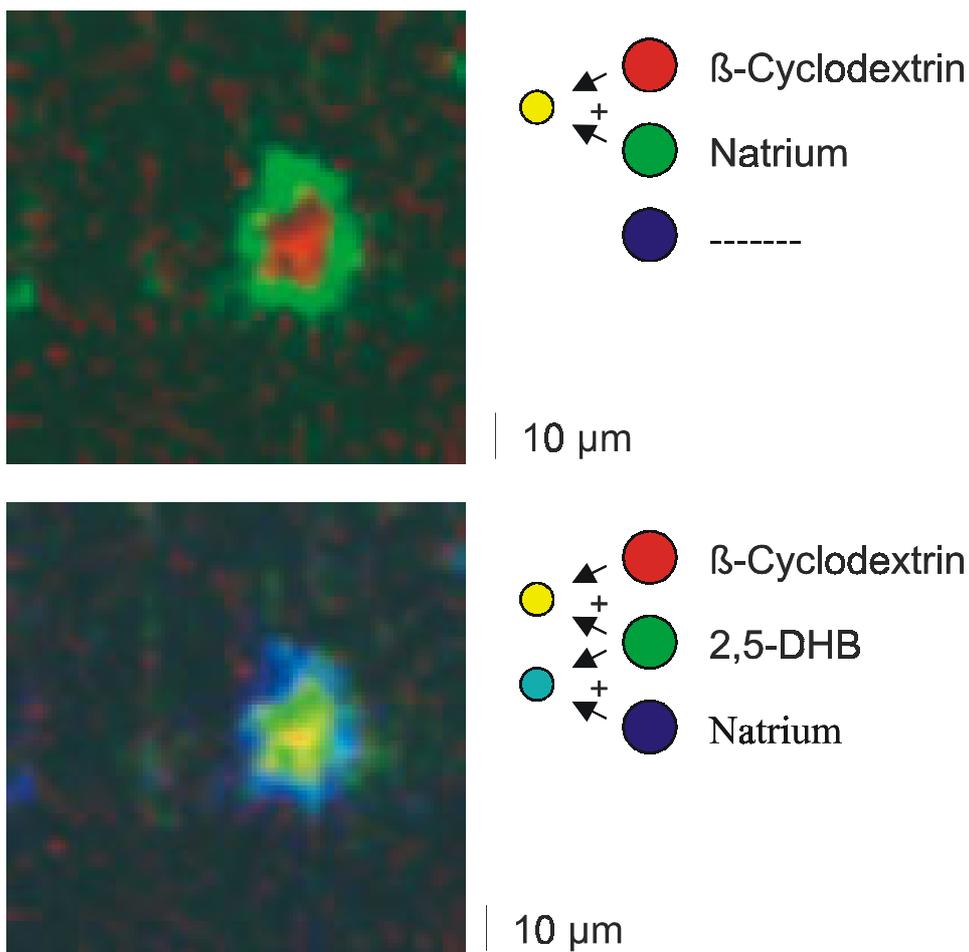


Abbildung 55: Überlagerungsbilder zeigen Ausschluss von Natrium aus der Probe

Die Beispiele verdeutlichen, dass die Nachweisempfindlichkeit und Aussagekraft der SMALDI-Massenspektrometrie sehr hoch ist und die orts aufgelöste Analytik für die Untersuchung von Kristallisationsphänomenen für die Untersuchung und Weiterentwicklung von MALDI-Präparationstechniken eine wichtige Rolle spielt.

6.2 Funktionalisierte Siliziumoberflächen

In diesem Kapitel werden die Grundlagen und ein Konzept zur Herstellung und Analyse mikrostrukturierter Probenträger für die schnelle Erkennung von krankheitsrelevanten Markern untersucht. Dafür werden mehrere funktionalisierte Oberflächen vorgestellt, um in einem ersten Schritt zu zeigen, dass spezifisch an diese Oberflächen gebundene Analyten mit der MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen werden können. [151][152][153].

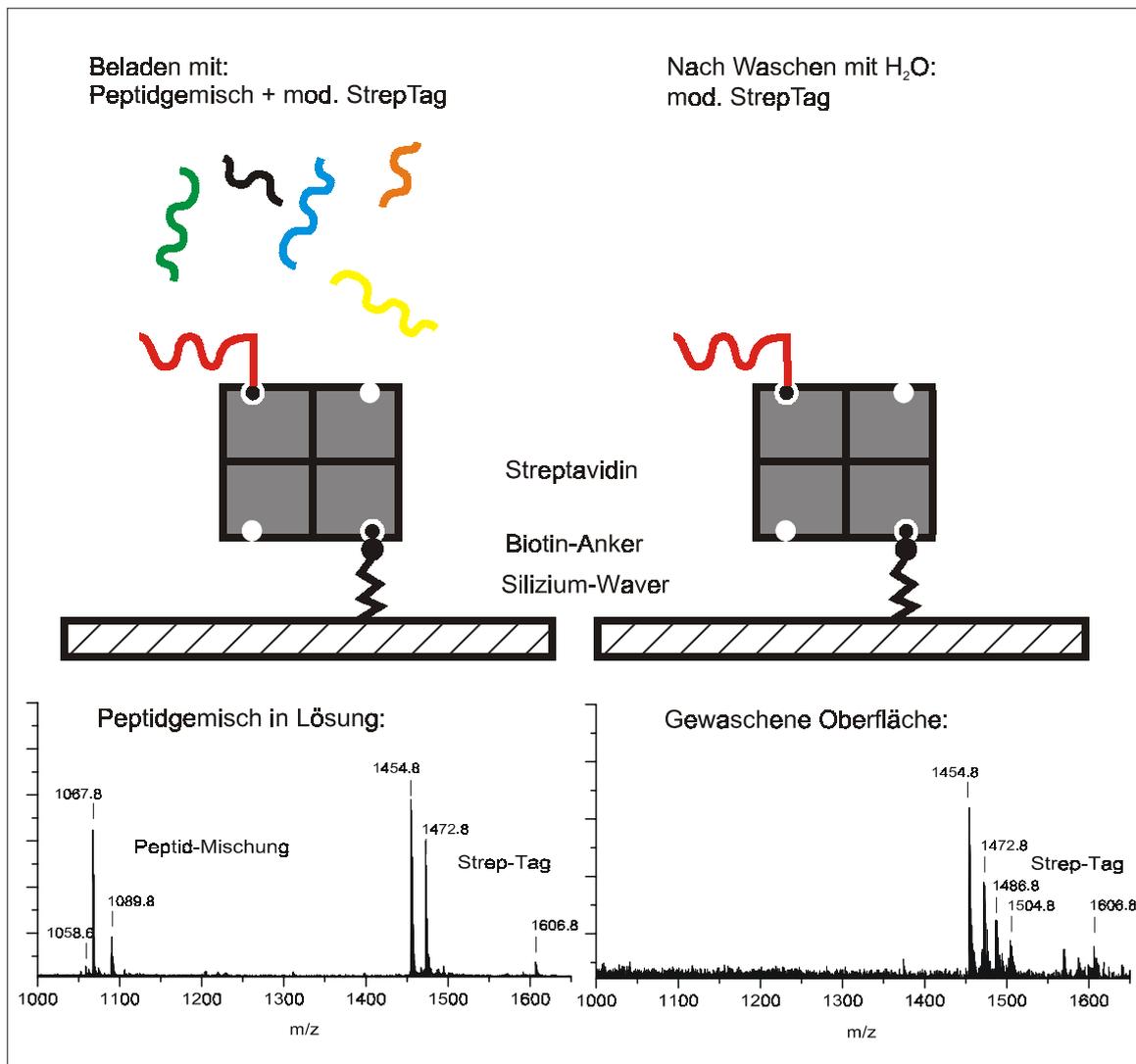


Abbildung 56: Funktionalisierter Siliziumträger mit Peptid-Mischung

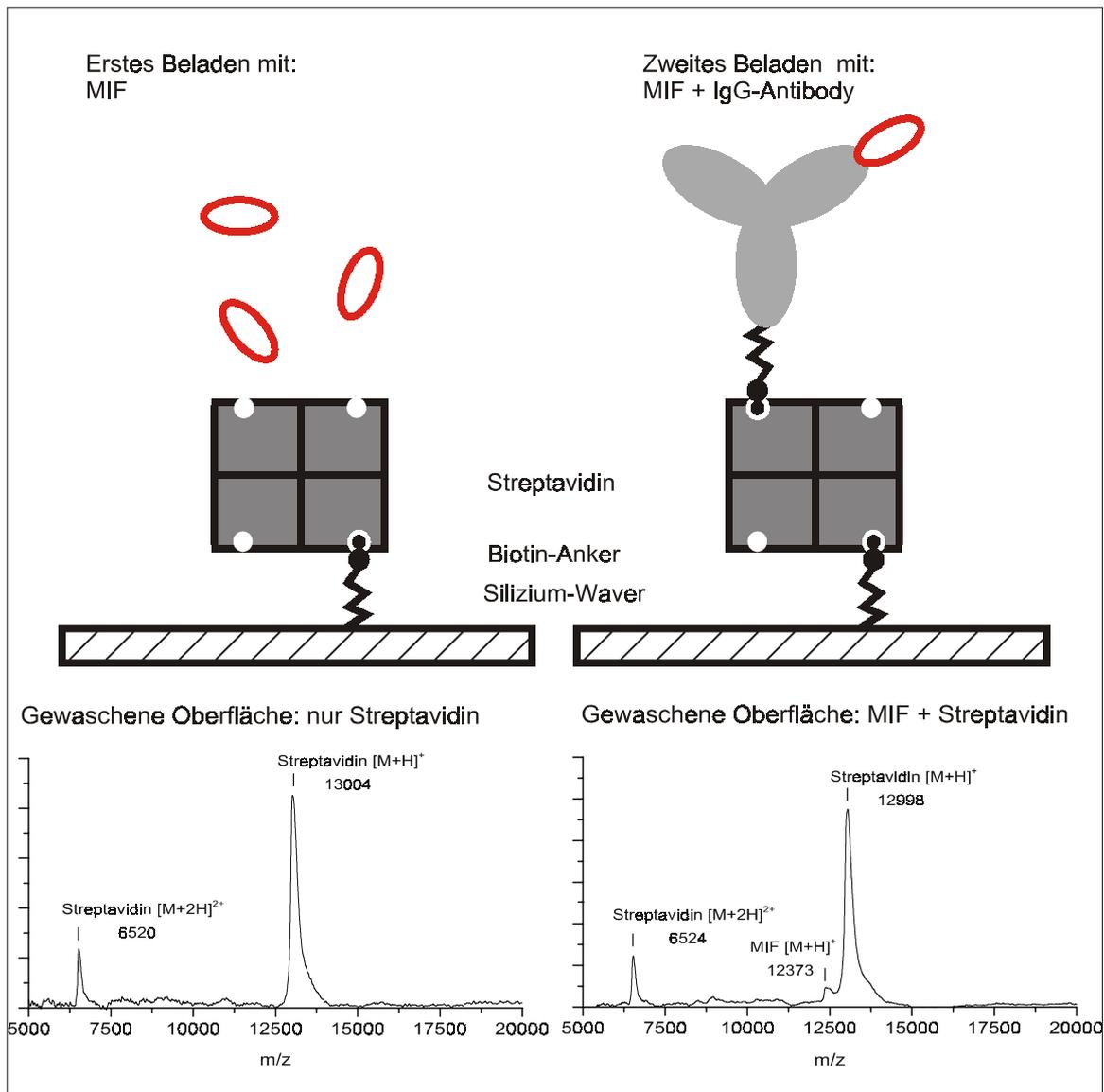


Abbildung 57: Funktionalisierte Oberfläche mit MIF

Die Oberflächen wurden am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart hergestellt [154]. Es handelt sich um 5 mm mal 5 mm große Platten aus hochreinem Silizium, wie sie zur Halbleiterherstellung benutzt werden. Die an der Luft teilweise oxidierten Siliziumträger werden mit Ammoniak-Wasserstoffperoxidlösung bei 75 °C hydrophilisiert, um so eine reine Silanolgruppenoberfläche zu erzeugen. Über eine Epoxy-Silanisierung, die zur Stabilisierung einer gerichteten funktionellen Gruppe dient, wird ein Biotin kovalent an die Oberfläche gebunden. An dieses Biotin wird über eine der vier Bindungsstellen des Streptavidinkomplexes das Streptavidin nicht-kovalent gebunden. Da die Bin-

dung des Streptavidins aufgrund einer definierten Bindungsstelle zu einer gerichteten Position des Streptavidins gegenüber der Oberfläche führt, stehen nun zwei Bindungsstellen für Experimente auf dieser funktionalisierten Oberfläche zur Verfügung.

Auf der Oberfläche wird nun ein Peptidgemisch bestehend aus drei Peptiden (SM22a: NH₂-YGMPRQIL-OH, Mage3: NH₂-FLWGPRALV-OH, Ribo. Prot. L19: NH₂-YLVKGNVF-OH) und einem modifizierten StrepTag (Ac-Lys(Lev)-Aca-[StrepTag]-amid, StrepTag: AWRHPQFGG, jeweils 2*10⁻⁵ mol/l in Ethanol/Wasser 1:1), das in die Bindungstaschen des Streptavidins passt, gegeben (Abbildung 56). Danach wird die Oberfläche intensiv mit Wasser gereinigt, um alle nicht-spezifisch gebundenen Bestandteile von der Oberfläche herunter zu waschen. Auf die gesäuberte Oberfläche wird ein Tropfen Matrix (0,5 µl Ethanol/Wasser 1:1, 20 mg/ml DHB) gegeben und in einem warmen Luftstrom getrocknet. Der Siliziumträger wird mit doppelseitig klebendem leitendem Film auf einen Probenträger geklebt. Die Messungen im Massenspektrometer "Aladim II" (Abbildung 56, linkes Spektrum) zeigen, dass auf der funktionalisierten Oberfläche nur das an das Streptavidin gebundene StrepTag-Peptid nachweisbar ist. Zum Vergleich wird mit einer Standardpräparation auch die aufgetragene Peptidmischung vermessen (Abbildung 56, rechtes Spektrum). Der Vergleich zeigt, dass die Peptide die nicht-spezifisch an die Oberfläche binden, beim Waschschrift herunter gewaschen werden, während das StrepTag-Peptid ([M+H]⁺=1454,8 u und 1472,8 u) erst beim Aufbringen der sauren Matrix von der Oberfläche gelöst wird. Modifikationen des StrepTag-Peptids ([M+H]⁺=1486,8 u and 1504,8 u), die als Nebenprodukt aus der Synthese des Peptids entstehen, zeigen ebenfalls eine spezifische Bindung an das Streptavidin.

Abbildung 57 demonstriert ein zweites Experiment mit der gleichen funktionalisierten Oberfläche. Die Oberfläche des Siliziumträgers wird zunächst mit dem Protein MIF (macrophage migration inhibition factor) (2*10⁻⁶ mol/l) [155] beladen und mit Wasser gewaschen. Auf den Probenträger, der wie im ersten Experiment auf einem modifizierten Probenträger zur Einschleusung ins Massenspektrometer "Aladim II" befestigt wurde, wird 0,5 µl Matrix (Ethanol/Wasser 1:1, 20 mg/ml DHB)

gegeben. Der Tropfen wird unter einem warmen Luftstrom getrocknet und im Massenspektrometer unter erhöhter Beschleunigungsspannung bei linearem Betrieb vermessen. Das Protein MIF ($[M+H]^+ = 12373$ u) sowie die Streptavidinuntereinheit ($[M+H]^+ = 13004$ u) lassen sich, bedingt durch ihre Größe, unter diesen Bedingungen mit höherer Detektorempfindlichkeit nachweisen. Da das Protein MIF keine Bindungsstelle an das Streptavidin besitzt, kann von dieser Probe nur die durch den sauren pH-Wert der Matrix-Lösung von der Oberfläche gelöste Streptavidinuntereinheit nachgewiesen werden. Wird hingegen ein modifizierter IgG-Antikörper ($2 \cdot 10^{-6}$ mol/l) mit einer Biotin-Funktion als Mediator beim Beladen der Oberfläche hinzugegeben, so können sowohl Streptavidin als auch MIF nachgewiesen werden. Der funktionalisierte Antikörper bindet über das Biotin kovalent an die Oberfläche. Das Protein MIF wird seinerseits an den Antikörper gebunden und kann somit nicht von der Oberfläche gewaschen werden. Auch dieses zweite Experiment belegt die Fähigkeit der Oberflächen selektiv Stoffe an die Oberfläche zu binden. Gleichzeitig wird gezeigt, dass die MALDI-Massenspektrometrie eine Methode ist deren Empfindlichkeit ausreicht, um solche Marker nachzuweisen.

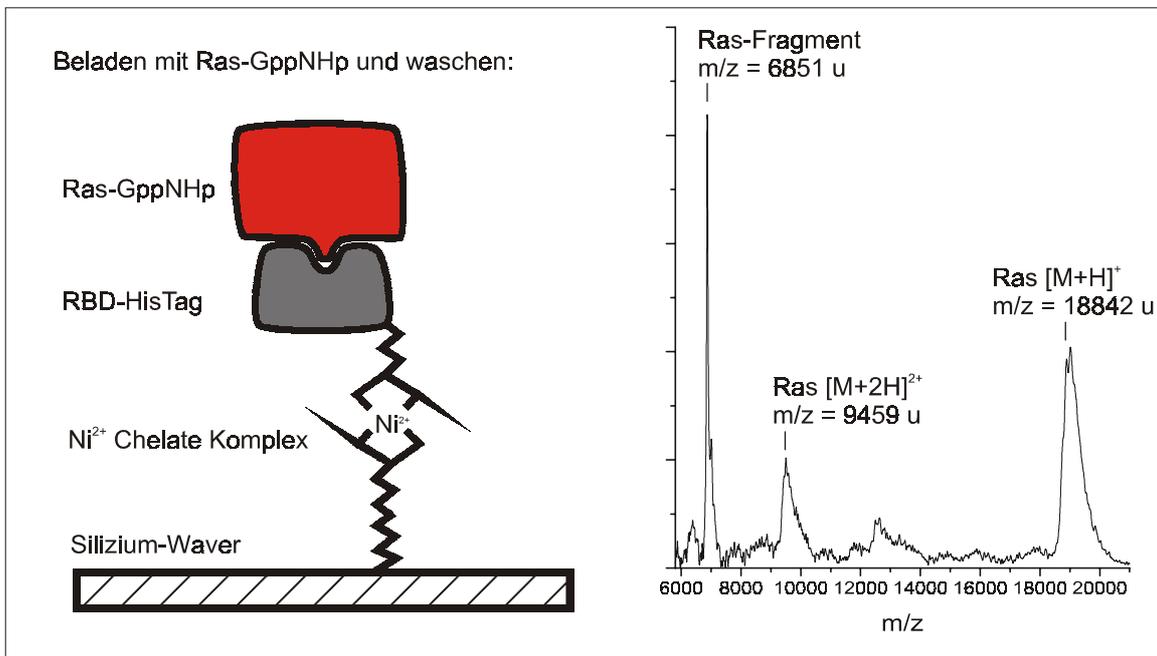


Abbildung 58: Funktionalisierte Oberfläche mit Ni²⁺/NTA-Komplex und RBD/RAS-Komplex

Eine weitere Oberfläche, die zur Charakterisierung und Analyse zur Verfügung
128

stand, weist einen Ni^{2+} -Chelatkomplex zur Bindung anderer Proteine an die Oberfläche auf (Abbildung 58) [154][156][157]. Die Siliziumoberfläche wurde genauso wie die erste Oberfläche zunächst hydrophilisiert. Im Anschluss wurde eine Epoxy-Silanisierung der Oberfläche vorgenommen. Schließlich wurde eine Nitrilotriessigsäuregruppe eingeführt und zuletzt auf der Oberfläche mit einer wässrigen Nickel-sulfatlösung ein Ni^{2+} /NTA-Chelatkomplex gebildet. An diese Oberfläche wurde ein His-Tag-modifiziertes Protein Ras Binding Domain (RBD) adsorbiert und eine Schicht von dichtgepackten Proteinen unter Ausbildung eines NTA/ Ni^{2+} /His-Tag-Chelatkomplexes gebildet.

Die Aktivität dieser Oberfläche als Rezeptor konnte nachgewiesen werden, indem der Bindungspartner, der aktivierte Ras-GTP-Komplex (RAS-GppNHp) in Lösung ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l in Wasser) auf die Oberfläche gegeben wurde und nach einer Einwirkzeit von ca. 10 Minuten der Siliziumträger mit Wasser gewaschen wurde, um das ungebundene Ras-GTP von der Oberfläche zu waschen. Auf die Probe wurde 0,5 μl Matrix (Ethanol/Wasser 1:1, 20 mg/ml DHB) gegeben. Der Tropfen wurde unter einem warmen Luftstrom getrocknet und im Massenspektrometer bei linearem Betrieb vermessen.

Auf dem Siliziumträger konnte, trotz des intensiven Waschens, der RAS-GppNHp ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 18842$ u, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 9459$ u) und ein Fragment des RAS-GppNHp ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 6851$ u) nachgewiesen werden.

Der nächste Schritt zur Entwicklung einer mikrostrukturierten, bioanalytisch aktiven Oberfläche bestand in der Erprobung eines Verfahrens zur gezielten Strukturierung der aktiven Flächen [158] und deren Messung mit MALDI-MS [153]. Zur Erzeugung der Strukturierung wurden oberflächenmodifizierte Silica-Nanopartikel benutzt, an deren Biotin-Anker ein Streptavidin gebunden ist. Diese Nanopartikel wurden in Suspension aufgenommen und mit Hilfe eines Microarrayer auf einen Siliziumträger gespottet. Die erzeugten Punkte aus Nanopartikeln hatten einen Durchmesser von 120 μm und waren mit einem Abstand von 300 μm auf dem Probenträger angeordnet (Abbildung 59, oberes rechtes Bild).

Diese Probenträger wurden mit einem Gemisch aus Substanz P und einem biotinylierten Peptid (Biotinyl- ϵ -aminocaproyl-Arg-Arg-Arg-Val-Thr-Ser-Ala-Ala-Arg-

Arg-Ser-OH, $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l in Ethanol/Wasser 1:1) beladen. Danach wurde die Oberfläche mit Wasser gewaschen, um alle nichtgebundenen Peptide von der Oberfläche zu waschen. Die kovalente Anbindung des biotinylierten Peptids findet vorwiegend spezifisch an den reaktiven Zentren des Streptavidins statt. Nach einer Aerosolbedampfung (Abbildung 59, mittleres rechtes Bild, Kapitel 5.2) wird die Probe mittels des Massenspektrometers "Aladim II" linear über einen gespotteten Punkt hinweg mit einer Schrittweite von $25 \mu\text{m}$ abgerastert. Die Messungen zeigen, dass das Peptid ($[M+H]^+ = 1655 \text{ u}$) vorrangig im inneren Bereich von ca. $80 \mu\text{m}$ des Punktes gebunden ist.

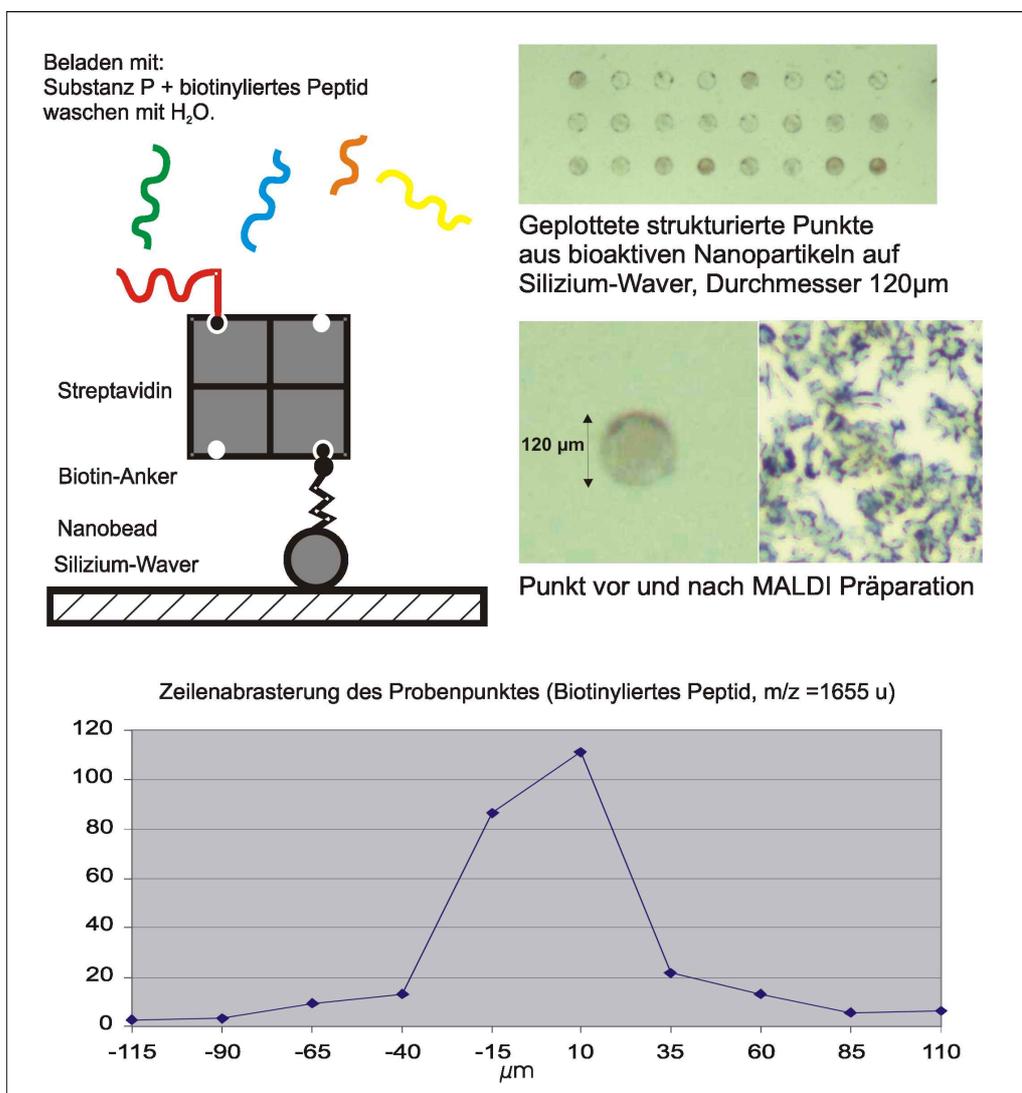


Abbildung 59: Strukturierte, mit Nanopartikeln beladene Oberfläche

Aufgrund der Größe der Kristalle, die bei der Aerosolbedampfung entstehen,

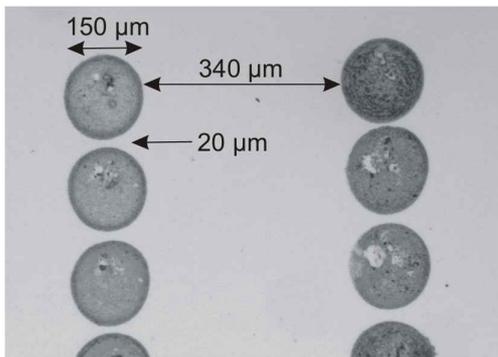
erschien eine Abrasterung der Oberflächen mit einer Schrittweite von 1 µm nicht sinnvoll. Durch Einsatz der in Kapitel 5.3 vorgestellten Methode der Bedampfung und anschließenden Inkubation mit Wasser konnten Matrixschichten hergestellt werden, die eine analytische Auflösung von wenigen Mikrometern zulassen.

Die strukturierte, mit Nanopartikeln beladenen Oberflächen des vorherigen Beispiels wurden nach vier Waschschritten mit 30 mM Tris-HCl-Lösung (pH = 7.4, Trizma-HCl, Sigma-Aldrich, Steinheim) mit einem Gemisch aus vier Peptiden (jeweils $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l in 30 mM Tris-HCl, pH = 7.4, Tabelle 4) beladen. Nach zehn Minuten wurde die Lösung von der Oberfläche entfernt und mit einer 0,05 % Triton-X-100-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) die nichtgebundenen Peptide von der Oberfläche entfernt. Es folgten 15 Waschschrritte mit 30 mM Tris-HCl-Lösung und drei Waschschrritte mit 3 mM Tris-HCl-Lösung. Danach wurde die Oberfläche unter einem warmen Luftstrom getrocknet. In Abbildung 60 sind die verschiedenen Stadien während des Beladens der Nanopartikel bzw. während der Präparation zu sehen. Die strukturierten Spots funktionalisierter Nanopartikel wurden durch das Aufbringen des Peptidgemischs sowie die verschiedenen Waschschrritte optisch nicht erkennbar verändert.

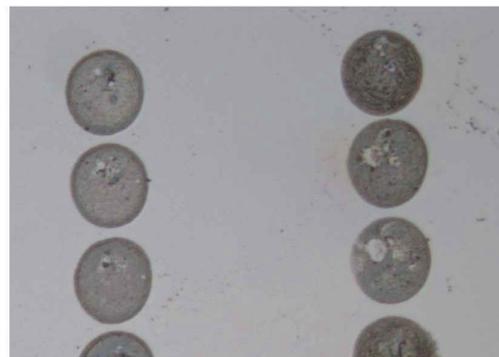
| Name | [M+H] ⁺ (mo.) | B&B |
|---|--------------------------|------------------------|
| K1 (NH ₂ -RDCKSTYRKD-OH) | 1271,61 u | 3160 (Hydrophil) |
| K1B (Biotinyl-ε-aminocaproyl-RDCKSTYRKD-NH ₂) | 1610,51 u | ~ 3000 (Hydrophil) |
| K2 (NH ₂ -RKFWLLMPAV-NH ₂) | 1259,74 u | -5840 (Hydrophob) |
| K2B (Biotinyl-ε-aminocaproyl-RKFWLLMPAV-NH ₂) | 1598,64 u | ~ -6000 (Hydrophob) |

Tabelle 4: Peptidgemisch zur Beladung der strukturierten Oberflächen (Hergestellt am Institut für Biochemie, RWTH Aachen)

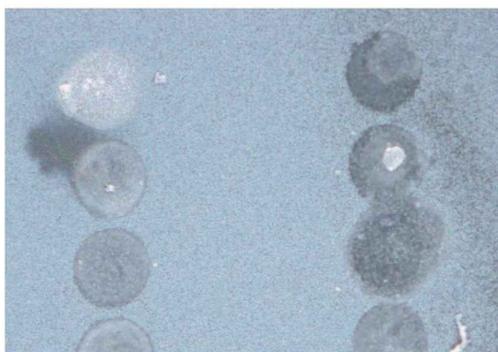
Die Präparation für die SMALDI-Massenspektrometrie erfolgte wie in Kapitel 5.3 beschrieben. Die Probe wurde mit DHB zwei Minuten bei 47 °C trocken bedampft und anschließend 50 Stunden bei 70 °C mit 500 µl destilliertem Wasser inkubiert. Auch bei diesen Präparationsschritten blieben die Strukturen auf der Oberfläche erhalten. Nach dem Bedampfen der Oberfläche mit DHB waren die Spots deponierter Nanopartikel nach wie vor erkennbar. Teilweise wurden auch größere DHB-Partikel durch zu schnelles Erhitzen des Feststoffes auf die Oberfläche befördert. Nach dem Inkubieren mit Wasser konnten weiterhin die Strukturierungen der Oberfläche beobachtet werden. Diese Präparationstechnik erwies sich als entscheidende Voraussetzung zur Anwendung von SMALDI-Massenspektrometrie mit einer analytischen Auflösung von wenigen Mikrometern.



Mit Nanopartikeln strukt. Oberfläche



Nach Beladen mit Peptiden und Waschen



Nach Bedampfen mit DHB



Nach Inkubation mit destilliertem Wasser

Abbildung 60: SMALDI-Präparation einer geplotteten, mit Nanopartikeln strukturierten Oberfläche

Zunächst wurden mit diesen Oberflächen Standardmessungen am Massenspektrometer "Aladim II" durchgeführt. Der Vergleich des Peptidgemischs vor der Auftragung auf die Oberfläche mit der Messung von der Oberfläche zeigte,

dass die Peptide K2 und K2B auch nach den Waschvorgängen noch von der strukturierten Oberfläche nachweisbar waren, während neben den geplotteten Punkten keine Peptide nachgewiesen werden konnten (Abbildung 61). Die Peptide wurden durch den Einsatz von Puffern zum größeren Teil mit Natrium- und Kaliumanlagerung nachgewiesen. Auch waren mehrfache Oxidationen durch Sauerstoff zu beobachten.

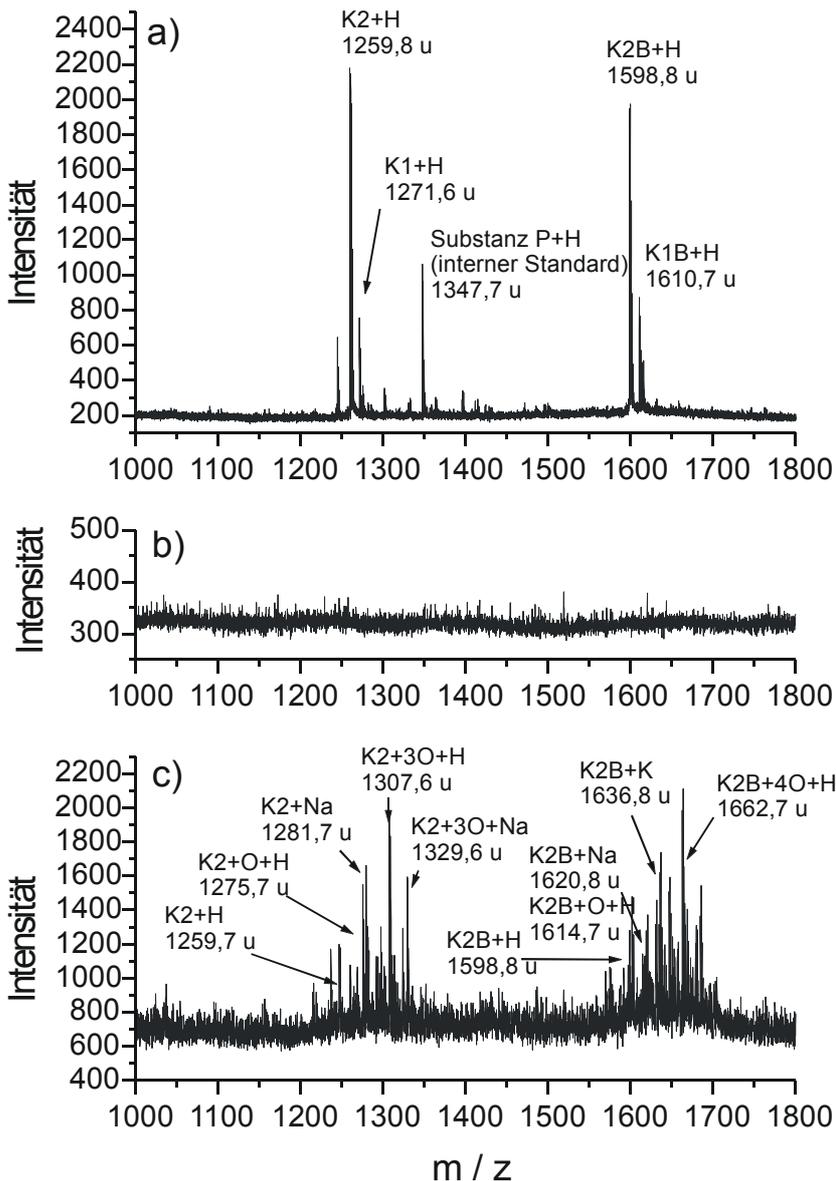


Abbildung 61: Vergleich von Messungen auf strukturierter Oberfläche
a) Peptidgemisch vor Auftragen auf die Oberfläche (20 Spektren gemittelt)
b) Probenstelle neben geplotteten Nanopartikeln (30 Spektren gemittelt)
c) Probenstelle auf geplotteten Nanopartikeln (30 Spektren gemittelt)

Die anschließenden Messungen auf dem Rand eines geplotteten Punktes mit SMALDI-Massenspektrometrie lieferten Ionenverteilungsbilder der beiden Peptide und der Matrix (Abbildung 62, Abbildung 63). Die Bilder wurden mit einer Rasterweite des Lasers von 1 μm und einem Laserschuss bzw. einem Spektrum pro Rasterschritt aufgenommen. Der abgerasterte Bereich hatte eine Größe von 100 μm mal 100 μm . Das zugehörige lichtmikroskopische Bild der Probenstelle nach der Messung zeigt den Bereich in dem die Matrixschicht abgetragen worden ist und die teilweise freigelegten geplotteten Nanopartikelspots. Ein Vergleich zwischen den Verteilungsbildern der beiden Peptiden ($m/z = 1259,6$ u; $m/z = 1598,8$ u) und dem optischen Bild macht deutlich, dass die gemessenen Peptidsignale aus dem geplottetem Spot stammen, da auch auf den Verteilungsbildern die Struktur erkennbar ist. Das Bild des Matrixsignals hat eine Verteilung die der unterschiedlichen Kristallisation der Matrixschicht entspricht. Die zweite Probenstelle (Abbildung 63) zeigt ein ähnliches Verhalten für Peptide mit verschiedenen Addukten.

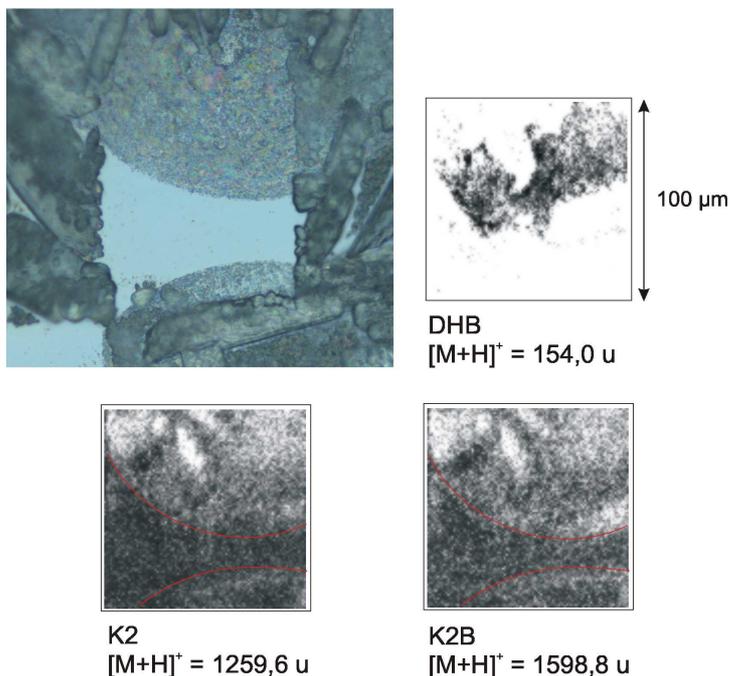


Abbildung 62: Erste Probenstelle, mikroskopisches Bild (links oben) und Ionenverteilungsbilder (1 μm Rasterweite) der strukturierten Oberfläche

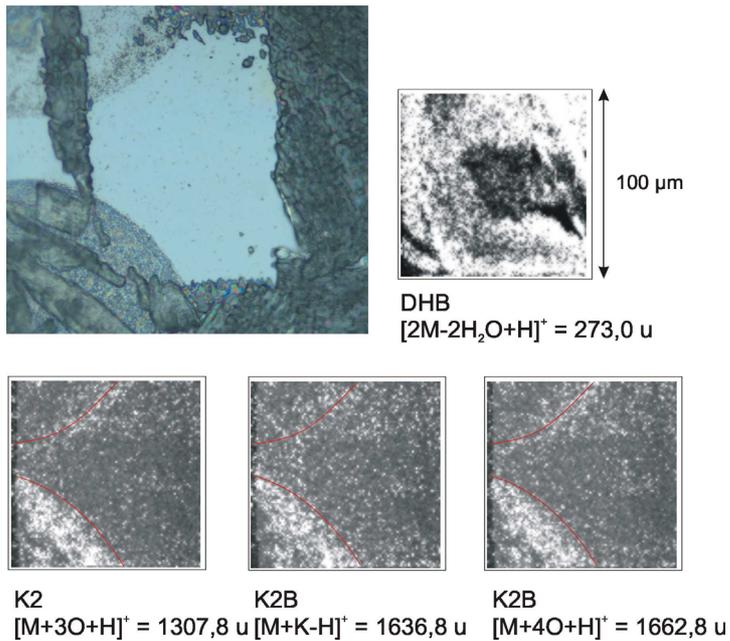


Abbildung 63: Zweite Probenstelle, mikroskopisches Bild (links oben) und Ionenverteilungsbilder (1 µm Rasterweite) der strukturierten Oberfläche

Die fünf Beispiele verdeutlichen, dass MALDI-Massenspektrometrie eine geeignete Methode ist, um diese neuen bioaktiven Oberflächen auf Siliziumbasis untersuchen zu können. Die Oberflächen können aufgrund ihrer Funktionalisierung selektiv Proteine bzw. Antikörper an die Oberfläche binden und so bestimmte Marker aus einem komplexen Gemisch isolieren. Die Sensitivität der MALDI-MS und auch der SMALDI-MS ist ausreichend um diese nachweisen zu können.

Es gilt nun diese Oberflächen im Mikromaßstab zu strukturieren, um darauf ein komplexes Muster aus spezifischen Fängermolekülen zu binden. Solche strukturierten Biochips sollen dann z. B. für die Diagnostik von Krankheiten eingesetzt werden (Abbildung 64). Dabei spielt die Entwicklung von Scanning Microprobe MALDI-MS eine wichtige Rolle, um derartige Biochips im Mikrometermaßstab auslesen zu können. Schnelle Screening-Methoden zum Auslesen solcher Biochips, sowie eine hochentwickelte Software zur Identifizierung, Darstellung und Aufarbeitung der Ergebnisse sind dabei eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz dieser funktionalisierten Oberflächen.

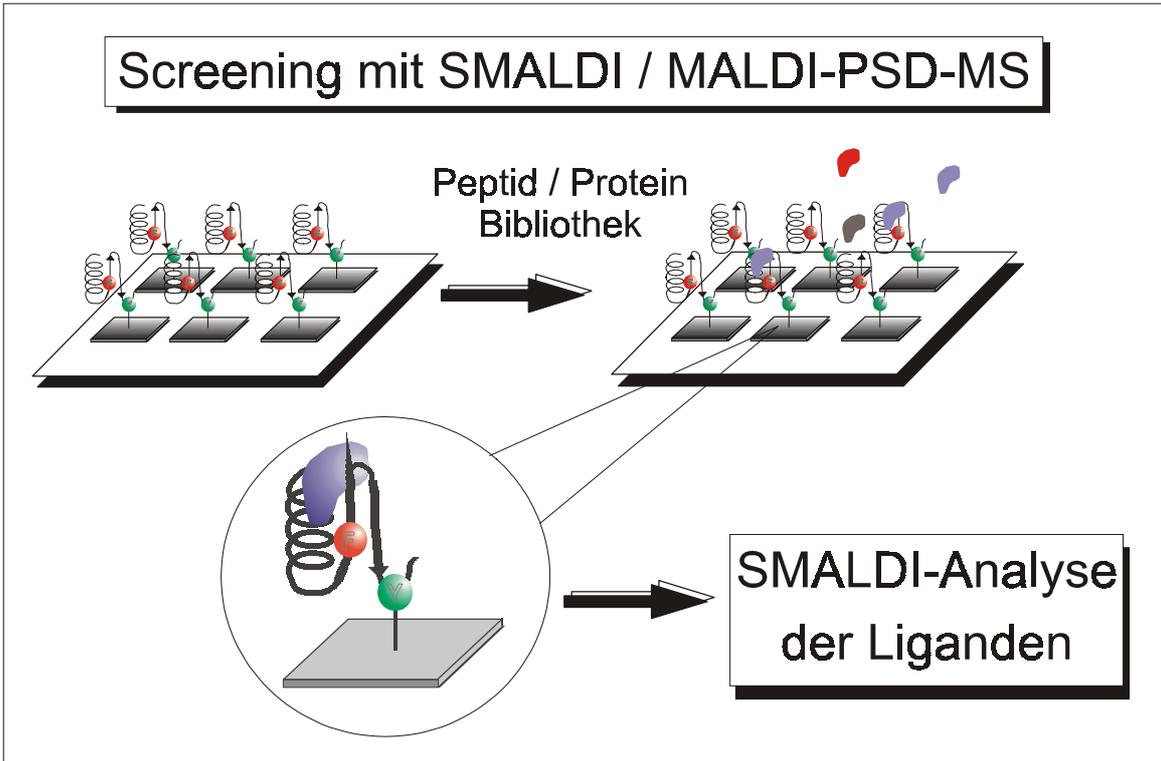


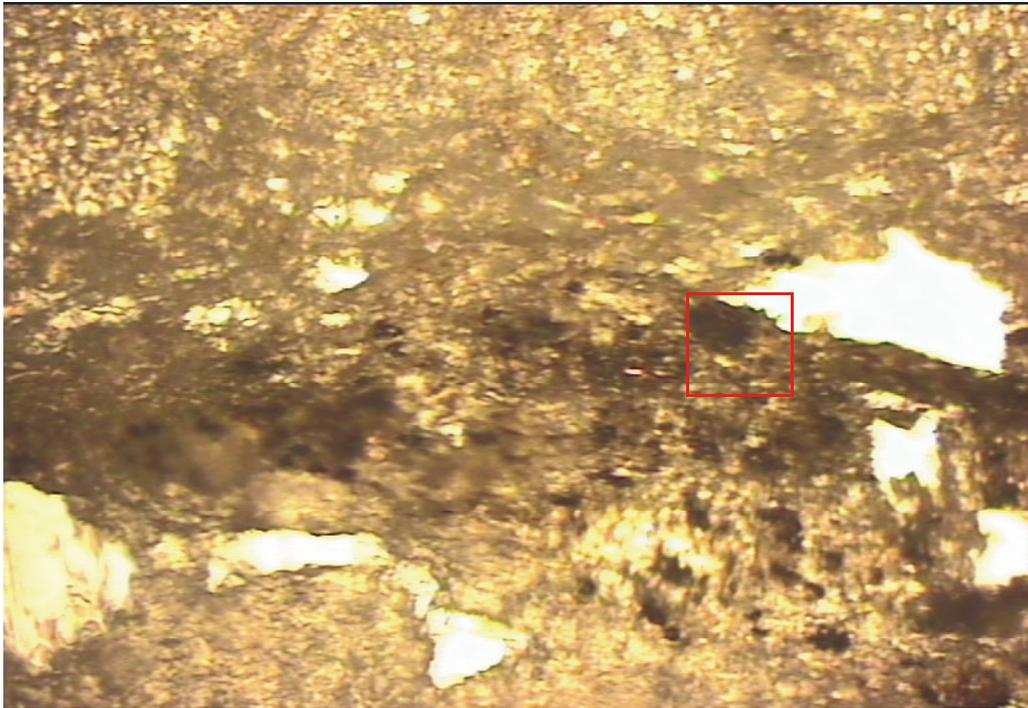
Abbildung 64: Biochip zur Krankheitsdiagnostik [154]

6.3 Gewebeschnitte mit LDI-MS

Die Elementanalytik an Gewebeschnitten mit Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie im Mikromaßstab stellt ebenfalls ein wichtiges Einsatzgebiet des "Lamma 2000"-Instruments dar. Wenn auch diese Methode bereits mit den Mikrosondengeräten "Lamma 500", "Lamma 1000" und "Lima 2a" betrieben wurde [76][77][78], so ist doch erst mit der hier beschriebenen Weiterentwicklung der Hardware und Software zur rasternden Massenspektrometrie die Aufnahme eines Probenbereichs mit bis zu 40000 Messpunkten in einem Abstand von 1µm möglich. Das Erstellen von Verteilungsbildern für Massen der in der Gewebeprobe vorhandenen Analyten stellt einen wesentlichen Fortschritt zu den Vorläufergeräten dar, mit denen lediglich ausgewählte Probenpunkte untersucht und verglichen werden konnten [81]. Gleichzeitig bildet diese Analytik die methodische Voraussetzung um SMALDI-MS an Gewebe oder Einzelzellen zu realisieren. Das folgende Beispiel [152][159] stellt die erweiterten Möglichkeiten vor, die diesem System zur Verfügung stehen.

Für die folgende Untersuchung wurde einem Patienten Mundschleimhaut entnommen, um die Frage zu klären ob es sich bei den schwarzen Einschlüssen um transferiertes Amalgam oder aber um krankhafte Melanome handelte. Die Gewebeprobe wurde in Paraffin eingegossen und anschließend Dünnschnitte angefertigt. Die Dünnschnitte der Gewebeprobe hatten eine Dicke von ca. 10 µm und wurden direkt auf den Probenträger gelegt. Der Probenträger bestand aus Aluminium und wurde vor der Untersuchung auf Silberrückstände untersucht, um eine Verwechslung von Probenträgermaterial und Amalgam auszuschließen. Ein optisches Bild der Gewebeprobe (Abbildung 65) zeigt verschiedene Teile des Dünnschnittes. Am Deutlichsten sind die schwarzen Einschlüsse im Gewebe zu sehen. Die Abgrenzung zwischen Gewebe und Einbettmaterial sind schwieriger zu erkennen. Da das Photo im Auflichtverfahren aufgenommen wurden ist, werden die Farben von den Reflexionen der Aluminiumoberfläche verfälscht. Das Paraffin im oberen und unteren Teil des Bildes ist gelb, während das Gewebe in der Mitte des Bildes ockerfarben erscheint. Teilweise weist der Schnitt Löcher auf, die weiß

überstrahlt werden. Von diesem Schnitt wurden LDI-Massenspektren ohne weitere Präparation aufgenommen.



Mundschleimhaut mit Amalgameinschluss auf Aluminiumträger (650 x 500 μm)

Abbildung 65: Dünnschnitt einer Mundschleimhautprobe

Zunächst wurden mit dem Massenspektrometer Lamma 2000 Summenspektren der einzelnen Komponenten der Probe aufgenommen, um eine Zuordnung der Massen zu diesen Komponenten durchzuführen. In diesen Spektren können drei verschiedene Klassen von Analyten festgelegt werden. Das Spektrum in Abbildung 66 stammt aus einer Probenstelle, in der alle drei Klassen vorhanden sind. In den Außenbereichen des Dünnschnittes werden die Massenspektren hauptsächlich von kleineren Kohlenwasserstoffen im Bereich von $m/z = 55$ u bis $m/z = 98$ u bestimmt, die dem Paraffin zuzuordnen sind. Größere Kohlenwasserstoffe ($m/z = 431$ u bis 655 u) liegen im Bereich der Mundschleimhautprobe vor. Silber und Silbercluster lassen sich von den schwarzen Einschlüssen beobachten und können dem Amalgam zugeordnet werden. Die Zusammensetzung des Amalgams im Bereich der Zahnfüllungen schwankt je nach Hersteller des Füllmaterials, so dass hier nur ungefähre Werte angegeben werden können. Bei einer

konservativen Amalgamfüllung besteht das Füllmaterial aus ca. 54 % Quecksilber, 19 % Silber, 14 % Zinn, 12 % Kupfer und weiteren Metallen wie Zink, Cadmium und Nickel in geringen Mengen. Von den Hauptbestandteilen des Amalgams kann bei der verwendeten Laserwellenlänge von 337 nm nur Silber mit ausreichender Empfindlichkeit zum Nachweis desorbiert und ionisiert werden.

Mundschleimhaut mit Amalgameinschluss

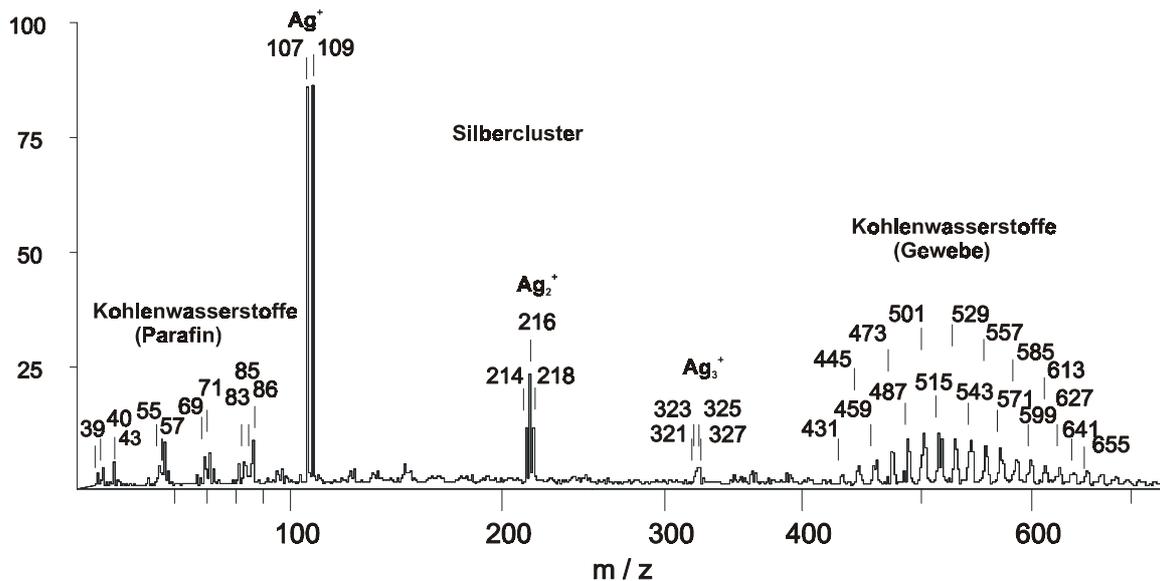


Abbildung 66: LDI-Massenspektrum der Mundschleimhautprobe

Um Verteilungsbilder der drei Gruppen von Analyten zu bekommen, wurde jeweils ein Marker für die Gruppen ausgewählt und Ionenverteilungsbilder an der rot markierten Probenstelle aufgenommen (Abbildung 65). Die Marker waren jeweils charakteristisch für Paraffin $m/z = 69$ u, Amalgam $m/z = 107$ u und Gewebe $m/z = 515$ u. Die Probe wurde mit einer Schrittweite von $1\ \mu\text{m}$ abgerastert. Die Graustufenbilder der drei Marker zeigen eine unterschiedliche Verteilung der drei Bestandteile innerhalb des Bildausschnittes von $100\ \mu\text{m}$ mal $100\ \mu\text{m}$ (Abbildung 67, obere Reihe).

Bei Kombinationen der drei Graustufenbilder zu einem Farbbild mit den Farbkanalzuordnungen Paraffin = grün, Amalgam = blau, Gewebe = rot zeigt sich nach der ersten Messung ein ausgeprägter grüner Bereich des Paraffins in der Mitte des Bildes. In der oberen linken Ecke ist ein Einschluss mit Amalgam (blau) zu sehen. Weitere Messungen des gleichen Probenbereichs verdeutlichen den vor-

handenen Schichtaufbau der Probe. Der Anteil an Paraffin nimmt im Laufe der Messungen ab, was durch eine Paraffinschicht auf der Gewebeprobe zu erklären ist, die durch den Dünnschnitt auf die Gewebeprobe aufgebracht wurde. Gleichzeitig ist unterhalb des Amalgameinschlusses Gewebe zu beobachten, wie die dritte Messung deutlich zeigt. Durch mehrmalige Abrasterung der Probe kann neben der Zusammensetzung der Probenbestandteile auch eine Struktur der Probe erfasst werden. Diese Möglichkeiten zur schnellen Erfassung von Strukturen und Markern bildet eine der Voraussetzung für die im Kapitel 6.4 erläuterte Analytik von Zellen mit SMALDI-MS.

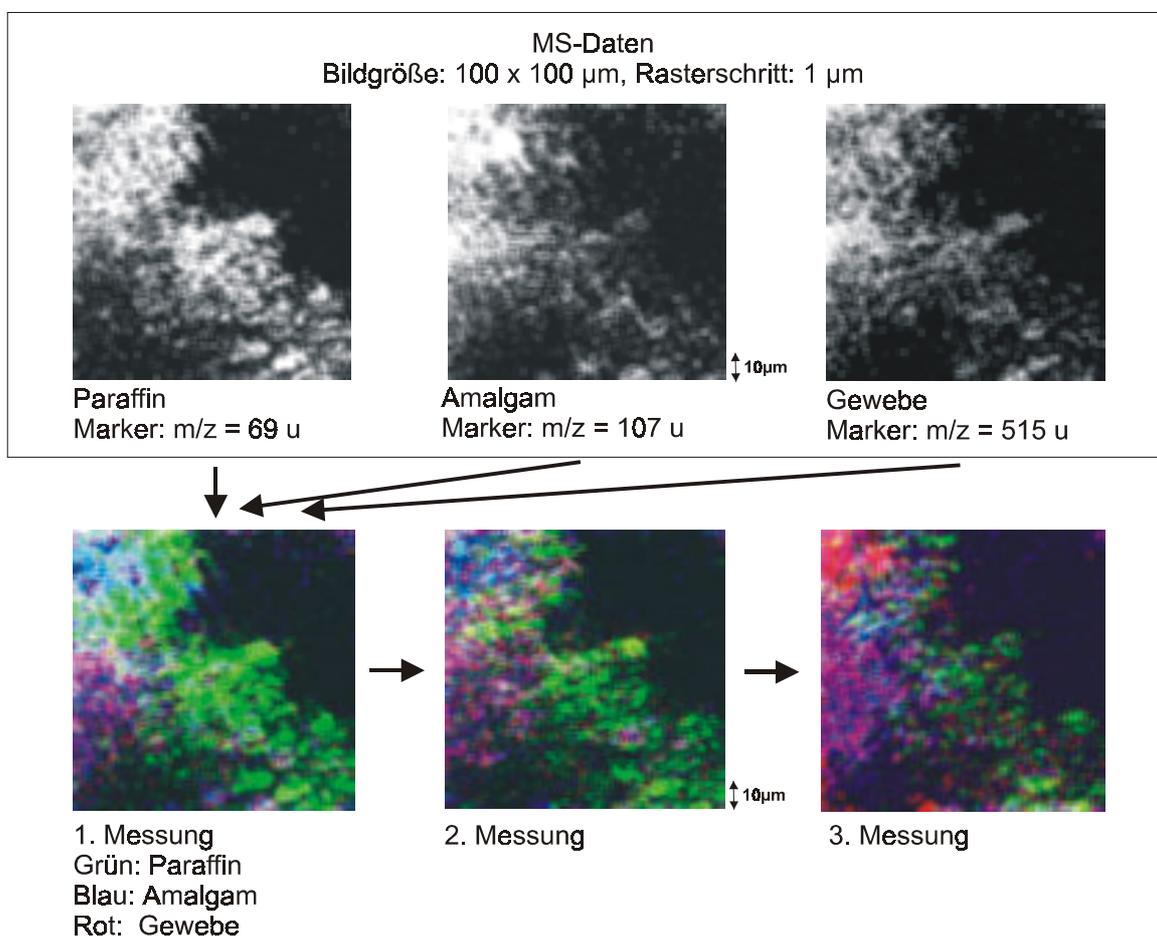
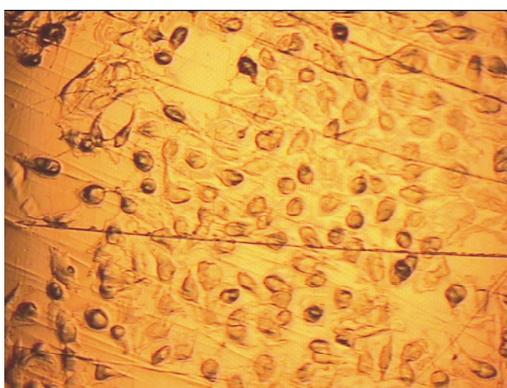


Abbildung 67: Verteilungsbilder der Mundschleimhautgewebeprobe

6.4 Einzel-Zell-Analytik

In diesem Kapitel werden die methodischen Protokolle und die ersten Ergebnisse der SMALDI-Massenspektrometrie an Einzelzellen beschrieben [152][159]. Um ein einfach zu handhabendes biologisches Objekt in einer Größenordnung des zugänglichen Bereichs des Massenspektrometers zu bekommen, wurden Nierenkarzinomzellen gewählt, die in Zellkulturen gehalten werden. Die ausgewählte Zelllinie A-498 [160] stellte die Universität Tübingen, Zentrum für medizinische Forschung zur Verfügung. Die Zellen haben einen Durchmesser von etwa 20 μm und sind damit bei einer minimalen Rasterweite von 1 μm gut geeignet, um mit SMALDI-MS am Massenspektrometer "Lamma 2000" abgerastert zu werden.



Nierenkarzinomzellen
auf Goldträger
(650 x 500 μm)



Nierenkarzinomzellen
mit Matrix (DHB)
(320 x 250 μm)

Abbildung 68: Lichtmikroskopisches Bild der Präparation von renalen Tumorzellen auf einem goldbeschichteten Probenträger.

Die Zellen, die auf einem Kulturmedium gehalten werden, wurden mit Trypsin enzymatisch gelöst und in Suspension gebracht. Um einen weiteren Verdau der Zellen zu verhindern wurde die Kulturflüssigkeit ausgetauscht. Etwa 20 μl der Zellsuspension (ca. 1000 Zellen) wurden auf einen goldbeschichteten Probenträger aufgetropft. Anschließend wurde der Probenträger vier Stunden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 Atmosphäre in den Brutschrank gestellt. Innerhalb dieser Zeit wuchsen die Zellen auf der Oberfläche des Probenhalters auf. Nachdem der Probenteller aus dem Brutschrank genommen wurde, wurden mehrere Waschschriffe mit Phosphatpuffer (pH 7,4) durchgeführt, um die nicht aufgewachsenen Zellen sowie

Nährmedien und Detergenzien zu entfernen. Danach erfolgte eine Fixierung der Zellen auf dem Probenträger durch die Zugabe von 100 µl 100 % Aceton. Abbildung 68 (linkes Photo) stellt die Zellen nach der Fixierung auf dem Probenträger dar. Die klare Abgrenzung zwischen Zelle und Probenträger sowie die runde, etwas abgeflachte Form der Zellen zeigen, dass bei den meisten Zellen die Zellwände noch intakt und die Zellen vor der Fixierung auf der Oberfläche aufgewachsen waren. Im letzten Schritt zur Präparation für SMALDI-MS wurde die Matrix (DHB in 100 % Aceton) auf die Zellen gesprüht. Für die Präparation wurde die Matrixlösung mit Hilfe eines Pumpzerstäubers mehrmals über die Zellen versprüht. Dabei war darauf zu achten, dass die Oberfläche des Probenträgers nicht mit zuviel Lösung benetzt wurde, um ein Verschwimmen der zu untersuchenden Analyten auf ein Minimum zu reduzieren. Nach dem Aufsprühen von Matrixlösung ergab sich eine hinreichend homogene Oberfläche (Abbildung 68, rechtes Photo), die rasternd mit Abständen von 1 µm massenspektrometrisch untersucht wurde.

Zunächst wurden mit dem Massenspektrometer "Aladim II" einige Summenspektren aus 50 – 100 Einzelspektren aufgenommen, um eine Charakterisierung der biologischen Objekte durchzuführen. Die Messungen wurden unter erhöhter Beschleunigungsspannung sowohl im linearen Betrieb als auch im Reflektorbetrieb vorgenommen. Die sich daraus ergebenden Massenspektren zeigten eine komplexe Verteilung von Massensignalen (Abbildung 69). Es wurden intensive Signale im Bereich bis $m/z = 700$ u gemessen. Einige Komponenten konnten bis zur Masse 16000 u detektiert werden. Das im oberen Massenbereich besonders hervortretende Signal bei Masse 4933 u wurde genauer untersucht. Die dazu notwendige Aufarbeitung von weiterem Zellmaterial wurde in der Universität Tübingen im Zentrum für medizinische Forschung vorgenommen. Dazu wurde Peptidmaterial von den untersuchten Zelloberflächen gesammelt, indem eine größere Anzahl von Zellen mit saurem Medium behandelt und so die auf der Zelloberfläche befindlichen Proteine und Peptide abgelöst wurden. Dieser Säurestrip wurde dann auf klassische Weise aufgereinigt und chromatographisch aufgetrennt.

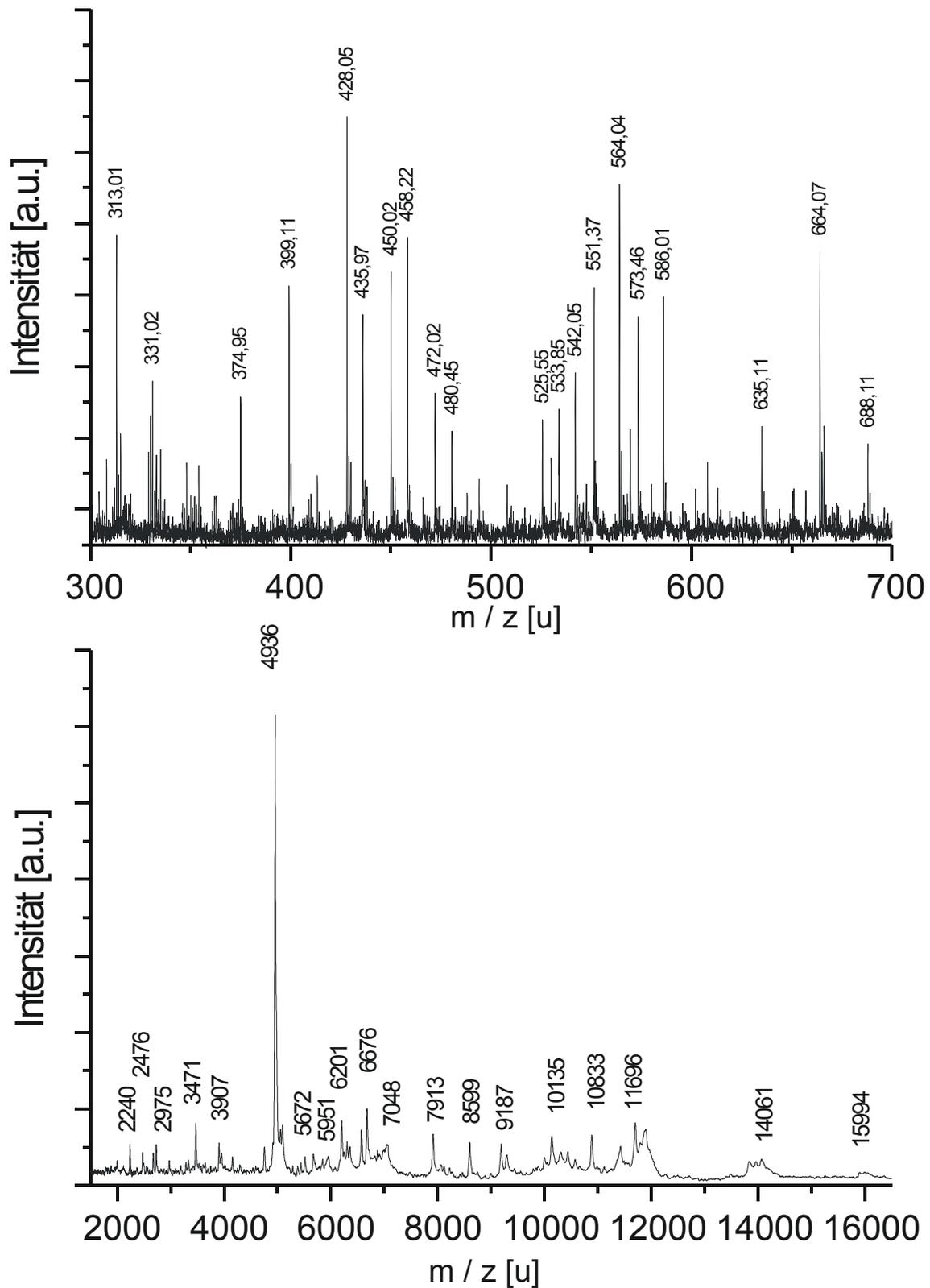


Abbildung 69: MALDI-MS von Nierenkarzinomzellen, Summe aus 94 Einzelspektren, Massenspektrometer "Aladim II"

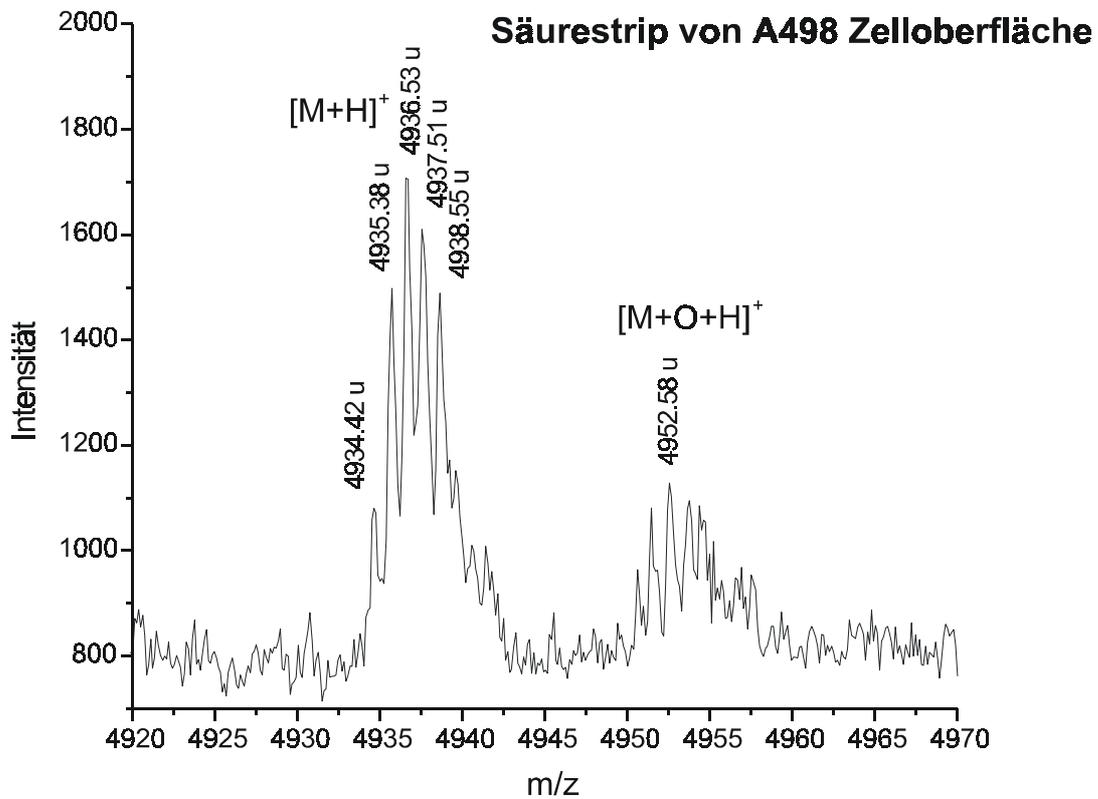
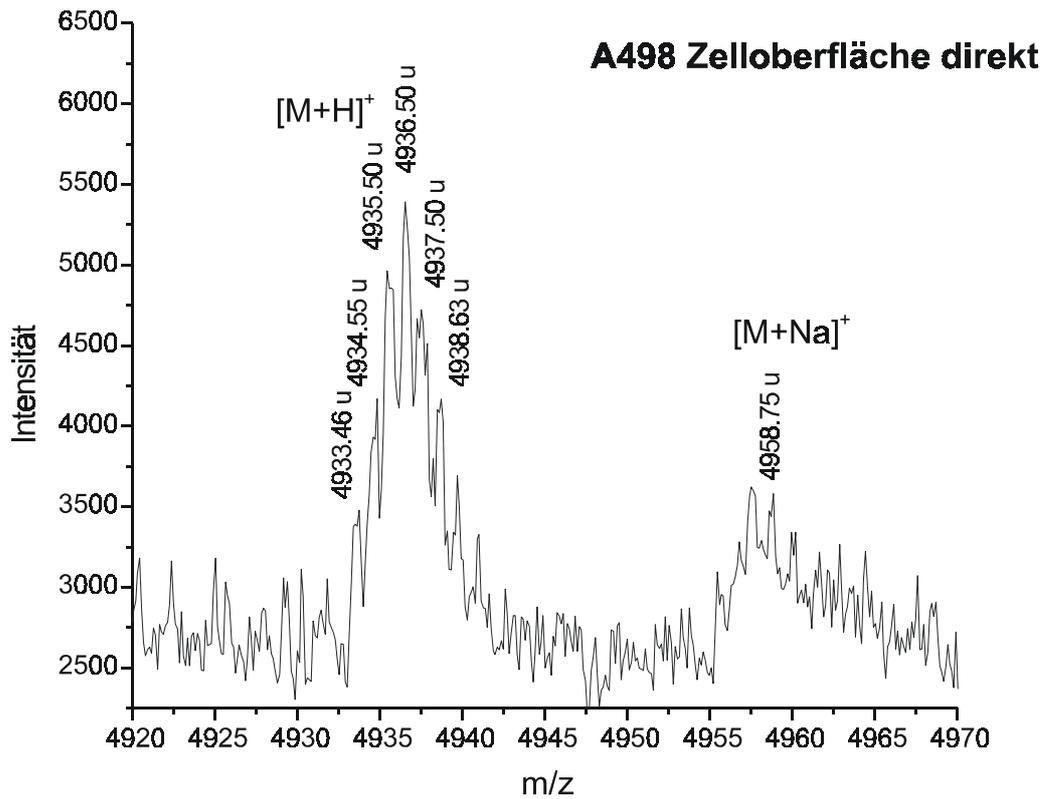


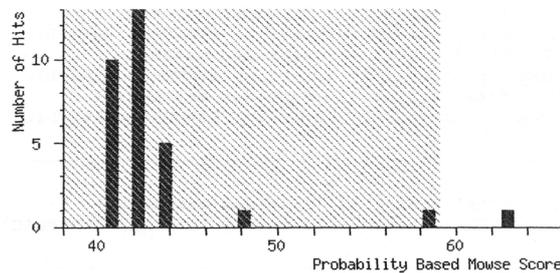
Abbildung 70: Vergleich zwischen Zelloberfläche und Zellextrakt, Massenspektrometer "Aladim II"

{MATRIX}
{SCIENCE} **Mascot Search Results**

User : dieter.kirsch
 Email : dieter.kirsch@anorg.chemie.uni-giessen.de
 Search title : Werner 14_7
 Database : SwissProt 41.4x (186207 sequences; 93837565 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (46297 sequences)
 Timestamp : 30 Apr 2003 at 10:06:29 GMT
 Top Score : 63 for Q13360, Zinc finger protein 177

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 59 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

[Switch to full Protein Summary Report](#)

To create a bookmark for this report, right click this link: [Concise Summary Report \(Werner 14_7\)](#)

- | | | | | |
|-------|---|---------------------|------------------------|----------------------------|
| 1. | Q13360 Zinc finger protein 177 | Mass: 36449 | Total score: 63 | Peptides matched: 4 |
| <hr/> | | | | |
| 2. | P24437 Protein U58 | Mass: 88689 | Total score: 58 | Peptides matched: 4 |
| <hr/> | | | | |
| 3. | Q96JL9 Zinc finger protein 333 | Mass: 75496 | Total score: 49 | Peptides matched: 3 |
| <hr/> | | | | |
| 4. | Q8TDX9 Polycystic kidney disease 1-like 1 protein (Polycystin 1L1) | Mass: 315233 | Total score: 44 | Peptides matched: 3 |
| <hr/> | | | | |
| 5. | P30519-00-00-01 Heme oxygenase 2 (EC 1.14.99.3) (HO-2) STANDARD VARSPLIC; STANDARD VARIANT; REF. | Mass: 36014 | Total score: 43 | Peptides matched: 3 |
| | P30519-00-00-02 Heme oxygenase 2 (EC 1.14.99.3) (HO-2) STANDARD VARSPLIC; STANDARD VARIANT; REF. | Mass: 35678 | Total score: 43 | Peptides matched: 3 |

Abbildung 71: Datenbanksuche der tryptischen Spaltpeptide [161]

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: **Q13360**; Score: 63
Zinc finger protein 177

Nominal mass (M_r): 36449; Calculated pI value: 8.70
NCBI BLAST search of **Q13360** against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Homo sapiens

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 29
Number of mass values matched: 4
Sequence Coverage: 13%

Matched peptides shown in Bold Red

1 MAAGWLTTWS QNSVTFQEVA VDFSQEEWAL LDPAQKNLYK DVMLNFRNL
51 ASVGYQLCRH SLISKVDQEQ LKTDERGILQ GDCADWETQL KPKDTIAMQN
101 IPGGKTSNGI NMNCVRTHSG EMPYECSDCG KAFIFQSSLK KHMRSHTGEEK
151 PYECDHCGKS FSQSSHLNVH **KRTHTGKPY DCKECGKAPT VPSSLQKHVR**
201 **THTGKPYEC SDCGKAFIDQ** SSLKKHTRSH TGEKPYECNQ CGKSFSTGSY
251 LIVHKRTHTG EKTYECKECG KAFRNSSCLR VHVRTHTGEEK PYKCFQCEKA
301 FSTSTNLIMH KRIHNGQKLH E

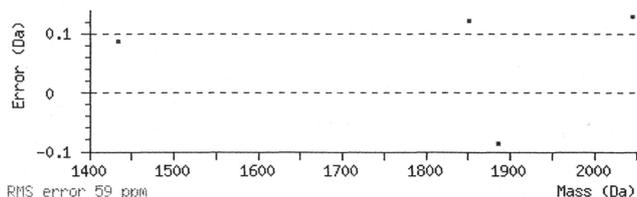
Show predicted peptides also

Sort Peptides By

Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

| Start - End | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss | Sequence |
|-------------|----------|----------|----------|-------|------|-------------------|
| 172 - 183 | 1434.77 | 1433.76 | 1433.67 | 0.09 | 1 | RTHTGKPYDCK |
| 172 - 187 | 1851.97 | 1850.96 | 1850.84 | 0.12 | 2 | RTHTGKPYDCKECGK |
| 184 - 200 | 1886.90 | 1885.90 | 1885.98 | -0.09 | 2 | ECGKAPTVPSSLQKHVR |
| 198 - 215 | 2047.04 | 2046.03 | 2045.90 | 0.13 | 1 | HVRTHTGKPYECSDCGK |

No match to: 822.39, 968.50, 1036.51, 1082.59, 1144.49, 1187.54, 1203.62, 1307.68, 13



SWISS-PROT is copyright. It is produced through a collaboration between the Swiss Institute of Bioinformatics and the EMBL Outstation - the European Bioinformatics Institute. There are no restrictions on its use by non-profit institutions as long as its content is in no way modified. Usage by and for commercial entities requires a license agreement. For information about the licensing scheme see: <http://www.isb-sib.ch/announce/> or send an email to license@isb-sib.ch.

Full entry text for [Q13360](#)

Abbildung 72: Beste Übereinstimmung aus Datenbanksuche (Zink-Fingerprotein, Q13360) [161]

Die Fraktionen der zu untersuchenden Peptide wurden tryptisch verdaut und anschließend MALDI-massenspektrometrisch mit "Aladim II" identifiziert. Um sicherzustellen, dass der Säurestrip die direkt von den Zelloberflächen nachgewiesene Komponente enthielt, wurden die Messungen des Säurestrips mit denen der Zelloberfläche verglichen (Abbildung 70). Eine Datenbanksuche der tryptischen Spaltpeptide des Peptids bei $m/z = 4933$ u, das für die Verteilungsbilder in Abbildung 73 verwendet wurde, ergab ein identifizierbares Spaltpeptidmuster [161]. Das hieraus abgeleitete Ursprungsprotein ist ein Fragment des Zink-Fingerproteins (Q13360) (theoretische monoisotopische Masse 4933.3 u). Eine endgültige Identifizierung muss noch durch die Sequenzierung eines der tryptischen Spaltpeptide erfolgen.

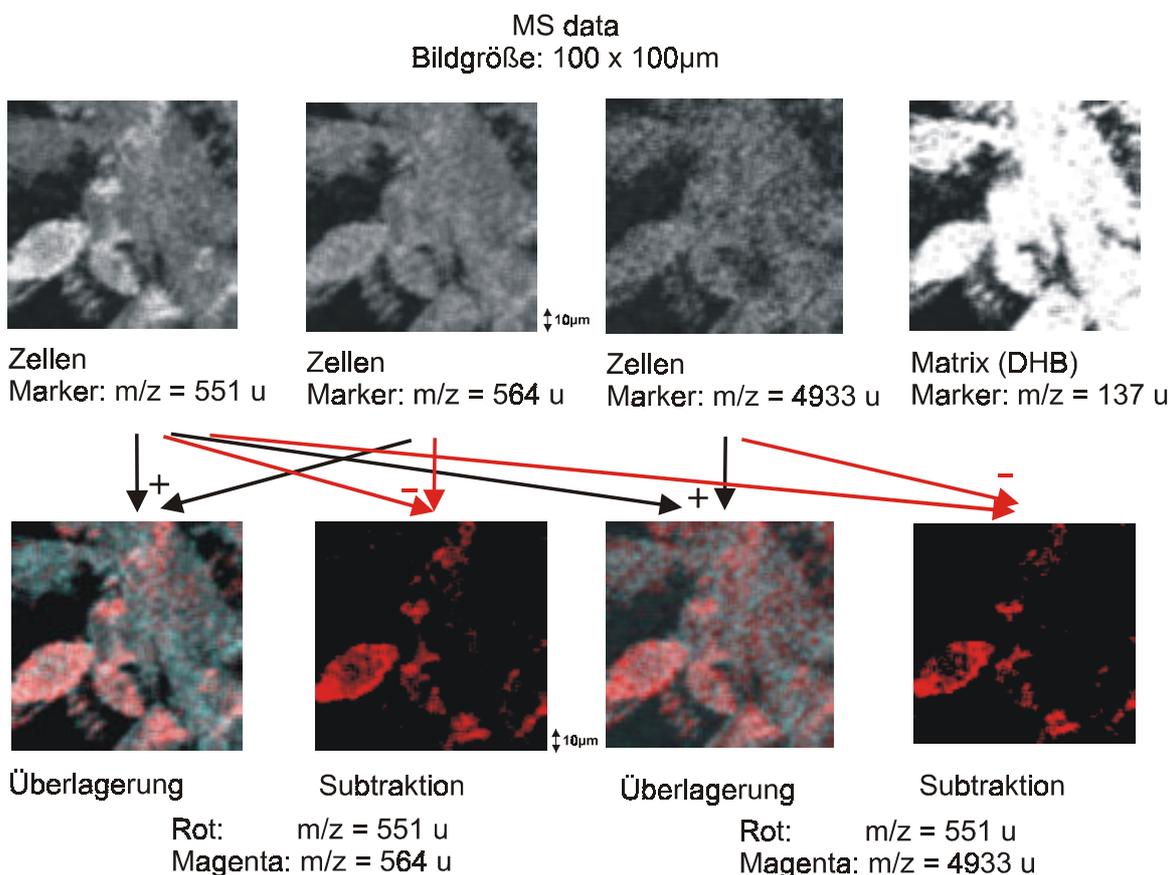
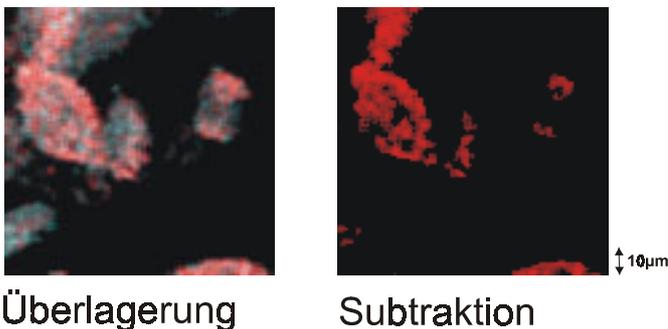


Abbildung 73: Ionenverteilungsbilder von Einzelzellen

Die Verteilungsbilder, die insbesondere auch für das Zink-Fingerprotein erstellt wurden, machen eine unterschiedliche Verteilung der vermessenen Komponenten deutlich. Dabei wurden die vier Massen $m/z = 137$ u (DHB), $m/z = 551$ u, $m/z =$

564 u und $m/z = 4933$ u (Zink-Fingerprotein) zur Erstellung eines Bildes ausgewählt. Die Zellenumrisse werden im Graustufenbild sichtbar. In den unteren beiden Verteilungsbildern werden zwei Substanzen durch farbliche Kodierung in einem Bild überlagert, bzw. eine subtraktive Darstellung der zwei Komponenten gewählt. Deutlich wird auf diesen Falschfarbenbildern eine sichelförmige Zelle abgebildet. Die anderen Substanzen sind durch die Präparation mehr oder weniger gleichmäßig über den mit Matrix bedeckten Bereich verteilt.

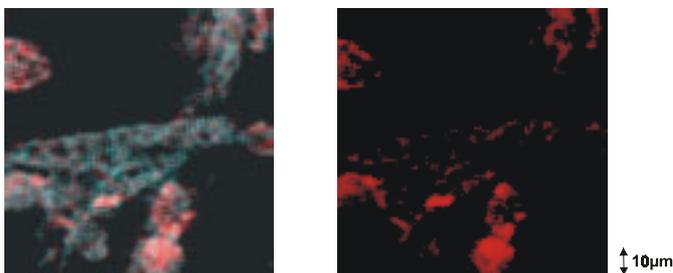
2. Probenstelle



Überlagerung

Subtraktion

3. Probenstelle



Überlagerung

Subtraktion

Rot: $m/z = 551$ u

Türkis: $m/z = 564$ u

Abbildung 74: Verschiedene Verteilungen auf Zellen und Matrixkristallen

Die Untersuchung weiterer Probenstellen zeigte die prinzipielle Einsetzbarkeit der SMALDI-Massenspektrometrie, aber auch derzeitige Limitierungen (Abbildung 74). So konnten von der dritten Probenstelle (Abbildung 74, unten) neben den Zellen zwei große Matrixkristalle beobachtet werden. Der Einsatz der Pumpzerstäuber-methode führte zu teilweise größeren Matrixkristallen auf der Probenoberfläche, sowie teilweise unbedeckten Probenbereichen. Dies weist auf die Notwendigkeit hin, die Präparationstechniken weiter zu verbessern und auch bei der SMALDI-

Analytik von biologischen Zellen Bedampfungsmethoden einzusetzen. Allerdings stellt die Komplexität biologischer Proben und deren großer Gehalt an Natrium und Kalium deutlich höhere Anforderungen an die Präparationsprotokolle. Die in dieser Arbeit beschriebenen Anwendungen der SMALDI-Massenspektrometrie verdeutlichen die Entwicklungsmöglichkeiten und Potentiale dieser Methode für die hochauflösende und hochempfindliche, mikroskopische Analytik und massenspektrometrische Abbildung biologischer Oberflächen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden neuartige Datenanalyse-Verfahren und neue Methoden zur rasternden Mikrosonden-MALDI-Massenspektrometrie vorgestellt.

Ein Bereich betrifft die Erweiterung der SMALDI-Massenspektrometrie im Sinne einer gleichzeitigen Erfassung der dreidimensionalen Topologie einer Probe. Die Datenerfassung und Aufarbeitung spielen dabei eine entscheidende Rolle für die Nutzbarmachung dieser Informationen. Die Fülle von Daten, die aufgrund der hohen lateralen Auflösung des Geräts „Lamma 2000“ zu verarbeiten ist, um einen relevanten Bereich von z.B. einer Zelle zu erfassen, machte eine Automatisierung der Erstellung von Bildern der lateralen Substanzverteilungen notwendig. Die automatische Signalanalyse der bis zu 160000 Massenspektren einer Messung stellt einen wichtigen Schritt dar, ohne den eine Erstellung von Verteilungsbildern der Probe in einem vernünftigen Zeitrahmen nicht möglich wäre. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Programm ist in der Lage, automatisch zu jedem relevanten Signal ein zugehöriges Verteilungsbild der gemessenen Probe zu erstellen und somit auch einen Vergleich zwischen verschiedenen Substanzverteilungen zu ermöglichen. Weiterhin wurde gezeigt, dass aus den gemessenen Flugzeiten einer Masse die Topologie der Probe berechnet werden kann und somit, zusätzlich zu der chemischen Zusammensetzung der Probe, auch die dreidimensionale Struktur dieser Probe bestimmt werden kann. Es gilt nun, dieses Verfahren der Datenverarbeitung in ein Gesamtkonzept zur Messung, Aufarbeitung, Darstellung und Interpretation orts aufgelöster Massenspektren zu integrieren und die noch existierenden programmtechnischen Begrenzungen zu beseitigen.

Entscheidend für die Einsetzbarkeit der orts aufgelösten Massenspektrometrie sind allerdings nicht nur die technischen Voraussetzungen und ein schnelles Verarbeitungssystem, sondern vor allem das Erreichen einer effektiven analytischen Auflösung im Maßstab von 1 – 2 μm . Die Untersuchung der MALDI-Präparationsmethoden stellt daher einen weiteren wichtigen Bereich dieser Arbeit dar. Die migrationsarme Präparation einer synthetischen oder biologischen Probe ist eine wichtige Voraussetzung, um relevante, unverfälschte Informationen von der Probe zu bekommen. Dazu wurden die bei kleinem Laserfokus veränderten Bedingun-

gen untersucht und gezeigt, dass MALDI-Massenspektrometrie auch in diesem Auflösungsbereich möglich ist. Untersuchungen zur Segregation von Analyten in Standardpräparationen zeigten die auftretende Problematik, die auch die Präparation von strukturierten Oberflächen betrifft. Da der zu bestimmende Analyt auf der Oberfläche nicht wandern sollte, steht die notwendige Flüssigphasen-Vermischung von Matrix und Analyt in Konkurrenz zur Migration der Analytmoleküle auf der Oberfläche. Die in dieser Arbeit vorgestellten neuen Präparationsmethoden zeigen den Weg auf, um einen Kompromiss zwischen diesen Gegensätzen zu finden und eine analytische Auflösung im Bereich von 1 μm zu erreichen. Techniken zum Versprühen der Matrix verdeutlichen, dass eine homogene Verteilung der Matrix unter Erhaltung der Empfindlichkeit möglich ist, aber lassen auch die oft schwierige Handhabung dieser Methoden erkennen. Ein vielversprechender Weg zur Präparation der Probe ist die Bedampfung und anschließende Inkorporation des Analyten in die Matrixschicht. Dieser vielversprechende Ansatz zeigt, dass hochauflösende SMALDI-Massenspektrometrie unter Erhalt der Ortsinformation durchführbar ist.

Da sich die MALDI-Massenspektrometrie zu einer Schlüsseltechnologie der Protein- und Proteomanalytik entwickelt hat, bietet die naheliegende Verschmelzung dieser Methode mit der Mikrosondentechnik eine Fülle von neuen Möglichkeiten des Einsatzes. So ist neben der direkten Analytik von Gewebe oder Zellen die Untersuchung von mikrostrukturierten Chipoberflächen eine wichtige Anwendung der SMALDI-MS um beispielsweise eine effiziente und schnelle Identifizierung von krankheitsrelevanten Substanzen durchführen zu können. Denkbar ist die marktfähige Entwicklung eines Diagnose-Chips, der ein rasches Screening von Patientenserien im Hinblick auf z.B. tumorspezifische Stoffe erlaubt. Die Weiterentwicklung des Gerätes, speziell die Entwicklung von SMALDI-Quellen für kommerziell erhältliche Massenspektrometer, eröffnet hier viele neue Möglichkeiten. Insbesondere die Kopplung der Quelle an ein Fourier-Transform-Ionen-cyclotron Massenspektrometer mit seiner extrem hohen Massenauflösung und Massenrichtigkeit zur schnellen Identifizierung von Peptiden und Proteinen stellt eine attraktive Anwendung für die Zukunft dar.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Stabilitätsdiagramm für einen zweidimensionalen Quadrupolmassenfilter [38]..... | 16 |
| Abbildung 2: Lineares Time-Of-Flight Massenspektrometer..... | 18 |
| Abbildung 3: Funktionsprinzip des Reflektors..... | 21 |
| Abbildung 4: Aufbau Massenspektrometer "Lamma 2000" [125]..... | 39 |
| Abbildung 5: Korrekturlinsen für ein zirkuläres Strahlprofil [125] | 41 |
| Abbildung 6: Fokusdurchmesser bei 262 nm [125]..... | 42 |
| Abbildung 7: Charakterisierung der analytischen Auflösung [125]..... | 44 |
| Abbildung 8: Charakterisierung des Laserabschwächers..... | 45 |
| Abbildung 9: Laserpulsenergie an der Position des Probenellers..... | 46 |
| Abbildung 10: Aufbau Massenspektrometer "Aladim II" | 50 |
| Abbildung 11: Raster-Elektronenmikroskop-Aufnahme des Laserfokus des Massenspektrometer "Aladim II", 1000 fache Vergrößerung | 50 |
| Abbildung 12: Anzahl der erfassten Signale in einem Massenbereich | 58 |
| Abbildung 13: Auswahl der Signale zu einem Verteilungsbild | 59 |
| Abbildung 14: Summation der Einzelspektren | 61 |
| Abbildung 15: Automatische Bildverarbeitung einer Messreihe..... | 61 |
| Abbildung 16: Zuordnung Bildpunkt - Massenspektrum | 62 |
| Abbildung 17: Aufbau der Quelle zur dreidimensionalen Massenspektrometrie..... | 63 |
| Abbildung 18: Erzeugung von Teilbildern einer Masse..... | 71 |
| Abbildung 19: Verteilungsbild mit Höhenprofil | 72 |
| Abbildung 20: Verteilungsbilder mit verschiedenen Erzeugungsmethoden | 73 |
| Abbildung 21: Höhenprofil durch Farbwertzuordnung | 75 |
| Abbildung 22: Intensitäts-, Höhenprofil und Kombination | 76 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 23: Dreidimensionale Darstellung der Probenmorphologie..... | 77 |
| Abbildung 24: Kalkulierte Abtragraten für mehrfachen Laserbeschuss | 78 |
| Abbildung 25: Strukturen und Namen der untersuchten Matrices | 80 |
| Abbildung 26: Verschiedene Verfahren zur Präparation von Oberflächen | 81 |
| Abbildung 27: Vergleich zwischen Rand und Mitte einer Dried-Droplet Präparation | 84 |
| Abbildung 28: Zucker, Peptid, Salz..... | 86 |
| Abbildung 29: Langsame MALDI Präparation..... | 87 |
| Abbildung 30: Schnelle MALDI Präparation..... | 89 |
| Abbildung 31: Rand einer Dried-droplet Präparation | 91 |
| Abbildung 32: Innere Kristalle einer Dried-droplet Präparation..... | 92 |
| Abbildung 33: Zucker, Peptid..... | 93 |
| Abbildung 34: Pumpzerstäuber | 94 |
| Abbildung 35: DHB-Kristalle gesprüht mit Pumpzerstäuber | 95 |
| Abbildung 36: Sinapinsäurekristalle gesprüht mit Pumpzerstäuber..... | 97 |
| Abbildung 37: CHCA-Kristalle gesprüht mit Pumpzerstäuber..... | 97 |
| Abbildung 38: Zerstäuber mit Gasstrom | 99 |
| Abbildung 39: DHB-Kristalle: verschiedene Abstände des Zerstäubers (obere Reihe: 4 cm, untere Reihe: 2 cm) | 100 |
| Abbildung 40: Sinapinsäure- und CHCA-Kristalle mit Zerstäuber gesprüht..... | 100 |
| Abbildung 41: Bildung von DHB-Clustern bei verschiedenen Treibmitteln | 101 |
| Abbildung 42: Ionenverteilungsbilder der Grenze eines präparierten Peptidpunktes mit gesprühter DHB-Schicht (100 x 100 µm, 1 µm Schrittweite)..... | 103 |
| Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahme eines bedampften Probensträgers Goldträger mit Farbstoff eines Filzstiftes (oberer Bildteil) und Bedampfung DHB (linker Bildteil)..... | 106 |
| Abbildung 44: Massenspektren von thermisch sublimierter und re-kondensierter | |

| | |
|---|-----|
| Matrix (2,5-DHB) bei 130 °C und 48 °C | 108 |
| Abbildung 45: MALDI - Massenspektren einer Peptid-Mischung nach Bedampfung mit thermisch sublimierter und re-kondensierter Matrix (2,5-DHB) bei hoher und mittlerer Laserintensität | 109 |
| Abbildung 46: MALDI-Massenspektrum von angelöster Bedampfung..... | 110 |
| Abbildung 47: Inkubation von DHB-Schicht mit Wasser | 113 |
| Abbildung 48: Inkubation von Sinapinsäure- und CHCA-Schicht mit Wasser | 114 |
| Abbildung 49: Filzstiftstrich vor und nach Präparation mit DHB..... | 115 |
| Abbildung 50: Veränderung des Randes des Peptidgemischtropfens..... | 116 |
| Abbildung 51: Ionenverteilungsbilder der Grenze eines präparierten Peptidgemischs (100 x 100 µm, 1 µm Schrittweite)..... | 117 |
| Abbildung 52: Unterschiedliche Verteilungen innerhalb einer DHB-Präparation | 120 |
| Abbildung 53: DHB-Kristall nach einer bzw. fünf Messungen [125]..... | 122 |
| Abbildung 54: SMALDI-MS Verteilungsbilder einer Mikropräparation mit Hilfe eines Tintenstrahldruckers [125] | 123 |
| Abbildung 55: Überlagerungsbilder zeigen Ausschluss von Natrium aus der Probe | 124 |
| Abbildung 56: Funktionalisierter Siliziumträger mit Peptid-Mischung | 125 |
| Abbildung 57: Funktionalisierte Oberfläche mit MIF | 126 |
| Abbildung 58: Funktionalisierte Oberfläche mit Ni ²⁺ /NTA-Komplex und RBD/RAS-Komplex..... | 128 |
| Abbildung 59: Strukturierte, mit Nanopartikeln beladene Oberfläche | 130 |
| Abbildung 60: SMALDI-Präparation einer geplotteten, mit Nanopartikeln strukturierten Oberfläche | 132 |
| Abbildung 61: Vergleich von Messungen auf strukturierter Oberfläche | |
| a) Peptidgemisch vor Auftragen auf die Oberfläche (20 Spektren gemittelt) | |
| b) Probenstelle neben geplotteten Nanopartikeln (30 Spektren gemittelt) | |

| | |
|---|-----|
| c) Probenstelle auf geplotteten Nanopartikeln (30 Spektren gemittelt)..... | 133 |
| Abbildung 62: Erste Probenstelle, mikroskopisches Bild (links oben) und Ionenverteilungsbilder (1 µm Rasterweite) der strukturierten Oberfläche..... | 134 |
| Abbildung 63: Zweite Probenstelle, mikroskopisches Bild (links oben) und Ionenverteilungsbilder (1 µm Rasterweite) der strukturierten Oberfläche..... | 135 |
| Abbildung 64: Biochip zur Krankheitsdiagnostik [154]..... | 136 |
| Abbildung 65: Dünnschnitt einer Mundschleimhautprobe..... | 138 |
| Abbildung 66: LDI-Massenspektrum der Mundschleimhautprobe | 139 |
| Abbildung 67: Verteilungsbilder der Mundschleimhautgewebeprobe | 140 |
| Abbildung 68: Lichtmikroskopisches Bild der Präparation von renalen Tumorzellen auf einem goldbeschichteten Probenträger. | 141 |
| Abbildung 69: MALDI-MS von Nierenkarzinomzellen, Summe aus 94 Einzelspektren, Massenspektrometer "Aladim II"..... | 143 |
| Abbildung 70: Vergleich zwischen Zelloberfläche und Zellextrakt, Massenspektrometer "Aladim II"..... | 144 |
| Abbildung 71: Datenbanksuche der tryptischen Spaltpeptide [161]..... | 145 |
| Abbildung 72: Beste Übereinstimmung aus Datenbanksuche (Zink-Fingerprotein, Q13360) [161]..... | 146 |
| Abbildung 73: Ionenverteilungsbilder von Einzelzellen..... | 147 |
| Abbildung 74: Verschiedene Verteilungen auf Zellen und Matrixkristallen | 148 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Überblick über Methoden der Mikrosondenanalytik [60] | 25 |
| Tabelle 2: Daten zur Abschätzung der Gesamtflugzeit..... | 69 |
| Tabelle 3: Verwendete Peptide und Oligosaccharide für Analytgemische..... | 82 |
| Tabelle 4: Peptidgemisch zur Beladung der strukturierten Oberflächen (Hergestellt am Institut für Biochemie, RWTH Aachen) | 131 |

Literaturverzeichnis

- [1] Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F.
Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 78 (1987) 53-68.
- [2] Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M.
Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.
Science; 246 (1989) 64-71.
- [3] Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.
Protein and polymer analysis of up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 2 (1988), 151-153.
- [4] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.
Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 5 (1991) 198-202.
- [5] Doroshenko, V.M. Cotter R.J.
High-performance collision-induced dissociation of peptide ions formed by matrix-assisted laser desorption/ionization in a quadrupole ion trap mass spectrometer.
Analytical Chemistry; 67 (1995) 2180-2187.
- [6] Hillenkamp, F.; Unsöld, E.; Kaufmann, R.; Nitsche, R.A.
Laser microprobe mass analysis of organic materials.
Nature; 256 (1975) 119-120.
- [7] Thomson, J.J.
Rays of positive electricity.
Philosophical Magazine; 6:20 (1911) 752-767.

- [8] Dempster, A.J.
A new method of positive ray analysis.
Physical Reviews; 11 (1918) 316-324.
- [9] Beynon J.H.
The use of the mass spectrometer for the identification of organic compounds.
Mikrochimica Acta; (1956) 437-453.
- [10] Munson, M.S.B.; Field, F.H.
Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction.
Journal of American Chemical Society; 88 (1966) 2621-2630.
- [11] Gomer, R.; Swanson, L.W.
Field desorption of carbon monoxide from tungsten.
Journal of Chemical Physics; 39 (1963) 2813-2836.
- [12] Beckey, H.D.
Field desorption mass spectrometry: A technique for study of thermally unstable substances of low volatility.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 2 (1969) 500-503.
- [13] Giessmann, U.; Röllgen, F. W.
Electrodynamic effects in field desorption mass spectrometry.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 38 (1981) 267-279.
- [14] Posthumus, M.A.; Kistenmaker, P.G.; Meuzelaar, H.L.C.; Ten Noever de Brauw, M. C.
Laser desorption mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules.
Analytical Chemistry; 50 (1978) 985-991.
- [15] Barber, M.; Bordoli, R.S.; Sedgwick, R.D.; Tyler, A.N.
Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry.
Nature; 293 (1981) 270-275.

- [16] Barber, M. Bordoli, R.S.; Elliot, G.J.; Sedgwick, R.D.; Tyler, A.N.
Fast atom bombardment mass spectrometry.
Analytical Chemistry; 54/4 (1982) 645A-657A.
- [17] Benninghoven, A.; Jaspers, D.; Sichtermann, W.K.
Secondary-ion emission of amino acids.
Applied Physics; 11 (1976) 35-39
- [18] Torgerson, D.; Skowronski, R.; Macfarlane, R.;
New approach to the mass spectroscopy of non-volatile compounds.
Biochemical and Biophysical Research Communications; 60/2 (1974) 616-621
- [19] Macfarlane, R.; Torgerson, D.
Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy.
Science; 191 (1976) 920-925
- [20] Karas, M.; Hillenkamp, F.
Laser desorption ionisation of proteins with molekular masses exceeding 10000 daltons.
Analytical Chemistry, 60 (1988) 2299-2301.
- [21] Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F.
2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionisation mass spectrometry.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 111 (1991) 89-102.
- [22] Beavis, R.C.; Chait, B.T.
Cinnamic acids derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 3/12 (1989) 432-435.

- [23] Beavis, R.C.; Chaudhary, T.; Chait, B.T.
Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry.
Organic Mass Spectrometry; 27 (1992) 156-158.
- [24] Overberg, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.
Matrix-assisted infrared-laser (2.49 μ m) desorption/ionisation mass spectrometry of large biomolecules.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 4 (1990), 293.
- [25] Nordhoff, E.; Ingendoh, A.; Cames, R.; Overberg, A.; Stahl, B.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Crain, P.F.
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in ultraviolet and infrared.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 6 (1992) 771-776.
- [26] Yamashita, M.; Fenn, J.B.
Another variation on the free-jet theme.
Journal of Physical Chemistry; 88:20 (1984) 4451-4459.
- [27] Yamashita, M.; Fenn, J.B.
Negative ion production with the electrospray ion source.
Journal of Physical Chemistry; 88:20 (1984) 4451-4459
- [28] Dole, M.; Mack, L.L.; Hines, R.L.; Mobley, R.C.; Ferguson, L.D.; Alice, M.B.
Molecular beams of macroions.
Journal of Chemical Physics; 49:5 (1968) 2240-2249.

[29] Horning, E.C.; Carroll, D.I.; Dzidic, I.; Haegele, K.D.; Horning, M.D. Stillwell, R.N.

Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream.

Journal of Chromatographic Science; 12 (1974) 725-729.

[30] Blakely, C.R.; Vestal; M.L.

Thermospray interface for liquid chromatography / mass spectrometry.

Analytical Chemistry; 55:4 (1983) 750-754.

[31] McCormack, A.L.; Schieltz, D. M.; Goode, B.; Yang, S.; Barnes, G.; Drubin, D.; Yates III, J. R.

Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level.

Analytical Chemistry 69 (1997) 767-776.

[32] Loo, J.A.; Udseth, H.R.; Smith, R.D.

Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry.

Analytical Biochemistry; 179 (1989) ID 1100 Lamma

[33] Aston F.W.

The mass-spectra of chemical elements.

Philosophical Magazine; 39 (1920) 611-625.

[34] Johnson E.G.; Nier A.O.

Angular aberrations in sector-shaped electromagnetic lenses for focusing beams of charged particles

Physical Reviews; 91 (1953) 10-17

- [35] Lawson, A.M. (Hrsg.)
Mass spectrometry.
De Gruyter Verlag; 1989.
- [36] Paul, W.; Steinwedel, H.
A new mass spectrometer without magnetic field.
Zeitung für Naturforschung; 8a (1953) 448-450
- [37] McLuckey, S. A. [Hrsg.]
Special issue quadrupole ion trap mass spectrometry: a collection of invited papers in honour of the scientific contributions of John F.J. Todd and Raymond e. March.
International Journal of Mass Spectrometry; 190/191 (1999).
- [38] Lottspeich, F.; Zorbas, H.
Bioanalytik.
Spektrum Akademischer Verlag; 1998.
- [39] Yost, R.A.; Enke, C.G.
Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer.
Journal of American Chemical Society; 100/7 (1978) 2274-2275.
- [40] Paul, W.; Osberghaus, O.; Fischer, E.
Forschungsberichte des Wirtschafts- und Verkehrsministeriums Nordrhein-Westfalen Nr. 4; 15 (1958) 458.
- [41] Fischer, E.
Die dreidimensionale Stabilisierung von Ladungsträgern in einem Vierpolfeld.
Zeitschrift für Physik; 156 (1959) 1-26.
- [42] Hipple J.A.; Sommer H.; Thomas H.A.
A precise method of determining the faraday by magnetic resonance.
Physical Reviews; 76 (1949) 1877-1878

- [43] Comisarow M.B.; Marshall A.G.
Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) spectroscopy.
Chemical Physics Letters, 1974, 25/2 (1974) 282-283
- [44] Stemmler, E.A.; Hettich, R. L.; Hurst, G. B.; Buchanan, M. V.
Matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform mass spectrometry of oligodeoxyribonucleotides.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 7 (1993) 828-836.
- [45] Henry K.D.; Williams E.R.; Wang B.H.; McLafferty F.W.; Shabanowitz J.; Hunt D.F.
Fourier-transform mass spectrometry of large molecules by electrospray ionization.
Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America; 86/23 (1989) 9075-9078.
- [46] Spengler, B.
Massenspektrometrische Primärstrukturanalytik von Biomolekülen.
Habilitationsschrift, Düsseldorf 1996.
- [47] Tang, X.; Beavis, R.; Ens, W.; Lafortune, F.; Schueler, B.; Standing, K.G.
A secondary ion time-of-flight mass spectrometer with an ion mirror.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 85 (1988) 43-67.
- [48] Della-Negra, S.; Le Beyec, Y.
New method for metastable ion studies with a time-of-flight mass spectrometer.
Future applications to molecular structure determinations.
Analytical Chemistry 57 (1985) 2035-2040.
- [49] Karataev, V.I.; Mamyrin, B.A.; Shmikk, D.V.;
New method for focusing ion bunches in time-of-flight mass spectrometers.
Translated from Zhurnal Tekhnicheskoi Fiziki; 41 (1971) 1177-1179

- [50] Mamyrin, B.A.; Karataev, V.I.; Shmikk, D.V.; Zagulin, V.A.;
A new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution.
Sov. Phys. JETP; 37 (1973) 45-48.
- [51] Boesl, U.; Weinkauf, R.; Schlag, E.W.
Reflectron time-of-flight mass spectrometry and laser excitation for the analysis of
neutral, ionized and secondary fragments.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 112 (1992) 121-
166.
- [52] Cornish, T.J.; Cotter, R. J.
A curved-field reflectron for improved energy focusing of product ions in time-of-
flight mass spectrometry.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 7 (1993), 1037-1040.
- [53] Cordero, M.M.; Cornish T.J.; Cotter R.J.
Sequencing peptides without scanning the reflectron: post-source decay with a
curved-field reflectron time-of-flight mass spectrometer.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 9 (1995) 1356-1361.
- [54] Wiley, W. C.; McLaren, I.H.
Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution.
Rev. Sci. Instrum. 26 (1955) 1150-1157.
- [55] Colby, S.M.; King, T.B.; Reilly, J.P.
Improving the resolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
mass spectrometry by exploiting the correlation between ion position and velocity.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 8 (1994) 865-868.
- [56] Brown, R.C.; Lennon J.J.
Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-
assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer.
Analytical Chemistry; 67 (1995) 1998-2003

[57] Kinsel, G.R.; Johnston, M.V.

Post source pulse focusing: a simple method to achieve improved resolution in a time-of-flight mass spectrometer.

International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 91 (1989) 157-176.

[58] Geno, P.W.; Macfarlane R.D.

Secondary electron emission induced by impact of low-velocity molecular ions on a microchannel plate.

International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 92 (1989) 195-210.

[59] Daly, N.R.

Scintillation type mass spectrometer ion detector.

Rev. Sci. Instr. 31 (1960) 264-267.

[60] Van Vaeck, L.; Gijbels, R.

Overview of laser microprobe mass spectrometry techniques.

In: Russell, P.E. [Hrsg]; Microbeam Analysis; 1989, xvii-xxv

[61] Flad, T.; Spengler, B.; Kalbacher, H.; Brossart, P.; Baier, D.; Kaufmann, R.; Bold, P.; Metzger, S.; Blüggel, M. Meyer, H.E.; Kurz, B.; Müller, C.A.

Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method.

Cancer Research; 58 (1998) 5803-5811.

[62] Porcellati, G.

In: Phospholipids in Nervous Systems. Horrocks, L.A. [Hrsg]

Raven Press, New York; 1 (1985)

- [63] Söderberg, M.; Edlund, C.; Alafuzoff, I.; Kristenson, K.; Dallner, G.J.
Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer type.
Journal of Neurochemistry; 59 (1992) 1646-1653.
- [64] Post, K.; Pitschke, M.; Schafer, O.; Wille, H.; Appel, T.R.; Kirsch, D.; Mehlhorn, I.; Serban, H.; Prusiner, S.B.; Riesner, D.
Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation.
Biological Chemistry; 379/11 (1998) 1307-1317.
- [65] Klein, T.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Riesner, D.
Prion Rods Contain Small Amounts of Two Host Spingolipids as Revealed by Thin-Layer Chromatography and Mass Spectrometry.
Biological Chemistry; 379 (1998) 655-666.
- [66] Tourmann, J.L.; Kaufmann, R.
Laser microprobe mass spectrometry (LAMMS) of coal mine dusts: Single particle analysis and toxicity correlation.
International Journal of Environmental Analytical Chemistry; 52 (1993) 215-227.
- [67] Morrison G.H.; Gay, I.; Chandra, S.
Ion microscopy in biology.
Scanning Microscopy, Supplement; 8 (1994) 359-370.
- [68] Pacholski, M.L.; Cannon, D.M. Jr; Ewing, A.G.; Winograd, N.
Static TOF-SIMS imaging of freeze-fractured, frozen-hydrated biological membranes.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 12 (1998) 1232.
- [69] McCandlish, C.A.; McMahon, J.M.; Todd P.J.
Secondary ion images of rodent brain.
Journal of the American Society of Mass Spectrometry; 11 (2000) 191-199.

- [70] Caprioli, R.M.; Farmer, T.B.; Gile, J.
Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS.
Analytical Chemistry; 69 (1997) 4751-4760.
- [71] Honig, R.E.; Woolston, J.R
Laser-induced emission of electrons, ions, and neutral atoms from solid surfaces.
Applied Physics Letters; 2 (1963) 138-139.
- [72] Posthumus, M.A.; Kistemaker, P.G.; Meuzelaar, H.L.C.
Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules
Analytical Chemistry; 50 (1978) 985-991
- [73] Hillenkamp, F.; Unsöld, E.; Kaufmann, R.; Nitsche, R.A.
High-sensitivity laser microprobe mass analyzer.
Applied Physics; 8 (1975) 341-348.
- [74] Conzemius, R.J.; Svec, H.J.
Scanning laser mass spectrometer milliprobe.
Analytical Chemistry; 50 (1978) 1855-1861
- [75] Janssen, J.A.J.; Witmer, A.W.
Quantitative inorganic analysis by Q-switched laser mass spectroscopy.
Spectrochimica Acta; 37B (1982) 483-491.
- [76] Dingle, T.; Griffiths, B.W., Ruckman, J.C.
LIMA-a laser induced ion mass analyser.
Vacuum; 31 (1981) 571-577
- [77] Vogt, H.; Heinen H.J.; Meier, S. Wechsung, R.
Lamma 500 principle and technical description of the instrument.
Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie; 308 (1981) 195-200

- [78] Heinen, H.J.; Meier, H.; Vogt, R.; Wechsung, R.
Lamma 1000, a new laser microprobe mass analyser for bulk samples.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 47 (1983) 19-22
- [79] Kaufmann, R.; Hillenkamp, F.; Wechsung, R.; Heinen, H.J.; Schürmann, M.
Laser microprobe mass analysis: achievement and aspects.
Scanning Electron Microscopy; II (1979) 279-290
- [80] Van Vaeck, L.; Claereboudt, J.; De Nollin, S.; Jacob, W.; Adams, F.; Gijbels, R.; Cautreels, W.
On the use of LAMMA for microprobing of organic compounds in biological samples.
In: Tood, J.F.J. [Hrsg]; Advances in Mass Spectrometry, Band 9b. 1249-1250.
- [81] Rechmann, P.; Tourmann, J.L.; Kaufmann, R.
Laser microprobe mass spectrometric (LAMMS) analysis of amalgam tattoos of the human oral mucosa.
Innov. Technol. Biol. Med.; 11/1 (1990) 51-60.
- [82] Mueller, J.F.; Pelletier, M.; Krier, G.; Weil, D.; Campana, J.
A New Generation of Microprobe: Laser Ionization and FT/ICR Mass Spectrometer.
In: Russell, P.E. [Hrsg]; Microbeam Analysis; 1989, 311-316.
- [83] Brenna, J.T.; Creasy W.R.; McBain, W.; Soria, C.
Nd:YAG laser microprobe system for Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.
Review of Scientific Instruments; 59 (1988) 873-879.
- [84] Ghaderi, S.
Application of laser microprobe using Fourier transform mass spectrometry.
In: Proceedings of the 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics; June 5-10, San Francisco, (1988) 1126-1127.

- [85] Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F.
Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules.
Analytical Chemistry; 57 (1985) 2935-2939.
- [86] Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R.C.; Chait, B.T.
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers.
Analytical Chemistry; 63 (1991) 1193A-1203A.
- [87] Chaurand, P.; Luetzenkirchen, F.; Spengler, B.
Peptide and protein identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry.
Journal of the American Society for Mass Spectrometry; 10 (1999) 91-103
- [88] Spengler, B.; Cotter R.J.
Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 1000,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis.
Analytical Chemistry; 62 (1990) 793-796.
- [89] Wu, K.J.; Steding, A.; Becker, C.H.
Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 7 (1993) 142-146.
- [90] Spengler, B.; Dolce, J.W.; Cotter, R.J.
Infrared laser desorption mass spectrometry of oligosaccharides: Fragmentation mechanisms and isomer analysis.
Analytical Chemistry; 62 (1990) 1731-1737.
- [91] Cordero, M.M.; Cornish, T.J.; Cotter, R.J.
Matrix-assisted laser desorption/ionization tandem reflectron time-of-flight mass spectrometry of fullerenes.
Journal of the American Society for Mass Spectrometry; 7 (1996) 590-597.

- [92] Xiang, F.; Beavis, R.C.
Growing protein-doped sinapic acid crystals for laser desorption: an alternative preparation method for difficult samples.
Organic Mass Spectrometry; 28 (1993) 1424-1429.
- [93] Allwood, D.A.; Dreyfus R.W.; Perera, I.K.; Dyer, P.E.
Plasma modelling of matrix assisted UV laser desorption ionisation (MALDI).
Applied Surface Science; 109/110 (1997) 154-157.
- [94] Vertes, A; Irinyi, G; Gijbels, R.
Hydrodynamic model of matrix-assisted laser desorption mass spectrometry.
Analytical Chemistry; 65 (1993), 2389-2393.
- [95] Beavis, R.C.; Chait, B.T
Velocity -distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix-assisted laser desorption.
Chemical Physics Letters; 181 (1991) 479-484.
- [96] Huth-Fehre, T.; Becker, C.H.
Energetics of gramicidin S after UV laser desorption from ferrulic acid matrix.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 5 (1991) 378-382.
- [97] Glückmann, M.; Karas, M.
The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization.
Journal of Mass Spectrometry; 34 (1999) 467-477.
- [98] Bökelmann, V.; Spengler, B.; Kaufmann, R.
Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionisation.
European Journal of Mass Spectrometry; 1 (1995) 81-93.

- [99] Luo, G.; Marginean, L.; Vertes, A.
Internal energy of ions generated by matrix-assisted laser desorption/ionization.
Analytical Chemistry; 74 (2002) 6185-6190.
- [100] Spengler, B.; Kirsch, D.
On the formation of initial ion velocities in matrix-assisted laser desorption
ionization: virtual desorption time as an additional parameter describing ion
ejection dynamics.
International Journal of Mass Spectrometry; 226 (2003) 71-83.
- [101] Zhou, J.; Ens, W.; Standing, K.G.
Kinetic energy measurement of molecular ion ejected into an electric field by
matrix-assisted laser desorption.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 6 (1992) 671-678.
- [102] Zenobi, R.; Knochenmuss, R.
Ion formation in MALDI mass spectrometry
Mass Spectrometry Reviews; 17 (1998), 337-366.
- [103] Karas, M.; Glückmann, M.; Schäfer, J.
Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular
ions are the lucky survivors.
Journal of Mass Spectrometry; 35 (2000) 1-12.
- [104] Karbacher, V.; Knochenmuss, R.
Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted
laser desorption/ionisation.
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 12 (1998) 968-974.
- [105] Fournier, I.; Marninach, J.; Tabet, C.; Bolbach, G.
Irradiation effects in MALDI, ablation, ion production and surface modifications.
Part II: 2,5-dihydroxybenzoic acid monocrystals.
Journal of the American Society for Mass Spectrometry; 14 (2003) 893-899.

- [106] Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F.
Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.
Organic Mass Spectrometry; 27 (1992) 472-480.
- [107] Brown, R.S.; Feng, J.; Reiber, D.C.
Further studies of in-source fragmentation of peptides in matrix-assisted laser desorption-ionization.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 169/170 (1997) 1-18.
- [108] Roepstorff, P.; Fohlman, J.
Proposal for a common nomenclature for sequence ions mass spectra of peptides.
Biomedical Mass spectrometry: 11 (1984) 601.
- [109] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.
Fundamental aspects of post-source decay in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry
Journal of Physical Chemistry; 96 (1992) 9678-9684.
- [110] Kaufmann, R.; Spengler, B.; Lützenkirchen, F.
Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix assisted laser desorption ionization (MALDI).
Rapid Communications in Mass Spectrometry; 7 (1993) 902-910.

[111] Spengler, B.; Lützenkirchen, F.; Metzger, S.; Chaurand, P.; Kaufmann, R.; Jeffery W.; Bartlet-Jones, M.; Pappin, D.J.C.

Peptide sequencing of charged derivates by postsource decay MALDI mass spectrometry.

International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 169/170 (1997) 127-140.

[112] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Lemoine, J.

Structure analysis of branched oligosaccharides using postsource decay in matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry.

Journal of Mass Spectrometry; 30 (1995) 782-787.

[113] Qin, J.; Chait B.T.

Matrix-assisted laser desorption ion trap mass spectrometry: efficient isolation and effective fragmentation of peptide ions.

Analytical Chemistry; 68 (1996) 2108-2112.

[114] Spengler, B.; Bahr, U.; Karas M.; Hillenkamp, F.

Excimer laser desorption mass spectrometry of biomolecules at 248 and 193 nm.

Journal of Physical Chemistry; 91 (1987) 6502-6506.

[115] Puretzky, A.A.; Geohegan, D.B.

Gas-Phase diagnostics and LIF imaging of 3-hydroxopicolinic acid MALDI matrix plumes.

Chemical Physics Letters; 286 (1998) 425-432.

[116] Kinsel, G.R.; Edmondson, R.D.; Russell, D.H.

Profile and flight time analysis of bovine insulin cluster as a probe of matrix-assisted laser desorption/ionization ionformation dynamics.

Journal of Mass Spectrometry; 32 (1997) 714-722

- [117] Jorgensen T.J.D.; Bojesen, G.; Rahbek Nielsen, H.
The proton affinities of seven matrix-assisted laser desorption/ionization matrices correlated with the formation of multiply charged ions.
European Mass Spectrometry; 4 (1998) 39-45.
- [118] Lehmann, E.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R.;
Ionisation mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry – contribution of preformed ions.
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 11 (1997) 1483-1492
- [119] Dubois, F.; Knochenmuss, R.; Steenvoorden, R.J.J.M.; Breuken, K.; Zenobi, R.
On the mechanism and control of salt-induced resolution loss in matrix-assisted laser desorption/ionisation.
European Mass Spectrometry; 2 (1996) 167-172.
- [120] Hanton, D.H.; Cornelio Clark, P.A.
Investigation of matrix-assisted laser desorption/ionisation sample preparation by time-of-flight secondary ion mass spectrometry
Journal of the American Society for Mass Spectrometry; 10 (1999) 104-111.
- [121] Dai, Y; Whittall, R.M.; Li, L.
Confocal fluorescence microscopic imaging for investigating the analyte distribution in MALDI matrices.
Analytical Chemistry; 68 (1996) 2494-2500.
- [122] Horneffer, V.; Dreisewerd, K; Ludemann, H. C.; Hillenkamp, F.; Lage, M.; Strupat, K.
Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid.
International Journal of Mass Spectrometry; 187 (1999) 859-870

- [123] Wei, J; Burlak, J; Siuzdak, G.
Desorption-ionisation mass spectrometry on porous silicon.
Nature; 399 (1999) 243-246.
- [124] Horneffer, V.; Forsmann, A.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Kubitscheck, U
Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser
scanning microscopy.
Analytical Chemistry; 73 (2001) 1016-1022.
- [125] Spengler B., Hubert, M.
Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass
spectrometry: instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface
analysis.
Journal of the American Society of Mass Spectrometry; 13 (2002) 735-748.
- [126] Van Vaeck, L.; Gijbels, R.
Laser microprobe mass spectrometry: potential and limitations for inorganic and
organic micro-analysis, part I. Technique and inorganic applications.
Fresenius Journal of Analytical Chemistry; 337 (1990) 743-754.
- [127] Van Vaeck, L.; Gijbels, R.
Laser microprobe mass spectrometry: potential and limitations for inorganic and
organic micro-analysis, part II. Organic applications.
Fresenius Journal of Analytical Chemistry; 337 (1990) 755-765.
- [128] Spengler, B.; Karas, M. Bahr, U.; Hillenkamp, F.
Laser mass analysis in biology.
Berichte der Deutschen Bunsengesellschaft für Physikalischen Chemie; 93 (1989)
396-402.
- [129] Seydel, U.; Heinen, H.J.
First result on fingerprints of single mycobacteria cells with LAMMA.
Recent Dev. Mass Spectrom. Biochem. Med.; 6 (1980) 489.

- [130] Böhm, R.; Kapr, T.; Schmitt, H.U; Albrecht, J.; Wieser, P.
Application of the laser microprobe mass analyser (LAMMA) to the differentiation of single bacterial cells.
Journal of Analytical and Applied Pyrolysis; 8 (1985) 449-461.
- [131] Todd, P.J.; Schaaff, T.G.; Chaurand, P.; Caprioli, R.M.
Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization.
Journal of Mass Spectrometry; 36 (2001) 366-369.
- [132] Stöckle, R.; Setz, P.; Deckert, V.; Lippert, T.; Wokaun, A.; Zenobi, R.
Nanoscale atmospheric pressure laser ablation-mass spectrometry.
Analytical Chemistry; 73 (2001) 13991402.
- [133] Li, L.; Garden, R.W.; Romanova, E.V.; Sweedler, J.V.
In situ sequencing of peptides from biological tissues and single cells using MALDI-PSD/CID analysis.
Analytical Chemistry; 71 (1999) 5451-5458.
- [134] Jespersen, R.S.; Chaurand, P.; van Strien F.J.C.; Spengler, B.; van der Greef, J.
Direct sequencing of neuropeptides in biological tissue by MALDI-PSD mass spectrometry.
Analytical Chemistry; 71 (1999) 660-666.
- [135] Van Veelen, P.A.; Jimenez, C.R. Li, K.W.; Wildering, W.C.; Geraerts, W.P.M.; Tjaden, U.R.; Van der Greef, J.
Direct peptide profiling of single neurons by matrix-assisted laser desorption-ionisation mass spectrometry.
Organic Mass Spectrometry; 28 (1993) 1542-1546.

- [136] Garden, R.W.; Sweedler, J.V.
Heterogeneity within MALDI samples as revealed by mass spectrometric imaging.
Analytical Chemistry; 72 (2000) 30-36.
- [137] Gusev, A.I.; Vasseur, O.J.; Proctor, A.; Sharkey, A.G.;
Imaging of thin-layer chromatograms using matrix-assisted laser
desorption/ionization mass spectrometry.
Analytical Chemistry; 67 (1995) 4565-4570.
- [138] Stoeckli, M.; Farmer, T.B.; Caprioli, R.M.
Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption
ionization time-of-flight instrument.
Journal of the American Society of Mass Spectrometry; 10 (1999) 67-71.
- [139] Stoeckli, M.; Chaurand, P; Hallahan, R.M.; Caprioli, R.M.
Automated mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein
expression in mammalian tissues.
Nature Medicine; 7 (2001) 493-496.
- [140] Dreisewerd, K.; Schürenberg, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F
Influence of laser intensity and spot size on desorption of molecules and ions in
matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 141 (1995) 127-
148.
- [141] Dreisewerd, K.; Schürenberg, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F
Matrix-assisted laser desorption/ionization with nitrogen lasers of different pulse
widths.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 154 (1996) 171-
175.

[142] Bouschen, W.; Spengler, B.

Bildverarbeitung von SMALDI-Massenspektren bei einer lateralen Auflösung von 1 μm .

Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, 36. Diskussionstagung; 09.03. – 12.03.2003, Münster.

[143] Bouschen, W; Maaß, K., Spengler, B.

Automated 3D-SMALDI imaging with a lateral resolution of 1 μm .

51th American Society for Mass Spectrometry Conference; 09.06. – 12.06.2003, Montreal, Canada.

[144] Bouschen, W; Flad, T.; Müller, C. A., Spengler, B.

Characterization of biological samples by Scanning Microprobe MALDI (SMALDI) mass spectrometry with 1 μm lateral resolution.

50th American Society for Mass Spectrometry Conference; 02.06. – 06.06.2002, Orlando, Florida.

[145] Perkins, J.R.; Smith, B.; Gallagher, R.T.; Jones, D.S.; Davis, S.C.; Hoffmann, A.D.; Tomer, K.B.

Application of electrospray mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for molecular weight assignment of peptides in complex mixtures.

Journal of the American Society for Mass Spectrometry; 4 (1993) 670-684.

[146] Belleci, T.M.; Stults, J.T.

Tryptic mapping of recombinant proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.

Analytical Chemistry; 65 (1993) 1709-1716.

[147] Wang, M.Z.; Fitzgerald, M.C.

A solid sample preparation method that reduces signal suppression effects in the MALDI analysis of peptides.

Analytical Chemistry; 73 (2001) 625-631.

- [148] Spengler, B.
Postsource decay analysis in matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry of biomolecules.
Journal of Mass Spectrometry; 32 (1997) 1019-1036.
- [149] Strupat, K; Kampmeier, J.; Horneffer, V.
Investigation of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for UV an IR MALDI. Part II: crystallographic and mass spectrometric analysis.
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes; 169 (1997) 43-50.
- [150] Miliotis, T.; Marko-Varga, G.; Nilsson, J.; Laurell, T.
Development of silicon microstructures and thin-film MALDI-target plates for automated proteomics sample identification.
Journal of the American Society for Mass Spectrometry; 109 (2001) 41-46.
- [151] Bouschen, W.; Hoffmann, C.; Tovar, G.; Spengler, B.
Identifizierung von Proteinliganden funktionalisierter Oberflächen durch MALDI-MS.
Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, 33. Diskussionstagung; 27.02. – 01.03.2000, Berlin.
- [152] Bouschen, W.; Flad, T.; Hoffmann, C.; Tovar, G.; Spengler, B.
Analysis of biological samples and functionalized surfaces with MALDI-MS and scanning microprobe MALDI-MS.
48th American Society for Mass Spectrometry Conference; 11.07. – 15.07.2000, Long Beach, California.
- [153] Bouschen, W.; Borchers, K.; Brunner, H.; Flad, T.; Kirsch, D.; Müller, C.A.; Tovar, G.; Spengler, B.
Analysis of Structured Biological and Bioactive Surfaces with SMALDI MS.
Anniversary Symposium Liebig 2003: Bioanalytical Quantum Steps; 12.05. – 15.05.2003, Schloss Rauischholzhausen.

- [154] Tovar, G.; Schiestel, T.; Hoffmann, C.; Schmucker, J.
Proteinchips für die Affinitäts-MALDI-TOF-Massenspektrometrie
Bioforum; 24 (2001), 474-477
- [155] Bernhagen, J.; Calandra, T.; Bucala, R.
Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor:
biological and structural features.
Journal of Molecular Medicine; 76 (1998) 151-161.
- [156] Tovar, G.; Hoffmann, C.; Brunner, H.
Funktionalisierung von Oxidoberflächen zur gerichteten Proteinbildung.
10. Heiligenstädter Kolloquium 2000 – Technische Systeme für Biotechnologie und
Umwelt; Heiligenstadt (2000) 71-80
- [157] Hoffmann, C.; Bouschen, W. ; Spengler, B.; Brunner, H.; Tovar, G.
Oriented immobilization of a protein receptor by a chelating silane monolayer and
direct ligand analysis by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight
mass spectrometry.
In Vorbereitung.
- [158] Weber, A.; Knecht, S.; Brunner, H.; Tovar, G.
Modularer Aufbau von Biochips durch mikrostrukturierte Abscheidung von
funktionellen Nanopartikeln.
Chemie Ingenieur Technik; 4 (2003) 437-441.
- [159] Bouschen, W.; Flad, T.; Spengler, B.
Charakterisierung biologischer Oberflächen mittels Raster-Mikrosonden-MALDI-
MS.
Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, 34. Diskussionstagung; 04.03. –
07.03.2001, München.

[160] Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.;
Dosik, H.; Parks, W. P.

In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a
series of solid tumors.

Journal of the National Cancer Institute; 51 (1973) 1417-1423.

[161] Persönliche Mitteilung Dieter Kirsch.

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich den vielen Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Durchführung meiner Arbeit unterstützt und zum Gelingen einen nicht unwesentlichen Beitrag geleistet haben.

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Bernhard Spengler danken für die Betreuung und die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Die einzigartigen Massenspektrometer, die mir zur Verfügung gestellt wurden, der Ideenreichtum, der mit in diese Arbeit eingeflossen ist, und der Weitblick stellten einen wichtigen Beitrag für die Bearbeitung dieses Themas dar.

Prof. Dr. Bruno Meyer danke ich für die Zweitbegutachtung meiner Arbeit und sein Interesse an diesem Thema.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Raimund Kaufmann, der leider viel zu früh verstorben ist, für seine frühen Ideen und seinen Einfluss auf die moderne Massenspektrometrie, die sich auch bis in meine Arbeit hinein ausgewirkt haben.

Dr. Thomas Flad möchte ich für die Bereitstellung zahlreicher biologischer Proben, sowie für sein Wissen im Umgang mit diesen Proben danken. Ebenfalls danke ich Dr. Christian Hoffmann und Kirsten Borchers für die Herstellung der funktionalisierten Siliziumträger. Ohne diese Proben wäre ein Teil meiner Arbeit in dieser Weise nicht möglich gewesen. Daniel Eikel danke ich für die Anregungen und das Engagement während seiner Zeit an unserem Institut.

Ich danke auch Dr. Dieter Kirsch für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen sowie seine Bereitschaft die hochschnellenden Wogen beim Umgang mit bürokratischen Hindernissen immer wieder zu glätten.

Bei Dr. Achim Trimborn möchte ich mich dafür bedanken, das er immer wieder den Morgenmuffel im Büro ertragen hat und für die wichtigen Diskussionen über diese Arbeit und andere Dinge, die manchmal viel zu wichtig wurden.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für die Unterstützung beim Umzug und dem Wiederaufbau der Geräte, gerade in der ersten Zeit in Gießen. Besonders möchte ich dabei Udo Wilfer danken, der immer zur Stelle war, wenn angepackt werden musste.

Meinen Eltern danke ich, für ihre Unterstützung während meiner akademischen Laufbahn und ihren unerschütterlichen Glauben an mich.

Als letztes möchte ich besonders Astrid Görtz danken, die mir immer zur Seite stand und mich so manches mal, auch über die Entfernung hinweg, aufgebaut hat, um diesen Weg zu Ende zu gehen.