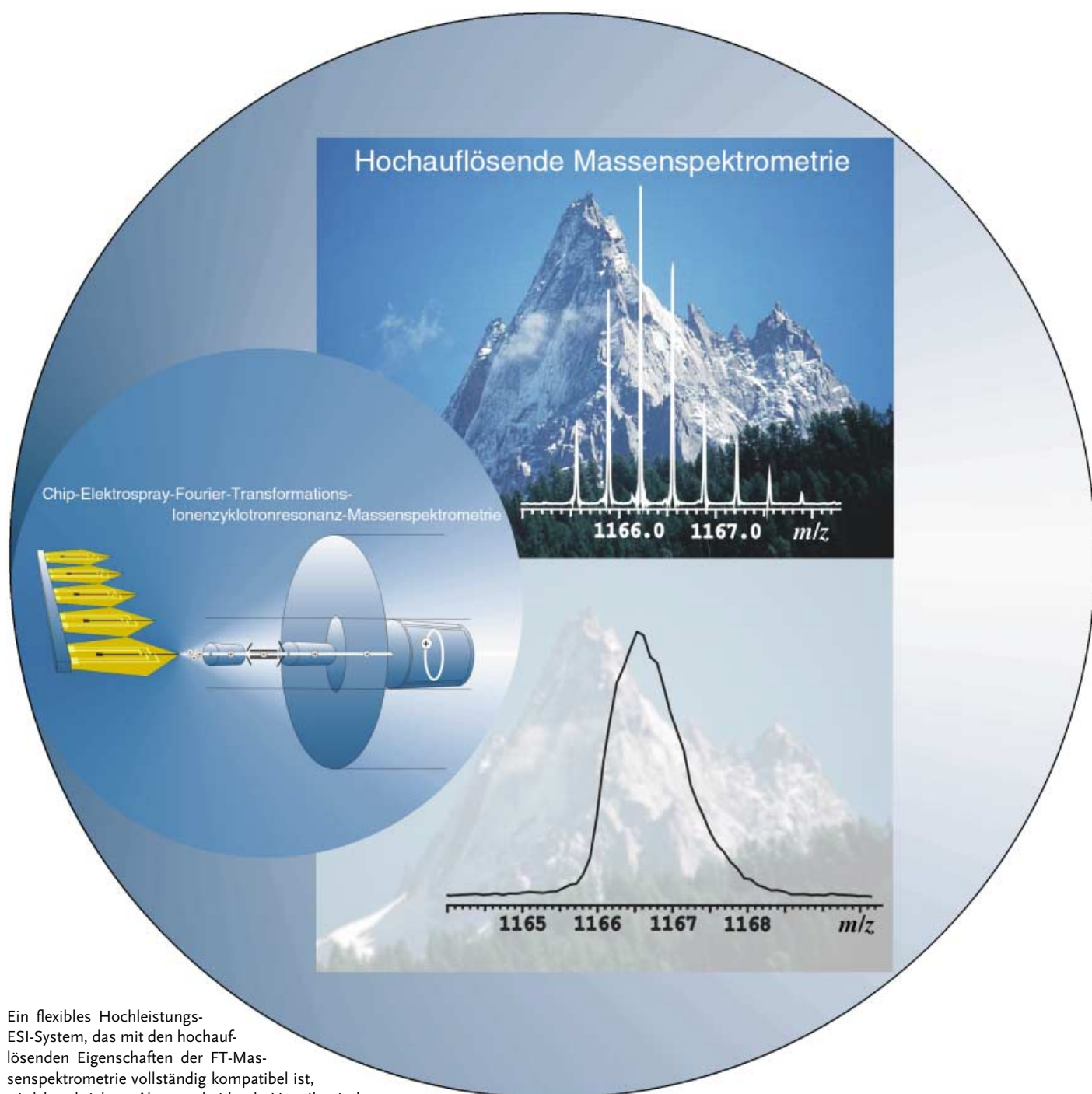


Zuschriften



Ein flexibles Hochleistungs-ESI-System, das mit den hochauflösenden Eigenschaften der FT-Massenspektrometrie vollständig kompatibel ist, wird beschrieben. Als entscheidende Vorteile sind flexible Volumina, lange Sprayzeiten bei hoher Empfindlichkeit sowie geringe Störanfälligkeit durch Kontamination oder Rauschen zu nennen. Das System ermöglicht die Analyse von Biopolymeren sowie Anwendungen in der Proteomik und kombinatorischen Chemie. Weitere Einzelheiten finden Sie in der Zuschrift von Przybylski et al. auf den folgenden Seiten.

Ein Chip-Mikrospraysystem für die hochauflösende Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie von Biopolymeren**

Joël S. Rossier, Nikolay Youhnovski, Niels Lion, Eugen Damoc, Susanne Becker, Frédéric Reymond, Hubert H. Girault und Michael Przybylski*

Die jüngsten Erfolge der Biopolymeranalytik wären ohne die neuen Hochleistungsmethoden der instrumentellen Analytik unvorstellbar.^[1] So profitierte man bei der Entschlüsselung des menschlichen Genoms entscheidend von der Entwicklung hochempfindlicher und automatisierter analytischer Verfahren.^[2] Die Proteomanalytik^[3] erfordert eine Neu- und Weiterentwicklung hochauflösender Methoden, z. B. zur Charakterisierung posttranslati onaler Strukturmodifikationen.^[4,5] Zu einer der wichtigsten analytischen Methoden zur Aufklärung von Proteinprimärstrukturen sowie zur Charakterisierung von Konformations- und Faltungszuständen und von nicht-kovalenten supramolekularen Komplexen hat sich die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) entwickelt. In Kombination mit Mikrotrennverfahren (HPLC, CE) ist die ESI-MS eine äußerst wertvolle Methode zur Analyse von komplexen Gemischen.^[6–8] Mit der Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) gelang ein Durchbruch bei der ultrahochauflösenden massenspektrometrischen Analyse von Biopolymeren mit ESI- und MALDI-Ionisierung.^[9] Entscheidende Vorzüge der FT-ICR-MS gegenüber anderen massenspektrometrischen Methoden sind die hohe Massenauflösung ($> 10^6$), die Genauigkeit der Massenbestimmung (< 1 ppm) und die hohe Empfindlichkeit.^[10] Von besonderem Interesse sind die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten der FT-ICR-MS-Techniken bei der Strukturaufklärung mithilfe stoßinduzierter Dissoziation (CID) und laserinduzierter Fragmentierung (IRMPD)^[11] sowie in Verbindung mit Mikro/Nano-ESI.^[12]

Die Kombination von Mikrochipssystemen und Massenspektrometrie als Alternative zu Chip-Fluoreszenzmethoden gewinnt in jüngster Zeit z. B. in der Peptid- und Proteinanalytik zunehmend an Bedeutung.^[13] Besonders wichtig ist die Kombination der Mikrochiptechnik mit den analytischen Möglichkeiten der ESI-MS.^[14] Kritische Faktoren bei der Kopplung sind das Chipmaterial, das Design der Mikrostruktur und die Oberflächeneigenschaften. Des Weiteren sollten die Herstellungskosten der Chips möglichst gering sein, um einen breiten Einsatz in der Bioanalytik zu ermöglichen. In den meisten bisherigen Studien wurden Glas- oder Siliconsubstrate verwendet, die aber im Allgemeinen hydrophil sind und an der Sprayöffnung zur Bildung eines Taylor-Kegels mit instabilen Sprayeigenschaften führen.^[14] In einigen Untersuchungen wurden preiswerte Polymere wie Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet, das allerdings in Folienform eine geringe mechanische Stabilität aufweist.^[15]

Wir stellen hier die Entwicklung eines Chip-Mikrospraysystems vor, das die hochauflösende ESI-FT-ICR-MS-Analyse ermöglicht.^[16] Der verwendete Mikrochip lässt sich nach Standardverfahren der Mikroelektronik durch Plasma-Ablation von Polyimidfolien herstellen.^[17] Erste Untersuchungen belegen die Anwendbarkeit des Chipsystems zur Aufnahme von Massenspektren mit hoher Massenauflösung und Massengenauigkeit. Das Verfahren hat eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Nano-ESI-MS, insbesondere bei der hochempfindlichen Proteomanalytik und der Analyse von komplexen Gemischen, z. B. kombinatorischen Peptidbibliotheken.

Wichtige Eigenschaften des Chipsystems sind die geringen Herstellungskosten und die leichte Anpassung an die instrumentellen Bedingungen der FT-ICR-MS. Als entscheidender Punkt erweist sich dabei die Auswahl des Materials. Im Unterschied zu Glas- oder Siliconchips, die sich ebenfalls zur Massenproduktion nicht eignen, wurden die hier eingesetzten Chips durch Plasma-Ablation aus Polyimidfolien unter Verwendung von Techniken hergestellt, die in der Mikroelektronikindustrie (z. B. Dyconex, Zürich) entwickelt wurden. Dabei wird der Isolator auf der kupferbeschichteten Polyimidfolie durch Plasma-Ätzung abgeschieden. Diese Technik ermöglicht das Ätzen von Probenzuführung und Sprayöffnung während der Herstellung der Mikrokanalstruktur sowie die Integration von goldbeschichteten Mikroelektroden in die Mikrostruktur des Chips. Abbildung 1 zeigt den Aufbau und die Struktur des Chips. Wegen der hohen mechanischen Stabilität von Polyimid zeigt sich trotz einer Dicke von nur ca. 10 µm um die Sprayöffnung keine Abweichung oder Krümmung. Die Oberflächeneigenschaften des Mikrokanals können durch die oxidativen oder reduktiven Eigenschaften des Plasmas gezielt eingestellt werden. Die Technik ermöglicht somit die einfache Herstellung eines hydrophoben Bauelements, das mit ESI-MS gut kombiniert werden kann.^[18] Wichtige Vorzüge sind die hohe Reproduzierbarkeit der Kanalabmessungen, die Flexibilität beim Chip-Design und die niedrigen Fertigungskosten.

Als Beispiele sind in Abbildung 2 Chip-ESI-FT-ICR-Massenspektren der B-Kette von Rinderinsulin und Rinderubiquitin dargestellt. Die Chip-FT-ICR-Spektren wurden mit Massengenauigkeiten von 1.4 ppm (Insulin) und 2.0 ppm

[*] Prof. Dr. M. Przybylski, Dr. N. Youhnovski, Dipl.-Chem. E. Damoc, Dipl.-Chem. S. Becker
Universität Konstanz, Fachbereich Chemie
Laboratorium für Analytische Chemie
78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-3097
E-mail: Michael.Przybylski@uni-konstanz.de
Dipl.-Chem. N. Lion, Prof. Dr. H. H. Girault
Laboratoire d'Électrochimie
École Polytechnique Fédérale de Lausanne
1015 Lausanne (Schweiz)
Dr. J. S. Rossier, Dr. F. Reymond
DiagnoSwiss S.A.
Rte de L'Île au bois 2, 1870 Monthey (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde von der Europäischen Union (QoL-2000, QLRT-2000-01903), der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Office Fédéral de L'Éducation et de la Science (OFES grant No 01.0182) unterstützt.

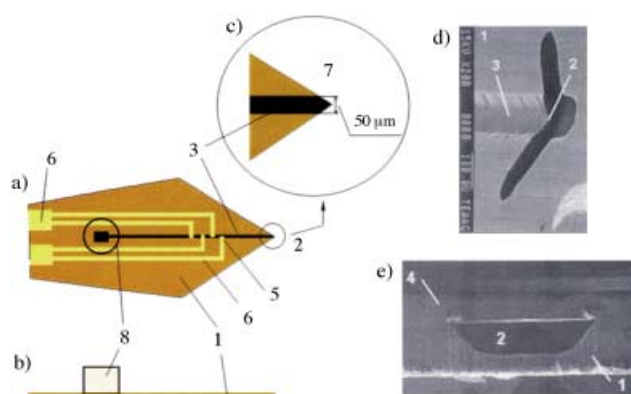


Abbildung 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme und Schema des Mikrochip-Systems. a) Aufbau des Chips (Aufsicht), b) Flüssigkeitsreservoir (Seitenansicht), c) vergrößerte Darstellung der Sprayöffnung, d, e) rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Mikrokanalstruktur (Seitenansicht und Aufsicht): 1 Polyimidsubstrat, 2 ESI-Sprayausgang, 3 Mikrokanal, 4 30 μm dicke Polyethylen/Polyethylenterephthalat-Schicht, 5 Elektrode zum Anlegen der Hochspannung, 6 Elektrodenkontakte, 7 Chipkante der Sprayöffnung, hergestellt durch Plasma-Ätzen des Substrates, 8 Flüssigkeitsreservoir zur Probenaufnahme.

(Ubiquitin) unter Anwendung des Breitband(BB)-Modus und der Side-Kick(SK)-Trapping-Methode aufgenommen. Die Massenaufösungen betrugen im BB-Modus 57000 (Ubiquitin) und 91000 (Insulin) und konnten im Hochauflösungsmodus auf $> 10^6$ erhöht werden. Die Ladungszustände der Ionen lassen sich bei Standardauflösung (BB-Modus) direkt aus der Massendifferenz zweier benachbarter Isotope bestimmen, ohne auf Dekonvolutionsverfahren zurückgreifen zu müssen (Abbildung 2). Dies ist z.B. für die Analyse von nichtkovalenten Komplexen von Bedeutung, deren Spektren wegen der geringen Ladungsverteilung nur wenige Peaks aufweisen. Die hohe Auflösung der Chip-FT-ICR-Massenspektren liefert routinemäßig Monoisotopensignale mit Massengenauigkeiten von ca. 1 ppm.

Die Charakterisierung komplexer Gemische, z.B. von Naturstoffen oder kombinatorischen Bibliotheken, erfordert häufig eine Vorfraktionierung oder die Anwendung hochauflösender Trennverfahren (z.B. HPLC oder CE). Hier ist die hohe Auflösung und Massengenauigkeit der FT-ICR-MS besonders wertvoll.^[19] Abbildung 3 zeigt als Beispiel das Massenspektrum einer kombinatorischen Peptidbibliothek, die aus dem Epitop-Motif des gastrointestinalen Glycoproteins Mucin-2, einem Dickdarmkrebs-Marker, abgeleitet wurde.^[20] In der kombinatorischen Teilbibliothek der Epitopsequenz, TQTX^[21] konnten alle Komponenten durch Monoisotopensignale identifiziert werden. Die Intensitätsverteilung der protonierten Moleküle entspricht gut der Zusammensetzung der Komponenten. Eine Ausnahme bildet das Peptid TQHT, wobei die Intensität des Ionensignals der beiden isobaren Peptide TQTIT und TQTLT nahezu doppelt so hoch ist wie die der anderen Komponenten. Im Chip-ESI-Spektrum sind die „isobaren“ Peptide TQTKT und TQTQT mit Molekulargewichten von 578.3071 bzw. 578.2708 amu ($\Delta m = 0.0364$ amu) eindeutig aufgelöst. Die exakte Massenbestimmung liefert unmittelbar die Elementzusammensetzungen aller Komponenten des Gemischs (Tabelle 1).

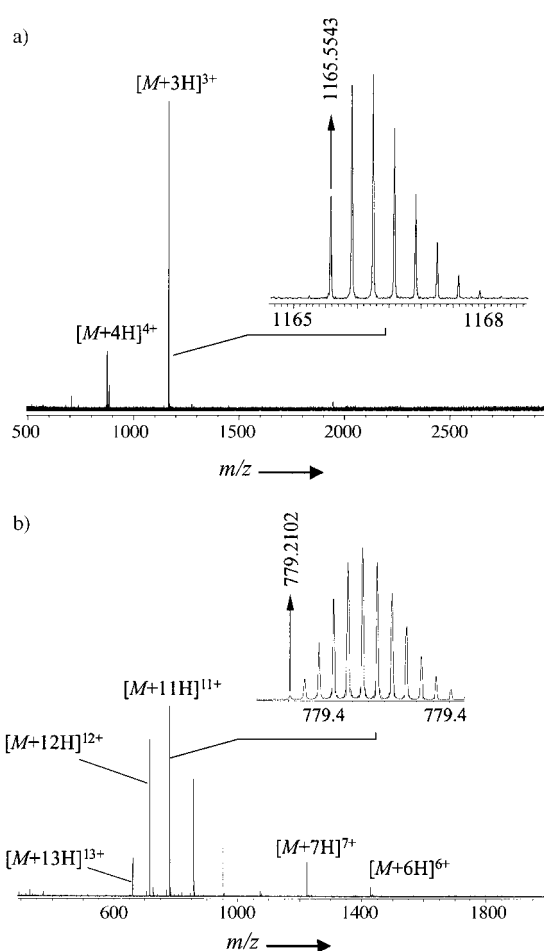


Abbildung 2. Chip-ESI-FT-ICR-Massenspektren von a) der oxidierten B-Kette von Rinderinsulin (0.0071 mg mL⁻¹ in 2-proz. wässriger Essigsäure/Methanol (1:1)) und b) Rinderubiquitin (0.02 mg mL⁻¹ in 3-proz. wässriger Essigsäure/Methanol (1:1)).

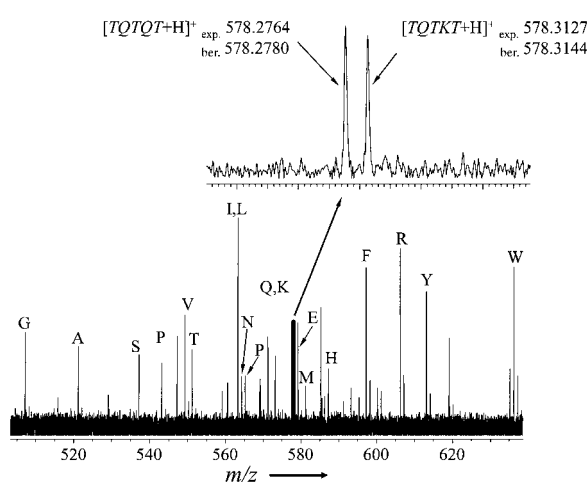


Abbildung 3. Chip-ESI-FT-ICR-Massenspektrum der Peptid-Bibliothek TQTX (X = proteinogene Aminosäuren außer Cys). Der Einschub zeigt die basislinienseparierten Peaks der protonierten Moleküle der isobaren Peptide TQTQT und TQTKT.

Tabelle 1: Bestimmung der Elementzusammensetzung einer TQTX-*Peptidbibliothek* mit Chip-ESI-FT-ICR-MS.

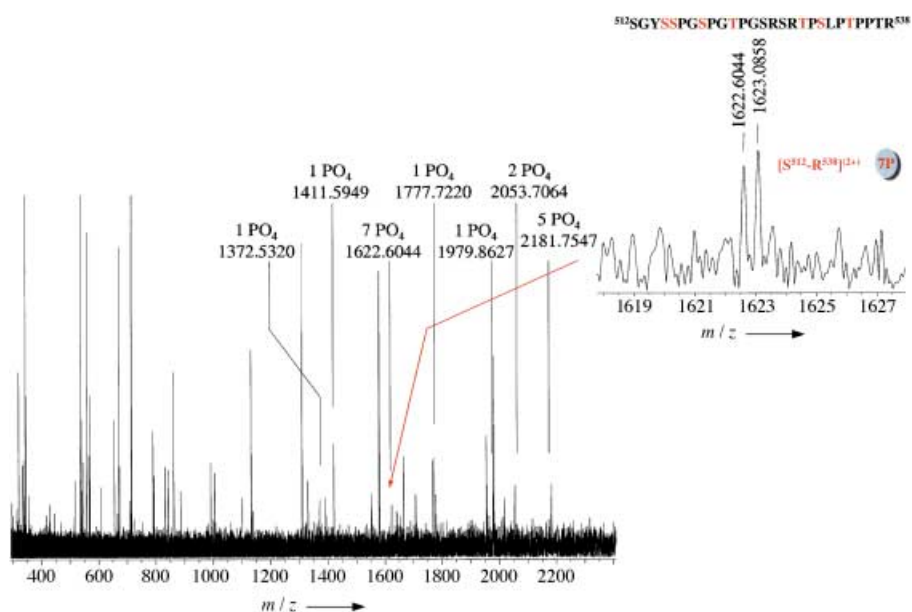
Aminosäure X	[TQTX+H] ⁺ ber.	[TQTX+H] ⁺ exp.	Δm	ppm	Elementzusammensetzung
A	521.2566	521.25547	0.00113	2.2	C ₂₀ H ₃₆ N ₆ O ₁₀
D	565.2464	565.24558	0.00082	1.5	C ₂₁ H ₃₆ N ₆ O ₁₂
E	579.2621	579.26044	0.00166	2.9	C ₂₂ H ₃₈ N ₆ O ₁₂
F	597.2879	597.28656	0.00134	2.2	C ₂₆ H ₄₀ N ₆ O ₁₀
G	507.2409	507.23953	0.00137	2.7	C ₁₉ H ₃₄ N ₆ O ₁₀
H	587.2784	587.27640	0.00200	3.4	C ₂₃ H ₃₈ N ₉ O ₁₀
I	563.3035	563.30182	0.00168	3.0	C ₂₃ H ₄₂ N ₆ O ₁₀
K	578.3144	578.31271	0.00169	2.9	C ₂₃ H ₄₃ N ₇ O ₁₀
L	563.3035	563.30182	0.00168	3.0	C ₂₃ H ₄₂ N ₆ O ₁₀
M	581.2599	581.25877	0.00113	1.9	C ₂₂ H ₄₀ N ₆ O ₁₀ S
N	564.2624	564.26118	0.00122	2.2	C ₂₁ H ₃₇ N ₇ O ₁₁
P	547.2722	547.27080	0.00140	2.6	C ₂₂ H ₃₈ N ₆ O ₁₀
Q	578.2780	578.27636	0.00164	2.8	C ₂₂ H ₃₉ N ₇ O ₁₁
R	606.3206	606.31884	0.00176	2.9	C ₂₃ H ₄₃ N ₉ O ₁₀
S	537.2515	537.24984	0.00166	3.1	C ₂₀ H ₃₆ N ₆ O ₁₁
T	551.2671	551.26583	0.00127	2.3	C ₂₁ H ₃₈ N ₆ O ₁₁
V	549.2879	549.28638	0.00152	2.8	C ₂₂ H ₄₀ H ₆ O ₁₀
W	636.2988	636.29657	0.00223	3.5	C ₂₈ H ₄₁ N ₇ O ₁₀
Y	613.2828	613.28049	0.00231	3.8	C ₂₆ H ₄₀ N ₆ O ₁₁
Durchschnitt			0.00155	2.7	
Standardabweichung			0.00038	0.6	

Ähnliche Ergebnisse wurden mit Chip-ESI-Spektroskopie an einer Reihe weiterer Polypeptide und Proteine im Molekulargewichtsbereich von 1 bis 35 kDa erhalten. Das Chip-ESI-FT-ICR-Interface liefert stabile Sprayverhältnisse über ca. 15 min mit Probelösungen von 0.1 bis 3 μ L; dies ermöglicht die Analyse von Proben auch bei sehr geringen Konzentrationen (Empfindlichkeit im amol-Bereich für Oligopeptide), ähnlich wie bei optimalen Werten der Nano-ESI-MS (siehe Abbildung 2).^[4b] Vorteile des Chip-ESI-Systems zeigen sich vor allem bei der Analyse von Peptiden mit niedrigen Molekulargewichten, wobei im Unterschied zur Verwendung von Nano-ESI-Kapillaren^[12] Störungen durch Rauschen oder Kontamination auftreten. Die mit dem Chip erzielbaren Sprayzeiten ermöglichen ferner die Anwendung sämtlicher Fragmentierungstechniken – einer der zentralen Vorzüge der FT-ICR-MS.^[9] Fragmentierungsexperimente mit dem Modellpeptid Angiotensin wurden durch stoßinduzierte Dissoziation in der ESI-Quelle und von isolierten Ionen in der ICR-Zelle mit 1) SORI-CID mit Ar als Stoßgas und 2) IRMPD ausgeführt.^[10] Dabei lieferten MS/MS-Experimente mit dem Chipsystem mit IRMPD-Fragmentierung ähnliche Ergebnisse wie mit der Nano-ESI-Quelle (Tabelle 2). Bei ersten MSⁿ-Fragmentierungen konnten mit SORI-CID und IRMPD Spektren bis zum MS³-Bereich erhalten werden.

Ein Beispiel für die Anwendung des Chip-FT-ICR-Systems in der Proteomanalytik ist in Abbildung 4 dargestellt. Gezeigt ist das Spektrum eines Peptidgemischs des humanen Tau-Proteins (eines Schlüsselproteins bei der Bildung von Neurofibrillenbündeln bei der Alzheimer'schen Krankheit; die pathophysiologische Aggregation des Tau-Proteins scheint mit der Multi-(Hyper)-Phosphorylierung zusammenzuhängen und wird daher intensiv untersucht).^[22] Im Chip-FT-ICR-Spektrum des tryptischen Peptidgemischs konnte die vollständige Primärstruktur einschließlich 18 Ser/Thr-Phosphorylierungen identifiziert werden, ein Ergebnis, das die hohe analytische Auflösung des Chip-Systems verdeutlicht. Die phosphorylierten Peptidomänen konnten mit Massengenauigkeiten von 5 bis 20 ppm bestimmt werden;

Tabelle 2: FT-ICR-Fragmentierung von Angiotensin I mit IRMPD und CID.

MS/MS-Fragmentierung	isolierte Ionen	Sequenz	Auflösung	Genauigkeit [ppm]
IRMPD	[M+2H] ²⁺ [M+3H] ³⁺	DYIHP	50 000	6
CID	–	IHPFHL	60 000	3

**Abbildung 4.** Chip-ESI-FT-ICR-Massenspektrum des Trypsin-Gemischs des humanen neurofibrillären Tau-Proteins. Phosphorylierte Peptide im *m/z*-Bereich 200–2500 sind gekennzeichnet. Der Einschub zeigt das heptaphosphorylierte Peptid (512–538); die sieben rot markierten Phosphorylierungsstellen wurden mit NiceProt View (SwissProt Datenbank, Nr. P10636) identifiziert (C₁₁₃H₁₉₁N₃₆O₆₁P₇, doppelt protoniert; ber. 1622.55513, gef. 1622.60435, Δ = 30 ppm).

dies ermöglicht z.B. die direkte Identifizierung von jeweils fünf und sieben Phosphorylierungsstellen in den Multiphosphorylierungs-„Clustern“ (512–538) und (382–398) (T386, S388, T395, T396, S397) (Abbildung 4).

Uns gelang die Entwicklung eines leistungsfähigen und stabilen Mikrospraysystems, das mit FT-ICR-MS vollständig kompatibel ist und an entsprechende ESI-Ionenquellen leicht angepasst werden kann. Der Mikrochip lässt sich unter milden Ionisierungsbedingungen und bei niedrigen Flussgeschwindigkeiten einsetzen und ermöglicht die einfache Multiplexentwicklung sowie die Kopplung mit Mikro-CE-Verfahren ohne zusätzliche Lösungsmittel. Als Vorteile gegenüber Nano-ESI-Kapillaren^[10b,12] sind flexible Sprayvolumina, Volumenflexibilität, lange Sprayzeiten bei hoher Empfindlichkeit, geringere Kontamination sowie der mögliche Einsatz in der Oberflächenchemie (z. B. Immobilisierungsreaktionen) zu nennen. Erste Untersuchungen in unseren Laboratorien zeigen ferner eine besonders gute Anwendbarkeit des Mikrochipssystems in der hochauflösenden Proteomanalyse.

Experimentelles

Die Herstellung der Mikrochips (Abbildung 1) ist in Lit. [16,17] ausführlich beschrieben. Im Wesentlichen wird eine 50 µm dünne Polyimidfolie (30 × 40 cm) von beiden Seiten mit einer 5 µm dünnen Kupferschicht überzogen und in einem Rahmen fixiert. Die Oberfläche wird mit einem Photolack beschichtet, der mit Standardverfahren belichtet und entwickelt wird. Die Kupferschicht wird mit einer wässrigen CuCl/H₂O₂-Lösung geätzt und das Substrat mit einem Niederdruckplasma (O₂/CF₄-Gasgemisch mit 80 % O₂) behandelt. Die Polymeroberfläche wird isotrop bei einer Ablationsgeschwindigkeit von 1 bis 2 µm min⁻¹ zu Kanälen geätzt, und auf die als Elektrode dienende Kupferschicht wird ein Goldüberzug aufgetragen. Abschließend werden die Mikrokanäle mit einer 30 µm dünnen Polyethylen/Polyethylenterephthalat-Schicht versiegelt.

Das Chip-FT-ICR-Kopplungsinterface wurde in einem selbstgebauten Chip-Halter hergestellt, der die Fixierung von bis zu fünf Chips ermöglicht und mit einer x,y,z-Feinjustierung zur Positionierung des Chips vor dem Kapillareingang der Ionenquelle ausgestattet ist. Dazu wurde der Standard-ESI-Ionenquellen-Einlass (Bruker Apex II, APOLLO) entfernt und die Chip-Halterung 1–2 mm vor dem Kapillareingang angebracht (Abbildung 1). Die ESI-Spannung wird an den Chipkontakten oder mit einer Elektrode am Chip-Reservoir angelegt.

Die FT-ICR-Massenspektren wurden mit einem 7T-Bruker-Daltonik-Apex-II-FT-ICR-Massenspektrometer mit einer APOLLO-Elektrospray/Nano-ESI-Quelle aufgenommen. Die Probelösungen (0.5–5 µL, 0.0005–0.01 µg µL⁻¹) wurden in das Chip-Reservoir gegeben, der Chip auf dem Probenhalter fixiert und die Sprayspannung langsam auf die Arbeitsspannung (1000–2300 V) erhöht. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen in 4–32 Einzelscans aufgenommen: Ausgangsspannung der Kapillare 45–70 V, Skimmer 1 9.14 V, Skimmer 2 8.82 V, Ionisierungspuls 2500 µs, Ionisierungsverzögerung 1 µs, Anregungspuls 1.2 µs. Die B-Kette von Rinderinsulin wurde in Wasser/Methanol/Essigsäure (49.5:49.5:1) zu einer Konzentration von 0.0071 mg mL⁻¹ gelöst; Rinderubiquitin wurde in 3-proz. wässriger Essigsäure/Methanol gelöst (0.002 mg mL⁻¹). In-Gel-Abbau mit Trypsin (2 Stunden) und Probenvorbereitung zur Proteomanalytik wurden wie in Lit. [5,9d] beschrieben ausgeführt.

IRMPD-Experimente (Kühlgas Argon): Quenching-ESI-Quelle, ICR-Zelle, 5000 µs; Akkumulierungszeit 5000 µs; Ioneninjektion 1800 µs; IR-Lasereinstrahlung 40000 µs; 30 µs Detektionszeit. Die CID-Experimente wurden bei einer Kapillar-Ausgangsspannung von 70 bis 120 V ausgeführt.

Peptide und Peptidbibliotheken der Mucin-2-Epitopsequenz, TQXT, wurden mit SPPS an einem Chlormethyl-Polystyrolharz nach dem Mischungs/Teilungsverfahren mit der BOC/Benzyl-Schutzgruppenstrategie synthetisiert.^[20] Die Kupplungsschritte wurden mit Ninhydrin überprüft. Anschließend wurde mit HF vom Harz abgespalten (1 Stunde) und die Rohprodukte mit HPLC vor der massenspektrometrischen Analyse gereinigt.

Eingegangen am 29. Mai 2002,

veränderte Fassung am 15. August 2002 [Z19388]

- [1] J. H. Chan, A. T. Timpermann, D. Quin, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4437–4444.
- [2] B. Zhang, H. Liu, L. Karger, F. Foret, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3258–3264.
- [3] Die Bezeichnung Proteom wurde zur Kennzeichnung des vollständigen Expressionsmusters eines Genoms eingeführt.
- [4] a) T. Rabilloud, *Proteomics* **2002**, *2*, 3–10; b) M. Przybylski, N. Youhnovski, K. Bruns, E. Damoc, C. Damoc, R. Knippers, M. Kohlmann, R. Cecal, X. Tian, F. Reymond, J. Rossier, *Proteomics* **2002**, im Druck.
- [5] a) S. Meri, M. Baumann, *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 213–220; b) M. R. Larson, G. L. Soerensen, S. J. Fey, P. M. Larsen, P. Roepstorff, *Proteomics* **2001**, *1*, 223–238.
- [6] a) M. S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167–180; b) M. Przybylski, *Adv. Mass Spectrom.* **1995**, *13*, 257–283; c) G. Valaskovic, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty, *Science* **1996**, *273*, 1199–1202.
- [7] a) J. A. Loo, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 1–23; b) M. Przybylski, M. O. Glocker, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 878–899; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 806–823; c) R. D. Smith, J. E. Bruce, Q. Wu, Q. P. Lei, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 191–202.
- [8] a) M. T. Davis, T. D. Lee, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 194–201; b) D. Figeys, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3721–3727.
- [9] a) A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, G. S. Jackson, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 1–35; b) M. E. Belov, M. V. Gorshkov, H. R. Udseth, G. A. Anderson, A. V. Tolmachev, D. C. Prior, R. Harkewicz, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 19–23; c) M. R. Emmett, F. M. White, C. L. Hendrickson, S. D. Shi, A. G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 333–340; d) S. H. Bauer, M. F. Wiechers, K. Bruns, M. Przybylski, C. A. O. Stuermer, *Anal. Biochem.* **2001**, *298*, 25–31.
- [10] a) T. B. Walk, A. W. Trautwein, H. Richter, G. Jung, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1877–1880; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1763–1765; b) T. A. Fligge, C. Reinhard, C. Harter, F. T. Wieland, M. Przybylski, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8491–8496.
- [11] G. Baykut, R. Jertz, M. Witt, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 1238–1247.
- [12] a) T. A. Fligge, M. Przybylski, J. P. Quinn, A. G. Marshall, *Eur. Mass Spectrom.* **1998**, *4*, 401–404; b) T. A. Fligge, J. Kast, K. Bruns, M. Przybylski, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 112–116.
- [13] R. D. Oleschuk, D. J. Harrison, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 379–388.
- [14] T. C. Rohner, J. S. Rossier, H. H. Girault, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5353–5357.
- [15] a) J.-S. Kim, D. R. Knapp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 463–469; b) J. S. Kim, D. R. Knapp, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3993–3999.
- [16] M. Przybylski, N. Youhnovski, F. Reymond, J. Rossier, UK Patent GB0121590.4 **2001**.
- [17] J. Rossier, F. Reymond, P. E. Michel, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 858–867.
- [18] V. Gobry, J. Van Oostrum, M. Martinelli, T. Rohner, J. Rossier, H. H. Girault, *Proteomics* **2002**, im Druck.

- [19] E. Windberg, F. Hudecz, A. Marquardt, F. Sebestyén, A. Kiss, S. Bosze, H. Medzihradszky-Schweiger, M. Przybylski, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 834–839.
- [20] K. Uray, M. R. Price, F. Hudecz, *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 319–326.
- [21] A. Marquardt, E. Windberg, X. Tian, M. Kohlmann, F. Hudecz, M. Przybylski in *Proceedings of the 18th Symposium on Combinatorial Chemistry* (Hrsg.: R. Epton), Mayflower, Kingwinford, **2002**, im Druck.
- [22] a) M. L. Billingsley, R. L. Kincaid, *Biochem. J.* **1997**, *323*, 577–591; b) K. C. Wilhelmsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7120–7121.

Biomíneralisation



Morphosynthese sternförmiger Titandioxid/Siliciumdioxid-Schalen**

Dirk Volkmer,* Stefano Tugulu, Matthias Fricke und Tim Nielsen

Biomíneralisierende Organismen, z. B. Diatomeen (Kieselalgen) oder Radiolarien („Strahlentierchen“), bilden kompliziert geformte anorganische Gehäuse, die hauptsächlich aus glasartigem Siliciumdioxid bestehen.^[1] Die morphogenetischen Grundlagen der Zellentwicklung dieser Organismen, die zu einem arttypischen Design der Schalen führt, sind weitgehend unbekannt. Erst in jüngerer Zeit wurden überraschende Details des Siliciumdioxid-Stoffwechsels in Diatomeen und anderen verkieselnden Organismen entdeckt, u. a. auch bisher unbekannte Enzymklassen (Silicateine^[2]) und Peptide (Silaffine,^[3] Frustuline,^[4] Pleuraline (früher als HEP bezeichnet),^[5] SP41^[6]). Diese sind entweder an der Kondensation und Präzipitation der Kieselsäure oder der Schalenbildung beteiligt.

[*] Dr. D. Volkmer, S. Tugulu
Universität Bielefeld
Fakultät für Chemie, AC1
33501 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-6003
E-mail: dirk.volkmer@uni-bielefeld.de

M. Fricke, Dr. T. Nielsen
Universität Bielefeld
Fakultät für Physik, D3
33501 Bielefeld (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (Schwerpunktprogramm 1117 „Prinzipien der Biomíneralisation“; Förderungs-Nr. Vo 829/2-1). D.V. dankt der DFG für ein Habilitationsstipendium (Förderungs-Nr. Vo 829/1-1).



Hintergrundinformationen (Instrumentelles und Syntheseschriften) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Die einzelligen Diatomeen sind besonders interessante Modellorganismen, die als Vorbild für die Entwicklung neuartiger biomimetischer Strategien zur Herstellung komplexer, hierarchisch strukturierter Materialien dienen können.^[7] Die Schalenbildung vollzieht sich hier in einem hochspezialisierten Membrankompartiment, dem „silica deposition vesicle“ (SDV).^[8] Es herrscht noch immer Uneinigkeit über die Prozesse, durch welche das SDV in seine endgültige Form gebracht wird.^[9] SDVs kommen in einer ganzen Reihe einzelliger Lebewesen vor (Schalen-Amöben, Sonnentierchen und Radiolarien), was auf einen einheitlichen Sekretionsmechanismus bei der Herstellung verkieselter Zellstrukturen hinweist.^[10] An der Bildung der hierarchisch strukturierten, verkieselten Diatomeenzellwände sind verschiedene Differenzierungs- und Wachstumsschritte auf charakteristischen Größenebenen beteiligt, die sowohl nanoskopische als auch mikroskopische Strukturen umfassen. Daher wurde vorgeschlagen, zwischen Mikro- und Makromorphogenese klar zu trennen.^[11]

Wir berichten hier über erste Versuche zur Entwicklung eines biomimetischen Modellsystems zur Schalenbildung einzelliger Organismen wie Diatomeen oder Radiolarien. Das Modellsystem besteht aus einem tensidstabilisierten Öltröpfchen, der durch Mikroinjektion in eine wässrige Lösung eingebracht wird. Er enthält geringe Mengen einer monomeren Metalloxid-Vorstufe, die sich in der wässrigen Lösung hydrolytisch zersetzt und schließlich zur Bildung einer mineralisierten Schale an der Öl/Wasser-Grenzfläche führt. Das Fortschreiten der Mineralisation wurde in situ mittels Videomikroskopie verfolgt. Dieses einfache Modellsystem wurde gewählt, weil es entscheidende charakteristische Merkmale biologischer Systeme zeigt: Es hat einen primitiven „Silicium-Metabolismus“, der monomere Kieselsäure aus einer maskierten Speicherform freisetzt. Die Freisetzung der hydrolytisch instabilen Metalloxid-Vorstufe findet an einer membranartigen Oberfläche statt. Die Abmessungen des Öltröpfchens (10–100 µm) sind mit der typischen Größe vieler verkieselnder, einzelliger Organismen vergleichbar. Da der Öltröpfchen nur eine begrenzte Menge der Metalloxid-Vorstufe enthält, ist der Schalenbildungsprozess intrinsisch selbstterminierend. Was noch wichtiger ist: Durch Einsatz sorgfältig ausgewählter organischer Additive, die in der Öl- bzw. in der wässrigen Phase gelöst werden, lassen sich dynamische Selbstorganisationsprozesse induzieren, die schließlich zur Bildung diskreter, komplex geformter Hohl-schalen führen.

Wir haben unsere Aufmerksamkeit besonders auf ein System konzentriert, das zur Morphosynthese diskreter, sternförmiger Schalen mit frappierender Ähnlichkeit zu verkieselten Skeletten von Radiolarien führt. Das Basisreaktionssystem besteht aus einem Chlorcyclohexan-Tropfen, der Arachidinsäure enthält ($c = 42.4 \text{ mM}$),^[12] während die stark verdünnte, wässrige Phase Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, $c = 55.6 \text{ µM}$) enthält. Einige Minuten nach erfolgter Mikroinjektion erscheinen wellenförmige Erhebungen an der Oberfläche des Öltröpfchens (Abbildung 1). Man kann das Wachstum kleiner Stacheln beobachten, die von der Oberfläche des Öltröpfchens in die wässrige Phase hineinwachsen und mit Flüssigkeit gefüllt sind. Die Stacheln erreichen