



Doctoral Thesis

Soft ionization mass spectrometry of biomolecules a dissertation on ESI and AP-MALDI mass spectrometry

Author(s):

Daniel, Jürg M.

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005025135> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

15. AUG. 2005

**Soft Ionization Mass Spectrometry
of Biomolecules**

A Dissertation on ESI and AP-MALDI Mass Spectrometry

submitted to the

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH**

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Jürg M. Daniel

Dipl. Chem. ETH

Born September 28, 1975

Rheinfelden (Aargau)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Renato Zenobi, ETH Zurich, examiner
Dr. Vladimir Doroshenko, MassTech Inc., co-examiner
Prof. Ernö Pretsch, ETH Zürich, co-examiner

Summary

The present thesis is divided into three main topics: instrumentation development, application of electrospray ionization (ESI) mass spectrometry (MS) to measure non-covalent interactions, and design of coupling approaches for atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption / ionization (AP-MALDI) and atmospheric pressure ionization from solution (AP-IRIS).

At the starting point of the present thesis, our in-house time-of-flight mass spectrometer exhibited rather low sensitivity and showed several artifacts. The source for the artifacts was identified and could be eliminated using different approaches. The sensitivity of the instrument was improved enormously. In order to compare different variants of electrospray, a nano electrospray source was built and successfully applied to measure proteins.

Noncovalent interactions play an important role in biochemistry; many processes in biology are controlled by noncovalent complexes, *e.g.* protein structure, drug - receptor interactions, and DNA base pairing. Different approaches and possibilities, already employed by different research groups, are introduced. The interaction strength of adenylate kinase with the two inhibitors P^1, P^4 -di(adenosine-5')tetraphosphate and P^1, P^5 -di(adenosine-5') pentaphosphate was determined. Because the addition of the inhibitors reduces the total ionization efficiency, the analysis method is based on the relative intensities of the bare protein and the corresponding complex. It is thus independent from the total ionization efficiency. Going from smaller proteins to bigger ones, the width of the mass signals for the protein and its complexes gets broader preventing the mass resolution of the bare protein and its complex. We have thus developed a method where the bare protein signal and the signal of its complexes do not need to be fully resolved. As a proof-of-principle, the interaction strength of chorismate mutase with a transition state analogue inhibitor was determined.

Coupling continuous flow separation techniques to MALDI MS has been a challenge for a long time and a lot of approaches have emerged. Using the benefit of AP-

MALDI, *i.e.* the sample must not be vacuum stable, a novel coupling approach is presented based on liquid samples containing co-dissolved matrices. The applicability of the proposed method is shown for different classes of compounds, *i.e.* peptides, proteins, and polymers. The upper mass limit of 13'000 Da was defined by instrumental limitations rather than by the desorption / ionization method. Since the effluent of most of the separation methods used for biological samples consists of high fractions of water, the use of water as the matrix for desorption / ionization is beneficial. The characteristics of water employed as a matrix in AP-IRIS MS was investigated. A novel coupling approach, based on single droplet AP-IRIS, is introduced and the principle is proven. The limit of detection for this method is yet not sufficient and will need further improvement.

In conclusion, the present thesis shows that new experimental methods can largely depend on instrumentation modification. Building new devices and/or setup designs for mass spectrometric analysis may not be trivial, however, crucial for successfully applying the personal research ideas.

Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit ist in drei Schwerpunkte aufgegliedert: instrumentelle Entwicklungen, Anwendung von Elektrospray Ionisierung Massenspektrometrie (MS) zur Bestimmung von nichtkovalenten Wechselwirkungen, und Planung und Entwicklung von Methoden zur Kopplung von Flüssigchromatographie mit Matrix-unterstützter Laser Desorption / Ionisation (MALDI) bei Atmosphärendruck (AP-MALDI) und mit Infrarot Laser Desorption aus Lösung bei Atmosphärendruck (AP-IRIS).

Zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit besass das Flugzeitmassenspektrometer eine limitierte Empfindlichkeit und für jedes Massensignal wurden kleine Artefaktsignale beobachtet. Die Quellen dieser Artefaktsignale konnten lokalisiert werden und wurden durch verschiedene Ansätze letztlich unterbunden, gleichzeitig konnte die Empfindlichkeit enorm gesteigert werden. Um eine Auswahl an verschiedenen Elektrospray-Varianten zur Verfügung zu haben, wurde eine Nanoelektrosprayquelle gebaut, mit welcher erfolgreich Proteine gemessen werden konnten.

Nichtkovalente Wechselwirkungen gehören in der Biologie zu den wichtigsten Wechselwirkungen. Viele biochemische Prozesse werden durch nichtkovalente Komplexe gesteuert: Proteinstrukturen, Medikament-Rezeptor Wechselwirkungen, oder beispielsweise DNA Basenpaarung. Es wurden bereits verschiedene Möglichkeiten erforscht, nichtkovalente Wechselwirkungen mit Hilfe von Massenspektrometrie zu bestimmen; diese werden vorgestellt. Neu werden die Komplexbildungskonstante der nichtkovalenten Komplexe von Adenylate Kinase mit den Inhibitoren P^1, P^4 -di(adenosine-5')tetraphosphat und P^1, P^5 -di(adenosine-5') pentaphosphat mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt. Da das Hinzufügen der Inhibitoren die Gesamtintensität der erhaltenen Spektren negativ beeinflusste, wurde eine Methode erarbeitet, die nur auf dem Verhältnis der Integrale des reinen Proteins und des entsprechenden Komplexes aufbaut und damit von der totalen Signalintensität unabhängig wird. Bei der Messung grösserer Proteine beobachtet man eine starke Verbreiterung der Signale durch unspezifische Anlagerung von Lösungsmittel- und Puffermolekülen. Dadurch kann das reine Protein und sein Komplex mit einem klei-

neren Molekül nicht mehr massen-aufgelöst werden. Die Stärke der nichtkovalenten Wechselwirkung von Chorismate Mutase mit einem Übergangszustandsanalogon wurde mit einer Methode bestimmt, die die Auflösung der Signale des reinen Proteins und des Komplexes nicht mehr voraussetzt.

Die Kopplung zwischen Flüssigkeitschromatographie und Matrix-unterstützter Desorption / Ionisierung stellt seit längerer Zeit eine Herausforderung dar und verschiedene Lösungsansätze wurden bereits präsentiert. Ein neuer Lösungsansatz wird hier vorgestellt, welcher den Vorteil der Matrix-unterstützten Desorption / Ionisierung unter Atmosphärendruck ausnützt, dass die Proben nicht vakuumstabil sein müssen. Der Analyt wird zu einer Lösung von Matrix zugegeben und direkt aus der Lösung desorbiert. Das Funktionieren dieses Lösungsansatzes konnte für verschiedene Klassen von Analyten, z. B. Peptiden, Proteinen und Polymeren, gezeigt werden. Die experimentell bestimmte obere Massengrenze von 13'000 Da wurde durch instrumentelle Parameter begrenzt und nicht durch die Methode. Da die Elutionsmittel für Flüssigchromatographie bei biologischen Proben meist einen hohen Wasseranteil besitzen, ist es von Vorteil, Wasser als Matrix zu verwenden. Die Eigenschaften von Wasser als Matrix in AP-IRIS wurden untersucht. Eine neue Kopplungsmethode, basierend auf der Desorption von einzelnen Tropfen, wurde entwickelt und dessen Funktionieren wurde bewiesen; allerdings ist die Empfindlichkeit noch ungenügend und muss künftig noch verbessert werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, wie wichtig Geräte-spezifische Modifikationen für massenspektrometrische Messungen sein können. Das Überarbeiten von bestehenden Bauteilen oder gar ein Neu-Design mögen zwar ein manchmal schwerlicher Weg sein, dies ist aber letztlich der einzige erfolgsversprechende Ansatz für neue Forschungsergebnisse.