(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. April 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/029286 A2

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12Q 1/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003109

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. September 2003 (15.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 43 530.8 19. September 2002 (19.09.2002) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN** [DE/DE]; Körperschaft des öffentlichen Rechts, Schumannstrasse 22, 10098 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **SCHLÜTER, Hartmut** [DE/DE]; Treitschkestrasse 23, 12163 Berlin (DE). **JANKOWSKI, Joachim** [DE/DE]; Fasanenstrasse 9c, 14523 Stansdorf (DE).

(74) Anwalt: **BOECKH, Tobias**; Hertin Anwaltssozietät, Kurfürstendamm 54/55, 10707 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:
— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten*

Veröffentlicht:
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** METHOD FOR IDENTIFYING THE ENZYME ACTIVITIES OF ANY PROTEIN EXTRACT

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR ERKENNUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN VON BELIEBIGEN PROTEINEXTRAKTEN

(57) **Abstract:** The invention relates to an integrated platform technology which is used to purify biopolymer extracts (preferably protein extracts) from biological sources (e.g. cell cultures of prokaryotes and eukaryotes, human or animal tissues and cells, and plant cells), to store samples of various purification steps in a reserve system (in the form of a protein library) and to remove aliquots from the reserve system, in order to test the same for defined catalytic activities. Samples having the defined activity can then be identified by analytical methods, especially by means of mass spectrometry and protein-chemical methods. The individual steps of the methods can be carried out manually or in an automated manner.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine integrierte Plattform-Technologie, mit der Biopolymer-Extrakte (vorzugsweise Proteinextrakte) aus biologischen Quellen (z.B. Zellkulturen von Prokaryoten und Eukaryoten, menschlichen oder tierischen Gewebe und Zellen, sowie pflanzliche Zellen) gereinigt, Proben verschiedener Reinigungsstufen in einem Rücklage-System (in Form einer Proteinbibliothek) aufbewahrt und Aliquots aus dem Rücklage-System abgenommen werden können, um diese auf definierte katalytische Aktivitäten zu prüfen. Proben, die die definierte Aktivität aufweisen, können dann über analytische Methoden identifiziert werden, insbesondere mittels Massenspektrometrie und proteinchemischen Methoden. Die einzelnen Verfahrensschritte können manuell oder automatisiert betrieben werden.

WO 2004/029286 A2

Verfahren zur Erkennung von Enzymaktivitäten von beliebigen Proteinextrakten

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Erkennen von Enzymaktivitäten von beliebigen Proteinextrakten.

Stand der Technik

Nachdem die Entschlüsselung des menschlichen Genoms fast abgeschlossen ist, ist die systematische Analyse der durch das Genom exprimierten Proteine (Proteom) in den Vordergrund des Interesses gerückt. Von der Proteomanalyse werden neue wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der zellulären Funktionen und ihrer Störungen erwartet. Zu den Proteinen gehören Enzyme, die an allen Lebensprozessen beteiligt sind. Aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften sind Enzyme im Vergleich zu vielen Strukturproteinen in sehr viel niedrigeren Konzentrationen in der Zelle anzutreffen, so dass diese wichtige Gruppe der Proteine sich der 2D-Elektrophorese-Analytik häufig entzieht. Bisher ist erst ein Bruchteil aller im menschlichen Organismus während einer Lebensspanne exprimierten Enzyme bekannt. In der Vergangenheit konnte bereits von einigen dieser Enzyme die Einbindung in die Entstehung von Krankheitsprozessen beschrieben und damit Beiträge zur Erkennung und auch Behandlung von Krankheiten geliefert werden. Durch die funktionelle Proteomforschung sollte sich der Erkenntnisgewinn in Zukunft vervielfachen. Die Erforschung der Enzyme ist jedoch nicht nur für das Verständnis, die Erkennung (Diagnostik) und die Behandlung (Pharmaco-Genomics) von Krankheiten von Bedeutung sondern auch für viele Bereiche der Biotechnologie. Hierzu zählen die

Stoffumwandlung mittels Enzymen sowie der Einsatz von Enzymen in der Analytik. Die gezielte Suche nach neuen Enzymen stellt daher einen wichtigen Schritt in der funktionellen Proteomforschung mit einem großen anwendungsrelevanten Potential dar.

Die bisherige Proteomforschung stützte sich weitgehend auf die 2D-Elektrophorese Technik, mit der Proteinmuster zweier unterschiedlicher Zustände von Zellen vergleichend untersucht werden. Der große Vorteil der 2D-Elektrophorese ist in der hohen Auflösung bei der Proteintrennung und der schnellen Identifikationsmöglichkeit der interessierenden Proteine zu sehen. Bis zu 10.000 Proteine lassen sich mit einem 2D-Gel trennen. Die 2D-Elektrophorese-Technik wird jedoch von einigen Nachteilen begleitet, die diese Technik für funktionelle Fragestellungen der Proteomforschung für ungeeignet erscheinen lässt. Hinzu kommt, dass Membranproteine oder Proteine > 100 kDa mit anderen Trenntechniken (z.B. durch 1D SDS) aufgetrennt werden müssen. Proteine, die nur in geringsten Konzentrationen vorkommen, können zwar sichtbar gemacht werden, sind aber häufig schwer zu identifizieren. Außerdem können aufgrund der Protein-denaturierenden Bedingungen keine Informationen über die Funktion der getrennten Proteine erbracht werden. Die neu entwickelte ICAT (isotope coded affinity tags) Technik erlaubt zwar für Cystein-haltige Proteine eine bessere vergleichende Quantifizierung der Proteinmuster zweier unterschiedlicher Zustände, kann aber, methodisch bedingt, auch keine Informationen über die Funktion der interessierenden Proteine vermitteln.

Zum Nachweis von Enzymen wurden in jüngerer Zeit einige Fluoreszenz-basierte Nachweissysteme vorgestellt, mit denen sich Proteinfraktionen im Mikrotiterplatten-Format auf Enzymaktivitäten durchsuchen lassen. Ähnliche Nachweisverfahren gibt es auch auf UV-basierten Systemen. Bei all diesen Nachweisverfahren ist man jedoch immer auf die Verfügbarkeit von Substraten angewiesen, die mit einem fluoreszierenden Chromophor markiert sind. Durch die Derivatisierung mit dem Chromophor kann das Substrat unter Umständen so in seiner chemischen Struktur verändert werden, dass das gesuchte Enzym das Substrat als solches nicht mehr erkennt. Der eindeutigste Nachweis von Enzymaktivitäten gelingt mit Isotopen-markierten Substraten. Diese Nachweissysteme haben jedoch den Nachteil, mit radioaktiven Substanzen arbeiten zu müssen.

Jankowski et al. (Anal. Biochem. 290, 324–329 (2001)) beschreiben ein System, welches sich lediglich auf den grundsätzlichen Nachweis von Enzymaktivitäten beschränkt. Zum Nachweis von Enzymaktivitäten werden (ungereinigte) immobilisierte Proteine, die aus Protein-haltigen Lösungen stammen, mit Reaktions-spezifischen Substraten in salzfreien wässrigen Lösungen inkubiert. Die bei Anwesenheit eines gesuchten Enzyms entstehenden Reaktionsprodukte werden massenspektrometrisch direkt aus dem Inkubationsmedium nachgewiesen. Mithilfe dieser Methode konnte in einem Proteinextrakt komplexer Zusammensetzung eine Vielzahl sich deutlich voneinander unterscheidender Enzymaktivitäten nachgewiesen werden, ohne dass jedoch Aussagen über die jeweiligen Reaktionspartner gemacht werden können.

Die WO 01/94924 A2 sowie DE 100 27 794 A1 beschreiben ein Verfahren zur Analyse Enzym-katalysierter Umsetzungen mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Dieses Verfahren ist jedoch lediglich auf die Analyse von Enzym-katalysierten Reaktionen gerichtet, z.B. zur Bestimmung der Enzymkinetik. Die DE 100 27 794 A1 definiert dabei selbst Enzym-katalysierte Umsetzungen als „enzymatische Reaktionen mit ganzen Zellen". Ein ähnliches Verfahren wird auch in der DE 100 44 132 A1 beschrieben, in dem ebenfalls mit ganzen Zellen gearbeitet wird. Aus diesen Druckschriften lassen sich daher keiner Erkenntnisse über einzelne Proteine gewinnen.

Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Aufspüren und zur Identifizierung von Biomolekülen wie beispielsweise Proteinen oder Peptiden, die potentielle Enzymaktivität aufweisen, zur Verfügung zu stellen.

Unter Enzymaktivität im Sinne der Erfindung wird dabei verstanden, dass derartige Biomoleküle wie beispielsweise Proteine oder Peptide in der Lage sind, Biomolekül-Enzym-Komplexe zu bilden, resp. auf ihrer Oberfläche solche Epitope aufweisen, die mit Enzymen reagieren. Ferner, dass nach Auflösen des Komplexes das ursprüngliche Substrat chemisch verändert als Reaktionsprodukt(e) hervorgeht, wobei die Bildung des Produktes auf eine definierte Zeiteinheit bezogen wird. Ferner wird darunter aber auch verstanden, dass die Biomoleküle überhaupt in der Lage sind (ganz generell) Biomolekül-Substrat-Komplexe zu bilden, bei denen das Substrat

kein Enzym, sondern beispielsweise Antikörper, synthetische Stoffe, Medikamente, Phamazeutika etc. sein könenn.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale des Anspruchs 1. Erfindungsgemäß ist danach ein Verfahren zum Erkennen von Enzymaktivitäten von beliebigen Proteinfraktionen vorgesehen, welches aus mehreren aufeinanderfolgenden Verfahrensschritten gekennzeichnet ist, nämlich

a) Gewinnung eines Proteinextrakts. In diesem Verfahrensschritt werden aus biologischen Quellen wie z.B. menschlichem oder tierischen Gewebe oder aus pflanzlichen Zellen Proteine extrahiert.

b) Fraktionierung des Proteinextrakts. Der Proteinextrakt wird über mehrere chromatographische Schritte soweit aufgereinigt, bis individuelle Proteine weitgehend homogen vorliegen. In diesem Verfahrensschritt werden zur Erstellung einer Proteinbibliothek Proben, die aus unterschiedlichen Reinigungsschritten stammen können, getrennt voneinander gesammelt.

c) Teilen der Fraktionen des Proteinextrakts zur Erstellung einer Proteinbibliothek, wobei ein Teil jeder Fraktion distinkt immobilisiert wird (immobilisierte Proteinbibliothek) und der korrespondierende, nicht immobilisierte Teil der Proteinfraktion zur späteren Identifizierung eingefroren wird (gelöste Proteinbibliothek). In diesem Verfahrensschritt wird jede individuelle Probe nach der Fraktionierung in 2 oder mehr Teile aufgeteilt. Ein Teil der Probe wird an Partikel kovalent gebunden. Ein weiterer Teil der Probe wird für die spätere Identifizierung interessierender Proteine eingefroren. Um die voneinander getrennten Proteine in die Proteinbibliothek aufnehmen zu können, werden die Proteine kovalent an Partikel gebunden. Nach dem Binden werden die Partikel von nicht-bindenden Substanzen befreit. Die immobilisierten Partikel werden im Kühlschrank oder Gefrierschrank gelagert. Zur Stabilisierung können den Partikeln geeignete Agentien zugesetzt sein.

d) Aliquots der immobilisierten Proteinfraktionen aus der Proteinbibliothek werden mit einem Substrat inkubiert. Das Substrat wird so ge-

wählt, das es (im Falle der Anwesenheit des gesuchten Proteins) von der gesuchten katalytischen Aktivität des Proteins (Enzyms) chemisch verändert wird und sich über das entstehende Reaktionsprodukt die chemische Reaktion erkennen lässt. Über massenspektrometrische Methoden werden daher letztlich Enzymaktivitäten der immobilisierten Proteine der Fraktionen gemessen.

e) Massenspektrometrische Messung der Proben nach d). Eine solche Messung kann auch mehrmals durchgeführt werden, oder aber in definierten Zeitintervallen. Hierzu werden der Reaktionsmischung Proben entnommen und für massenspektrometrische Analysen (MS) nach im wesentlichen bekannten Techniken vorbereitet. Die Proben der Reaktionsmischungen werden mit der MS analysiert, um die Reaktionsprodukte zu identifizieren.

f) Vergleich der Proben, die Enzymaktivitäten aufweisen mit den Fraktionen nach b). Ein Vorliegen der überprüften katalytischen Eigenschaft im Reaktionsgemisch ist daran erkennbar, dass ein oder mehrere Reaktionsprodukte, die aus dem Substrat durch chemische Umsetzung hervorgegangen sind, nachgewiesen werden können, nämlich durch Vergleich (nicht Substrat-modifizierten) mit den Ausgangssubstanzen. Dies kann mithilfe eines entsprechenden Software-Programms erfolgen.

g) Identifizierung der Proben, die Enzymaktivitäten aufweisen mit den Fraktionen der gelösten Proteinbibliothek nach c). Mit im wesentlichen bekannten proteinchemischen Methoden der Analytik und Sequenzierung können die Proteine, von denen man aufgrund des durchlaufenden Verfahrens (d-f) weiß, dass sie mit dem Substrat reagiert haben, identifiziert werden.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass zur effektiveren Fraktionierung die Verfahrensschritte b) bis e) zyklisiert wiederholt werden können.

Vorteilhaft ist es, die Fraktionen in Fraktionssammelgefäßen oder Multi-Deep-Well Platten (mit n Kavitäten, n > 1) zu sammeln. Das gleiche gilt für die Immobilisierung,

die vorzugsweise in Reaktionsgefäßen oder auf Multi-Well-Platten (mit n Kavitäten, n > 1) erfolgt.

Im Sinne der Erfindung werden unter „Substrate" für die Reaktion mit den immobilisierten Proteinfraktionen in der Natur vorkommende Biomoleküle jeglicher Art, aber auch synthetische organische Moleküle bzw. Hybride von in der Natur vorkommenden Biomolekülen verstanden, beispielsweise - aber nicht ausschließlich - Enzyme, Proteine, Peptide etc.. Die Substrate können zu Substratbibliotheken zusammengefasst werden, wobei solche Substratbibliotheken aus einem Gemisch von mehreren Substraten oder aus einem Substrat (Molekül) mit multifunktionellen Gruppen im Sinn reaktionsspezifischer Gruppen bestehen können.

Die Erfindung setzt sich mithin zum Ziel, ein automatisiertes Plattform-System zu entwickeln, dass aus Proteinextrakten Proteinbibliotheken herstellt, diese auf Enzymaktivitäten durchsucht und die den Aktivitäten zugrundliegenden Enzyme identifiziert. Die Proteinbibliothek entsteht dabei durch Immobilisierung von Proteinfraktionen. Durch die Immobilisierung wird eine Stabilisierung der Enzymaktivitäten und die Fähigkeit zur Langzeitlagerung erreicht sowie die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte ermöglicht. Um Enzyme in der Proteinbibliothek zu finden, werden die immobilisierten Proteine mit den für die gesuchten Enzyme spezifischen Substraten inkubiert. Die Anwesenheit eines gesuchten Enzyms kann dann als wahrscheinlich angenommen werden, wenn die erwarteten Reaktionsprodukte detektiert werden. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgt mit der Massenspektrometrie, wodurch eine hohe Flexibilität in Bezug auf die einsetzbaren Substrate, auf das Erkennen unerwarteter Reaktionsprodukte und ein schnelles Screenen einer Protein-Bibliothek erreicht wird.

Der grundsätzliche erfindungsgemäße Verfahrensablauf sieht wie folgt aus: Ein gegebener Proteinextrakt wird über Vorversuche („Scouting"-Versuche) bezüglich seiner Zusammensetzung charakterisiert, um aus den gewonnenen Daten eine Fraktionierungsstrategie zu entwickeln, die unter Ausnutzung der Kombination mehrerer orthogonaler chromatographischer Trenntechniken (d.h. Trenntechniken, die sich in ihren Trennmechanismen deutlich voneinander unterscheiden), den Erhalt von Fraktionen mit einer möglichst kleinen Zahl von Proteinen ermöglicht. Ein Aliquot einer jeden Proteinfraktion wird für eine eventuelle spätere Identifizierung eingefroren und

gelagert. Durch diese Massnahme besteht auch die Möglichkeit bei Bedarf eine interessierende Fraktion weiteren Reinigungsschritten zu unterziehen. Die Proteinbibliothek der immobilisierten Proteinfraktionen ist so angelegt, dass eine einzelne Fraktion gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate zeitlich unabhängig getestet werden kann. Diese Möglichkeit verlangt, dass die immobilisierten Proteine portioniert aus der Bibliothek entnommen werden können. Die Wahl der Substrate ist vom jeweiligen Screening-Ziel abhängig. Für die Suche nach synthetisierenden oder metabolisierenden Enzymen sind die Substrate naturgemäß definiert. Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgt in der Regel massenspektrometrisch, andere Detektionssysteme wie Bio-Assays lassen sich jedoch ebenfalls verwenden. Sobald das erwartete Reaktionsprodukt detektiert ist und damit die Existenz des gesuchten Enzyms in der untersuchten immobilisierten Proteinfraktion angezeigt hat, wird die entsprechende nicht-immobilisierte Fraktion mit den klassischen Methoden der Proteinanalytik identifiziert. Die Besonderheit des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in dem Verfahrensschritt, die Proteine nach ihrer Reinigung zu immobilisieren. Durch die Immobilisierung werden für das System mehrere unverzichtbare Vorteile erzielt:

1. Die Immobilisierung sorgt für eine Stabilisierung der Proteine. Dieser Effekt wird in der biotechnologischen Anwendung von Enzymen seit etlichen Jahren genutzt (Tischer, W. and Kasche, V. (1999), Trends in Biotechnology 17, 326).

2. Die Immobilisierung ermöglicht zusätzlich eine Langzeitlagerung, die für den Aufbau und die Verwendung von Proteinbibliotheken notwendig ist. Die Neuheit des Systems besteht in dem Ansatz, entstandene Reaktionsprodukte durch direkte massenspektrometrische Analyse (ESI- oder MALDI-MS) der Inkubationslösungen nachzuweisen. Dieser direkte Nachweis wird erst durch die Immobilisierung der Proteine möglich.

3. Die Immobilisierung der Proteine verhindert Signalintensitätseinbußen der massenspektrometrischen Analysen durch die Abwesenheit der Proteine.

4. Die Immobilisierung der Proteine ermöglicht enzymatische Reaktionen in salzfreier wässriger Lösung, einer sehr wichtigen Bedingung für den direkten

Nachweis der Reaktionsprodukte aus der Inkubationslösung mit der Massenspektrometrie.

5. Die Kombination der Immobilisierung der Proteine mit der Massenspektrometrie erlaubt die Miniaturisierung des Nachweissystems: Für einen einzelnen Reaktionsansatz sind jeweils nur einige wenige Gelpartikel und Substratlösungen < 1 µl realisierbar.

Den Gelpartikeln, an denen die Proteine immobilisiert werden, kommt deshalb im Rahmen der Erfindung eine zentrale Bedeutung zu. Durch die Entwicklung magnetischer Gelpartikel soll die automatisierte Herstellung und Handhabung der Proteinbibliothek vereinfacht werden. Im Vergleich zu herkömmlichen Systemen zum Nachweis von Enzymaktivitäten besteht der besondere Vorteil der Erfindung in ihrer breiten Anwendbarkeit in Bezug auf die Substrate, da keine Festlegung auf fluoreszierende Substrate, Substrate mit UV-absorbierenden Gruppen oder Isotopenmarkierte Substrate erfolgt, sondern mit underivatisierten, nicht-radioaktiven Original-Substraten gearbeitet werden kann. Hierdurch wird der Gefahr vorgebeugt, dass die Substrate aufgrund sterischer Veränderungen, die durch Derivatisierung entstehen, von ihren Enzymen nicht mehr erkannt werden oder das falsch positive Ergebnisse dadurch entstehen können, dass die mit Chromophoren derivatisierten Modellsubstrate an anderen als den erwarteten chemischen Bindungen umgesetzt (z.B. gespalten) werden. Durch den Nachweis der Reaktionsprodukte mit der Massenspektrometrie ist im Vergleich zu anderen Methoden wie der HPLC der Vorteil der Eindeutigkeit bei der Identifizierung der Reaktionsprodukte gegeben. Identische Retentionszeiten der HPLC können auch von nicht-identischen Substanzen verursacht werden. Der Einsatz der Massenspektrometrie ermöglicht eine schnelle automatisierbare Analyse auch größerer Probenmengen. Die Geschwindigkeit der Analysen kann durch Inkubation der immobilisierten Proteine mit mehreren Substraten gleichzeitig zusätzlich beschleunigt werden. Auch dieser Vorteil wird erst durch den Einsatz der Massenspektrometrie möglich.

Ein weiterer besonderer Vorteil gegenüber jeder bisher entwickelten Methodik besteht in der Möglichkeit, nicht nur die Anwesenheit eines gesuchten Proteins mit bekannten Reaktionsprodukten zu erkennen, sondern im Fall neu entstandener unerwarteter Reaktionsprodukte auch Proteine aufzuspüren, deren katalysierte Reak-

tion bisher nicht bekannt war. Dieser Vorteil ist insbesondere für die Untersuchung der Metabolisierung von neuen Wirkstoffen und die Identifizierung der zugehörigen Enzyme sowie für die Erkundung neuer Stoffwechselwege von Interesse. Durch die Besonderheit der Proteinbibliothek, nämlich die Immobilisierung der Proteine auf magnetischen Partikeln, die in 96well Platten abgelegt und gelagert werden können, ist das System nicht ausschließlich auf die Massenspektrometrie fixiert, sondern offen für beliebige andere Systeme zum Nachweis von Reaktionsprodukten, einschließlich Systemen zum Nachweis biologischer Wirkung. Da die Inkubation der Substrate mit den immobilisierten Proteinen in salzfreien Medien funktioniert, ist eine ideale Kompatibilität zu Bio-Assays gewährleistet. Viele Bio-Assays zeigen unter nicht-physiologischen Bedingungen, wie sie durch begleitende Salze entstehen können, falsch-positive Ergebnisse.

Aus einem komplexen Proteinextrakt wird durch Fraktionierung und anschließende Immobilisierung der gereinigten Proteine eine Proteinbibliothek hergestellt, die anschließend mit geeigneten Substraten nach verschiedenen Enzymaktivitäten durchsucht wird. Die jeweils zu trennenden Proteinextrakte werden so groß gewählt, dass auch nach mehrfachen Fraktionierungsschritten eine für die Immobilisierung und Identifizierung ausreichend große Proteinmenge erhalten bleibt; eine absolute Menge der Proteine im Extrakt von 10 – 100 g hat sich dabei als zweckdienlich erwiesen.

Die Erstellung der Proteinbibliotheken erfolgt durch schonende Fraktionierung von Proteinextrakten. Hierzu werden größere Proteinextrakte im Grammbereich mit wenigen Trennschritten soweit aufgetrennt, dass in den einzelnen Proteinfraktionen eine möglichst kleine Zahl von Proteinen zu finden ist. Dies wird durch die Anwendung einer besonderen Form der Displacement-Chromatographie (Sample-Self-Displacement) erreicht.

Die gereinigten Proteine werden an Affinitätschromatographiegel-Partikel immobilisiert. Um die immobilisierten Proteine einfach handhaben und automatisieren zu können, werden ferner auch magnetische Gelpartikel für die Immobilisierung verwendet, die eine geeignete Geloberfläche aufweisen, die eine möglichst hohe Enzymaktivität gewährleisten. Die Gelpartikel werden durch Immobilisierungs-, Wasch-, Dosier- und Inkubationsschritte bewegt, vorzugsweise automatisiert. Diese Auto-

matisierung sorgt vorteilhaft gleichzeitig dafür, dass für die nachfolgenden massenspekrometrischen Messungen, MALDI-Probenträger oder ein Elektrospray-Injektionssystem beschickt werden; damit liegt ein automatisiertes Interface zum Massenspektrometer vor. Die Analyse der Reaktionsprodukte mit der Massenspektrometrie (z.B. MALDI- oder ESI-MS) nach Inkubation der Substrate mit den immobilisierten Proteinen erfolgt ebenfalls automatisiert und die gewonnenen Daten werden über eine korrespondierende Software verwaltet und ggf. ausgewertet. Fraktionen mit Enzymaktivität werden mit proteinchemischen Methoden auf Reinheit geprüft und identifiziert. Dazu werden die gewonnenen Fraktionen auf Einheitlichkeit mit Techniken wie der 2D-Elektrophorese oder der Mikrobore-HPLC analysiert und die entsprechenden Fraktionen per MALDI-MS und LC-ESI-MS/MS oder dem Edman-Abbau identifiziert. Große Proteine werden per 1DE-SDS-Gel nachgereinigt und analysiert; basische Proteine können mittels einer für ribosomale Proteine entwickelten Technik überprüft werden (Koc EC, Burkhart W, Blackburn K, Koc H, Moseley A, Spremulli LL. Protein Identification of four proteins from the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome using a proteomics approach. Protein Sci. 2001 Mar;10(3):471-81).

Das automatisierte System zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst folgende Komponenten: Ein System („Scouting"-System) zur Erkundung der Zusammensetzung des Extrakts, welches Daten für die Kombination der Reinigungsschritte liefert, ein mehrdimensionales Chromatographie-System zur Fraktionierung der Proteinextrakte, einen Roboter zur Immobilisierung der Proteine, zur automatischen Inkubation von Substraten mit Fraktionen der immobilisierten Proteine sowie zum Transfer der Reaktionsprodukte zum Massenspektrometer, einem Massenspektrometer und einem Datenverarbeitungssystem.

Als Quelle für den Proteinextrakt werden in den untenstehenden Beispielen Schweine-Nieren gewählt. Diese Wahl hat den Vorteil, dass die notwendigen Organe über Schlachthöfe in ausreichender Menge besorgt werden können. Als Organ wird die Niere eingesetzt, weil sich mit diesem Organ konkrete wissenschaftliche Fragestellungen verbinden lassen (beispielsweise Suche nach Angiotensin II- und Urotensin-generierenden Enzymen). Diese Fragestellung ist insofern für das Projekt als Modell für die Evaluierung des Systems interessant, als der Nachweis der Enzymaktivitäten über den massenspektrometrischen Nachweis der Reaktionsprodukte (Angio-

tensin I bzw. Angiotensin II; Urotensin) nach Inkubation von Reninsubstrat bzw. Pro-Urotensin mit immobilisierten Proteinfraktionen geführt werden kann. Die Wahl der Niere als Quelle für die Proteine ist auch deshalb von Vorteil, weil dieses Gewebe bekanntermaßen Renin synthetisiert. Als Kontrolle für die Funktionsfähigkeit der Erfidung soll das Aufspüren und die Identifizierung von Renin dienen. Renin, eine in der Niere gebildete spezifische Protease, katalysiert die Hydrolyse von Reninsubstrat, bei der Angiotensin I als Reaktionsprodukt entsteht.

Ein effektives Chromatographiesystem, mit dem es gelingt, Proteinextrakte möglichst schnell und schonend in seine Einzelbestandteile aufzureinigen wird durch a) die systematische Suche („Scouting"-Experimente) nach geeigneten Parametern für die chromatographische Trennung des Proteinextraktes und b) durch die Kombination unterschiedlicher Chromatographiesäulen (Affinitäts-, Ionenaustausch-, Größenausschluß-, Hydrophobe-Interaktions-, Hydroxylapatit, Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts- und Reversed-Phase-Chromatographie) erreicht, die auf orthogonalen Trennprinzipien basieren. Einzelne Fraktionen werden durch Techniken wie Säulenschalten direkt an die jeweils folgende Chromatographiesäule weitergegeben, ohne dass die Proteinfraktionen das System verlassen, sprich in Fraktionsgefäßen zwischengelagert werden müssen. Um Verdünnungen der Proteinfraktionen zu vermeiden, werden weitgehend Adsorptionschromatographie-Medien eingesetzt. Die Anwendung der Displacement-Chromatographie-Technik gewährleistet ebenfalls konzentrierte Proteinfraktionen. Die Fraktionierungsstrategie beinhaltet folgende Schritte: Nach dem Anlegen eines Proteinextraktpools, der groß genug ist, um eine Vielzahl von Fraktionierungsexperimenten mit identischen Proben durchzuführen, wird dieser Pool bezüglich seiner Protein-Zusammensetzung und enzymatischen Aktivitäten charakterisiert („Scouting"-Experimente). Durch SDS-PAGE-Elektrophoresen, isoelektrische Fokussierungen und 2D-Elektrophoresen wird als erstes ein detailliertes Bild über die im Extrakt vorhandenen Proteine gewonnen. Diese Daten dienen der weiteren Planung der Fraktionierung, wobei der Proteinextrakt nicht nur in seine Komponenten getrennt werden soll, sondern die gereinigten Proteine auch ihre enzymatischen Aktivitäten nicht verlieren dürfen. Die Eluate der Chromatographiemedien werden zusätzlich mit Elektrophoresen untersucht, um die Effektivität und Selektivität der jeweiligen chromatographischen Parameter zu dokumentieren. Zur Überprüfung des Einflusses der chromatographischen Schritte auf Enzymaktivitäten sollen gängige Substrate für verschiedene Enzyme eingesetzt werden. Die Enzym-

kinetiken werden mit Methoden der UV-Spektroskopie und der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Der Einsatz dieser Techniken ist notwendig, um die Aktivitäten nicht nur nach sondern auch vor der Immobilisierung messen zu können. Über den Vergleich der Enzymkinetiken vor und nach Immobilisierung sind Aussagen über den Einfluss der Immmobilisierung auf die Enzymaktivitäten möglich.

Die Problematik beim Erstellen / Aufbau der Proteinbibliothek ist, Proteinextrakte mit dem Ziel zu fraktionieren, eine möglichst effektive Trennung der Proteine mit hoher Auflösung zu erreichen – unter gleichzeitigem Erhalt möglichst vieler enzymatischer Aktivitäten. Aliquots der chromatographisch gewonnenen Fraktionen müssen nach erfolgreicher Trennung für die Proteinbibliothek immobilisiert werden.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der immobilisierten Protein-Substrat-Komplexe zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der Proteine werden mit den Methoden der MALDI-Massenspektrometrie durchgeführt, insbesondere mit einem Reflektor-MALDI-Massenspektrometer. Sowohl die Arbeitsschritte zur Immobilisierung als auch der massenspektrometrische Nachweis enzymatischer Aktivitäten sollen möglichst weitgehend automatisiert werden, lassen sich gegebenenfalls aber natürlich auch „manuell" (ohne Automatismus) durchführen.

Ferner ist im Rahmen der Erfindung vorgesehen, dass die Proteinbibliotheken ohne Verlust der enzymatischen Aktivitäten langzeitgelagert werden können. Dabei ist es gleichgültig, auf welche Weise die Proteine immobilisiert sind, als beispielsweise aktivierte Affinitätschromatographie-Gele oder auf magnetischen Gelpartikel. Derartige magnetische Gelpartikel, sogenannte Magnetobeads werden beispielsweise von der Fa. chemagen angeboten (siehe www.chemagen.de). Die Kupplungschemie zwischen Magnetobeads und nicht-Magnetobeads ist im wesentlichen bekannt. Der Vorteil der Verwendung von Magnetobeads liegt in der leichter zu automatisierenden Handhabung der Partikel mithilfe von Elektromagneten.

Vorteile des erfindungsgemäßen automatisierten Massenspektrometrie-unterstützten System zum Screenen von Proteinbibliotheken auf enzymatische Aktivitäten (MESS) liegen in folgendem:

- Die Erfindung erweist sich als vorteilhaft für die funktionelle Proteomforschung im Sinn eines Vergleichs zweier verschiedener Lebenszustände (Profiling von Enzymaktivitäten mit zu entwickelnden Substratbibliotheken multifunktioneller Sonden), sowie für die Suche nach neuen Enzymen für die Synthese von Biomolekülen (mit bekannten Biomolekülen als Substrate), für die Metabolisierung von Molekülen (Substrate: Biomoleküle, Wirkstoffe) und für die organische Synthese (Substrate: Synthesebausteine); Vorteile liegen sowohl in der Forschung als auch in der Industrie. Neben der Möglichkeit die Erfindung für die systematische funktionelle Proteomforschung zu nutzen, wird auch die Brücke zur Pharmaco-Genomics- und zur Metabolomics-Forschung geschlagen, da neue Wirkstoff-relevante Enzyme erkannt und Stoffwechselwege mit der Erfindung untersucht werden können.

- Es erlaubt der Proteomforschung eine systematische Suche nach funktionsrelevanten Proteinen.

- Es stellt eine Methode zum Aufspüren von Enzymen dar, deren biologisches Erkennungsprinzip durch ihre Substratspezifität gegeben ist. Als Beispiel für Anwendungen kann die Suche nach Enzymen genannt werden, mit denen die spezifische Detektion eines gegebenen Analyten durchgeführt werden soll. Ferner können mithilfe der Erfindung Synthesewege und Metaboliten in Zellsystemen verfolgt werden.

- Das System lässt sich sowohl zur gezielten Suche nach Enzymen für die Umsetzung eines gegebenen Stoffes als auch zur Erkundung natürlicher Synthesewege nutzen.

- Die Erfindung dient als Werkzeug für die Suche nach neuen Enzymen für sämtliche biotechnologischen Bereiche, in denen Enzyme eingesetzt werden. Hierzu zählt die pharmazeutische Industrie (Suche nach neuen Targets (Enzymen) für die Wirkstoffentwicklung, Suche nach neuen Enzymen für die Synthese von Wirkstoffen, Entschlüsselung der Metabolisierung neuer Wirkstoffe, Entwicklung neuer Diagnostika), die Lebensmitteltechnologie (Suche nach neuen Enzymen für die Aufbereitung und Herstellung von Nah-

rungsmitteln und Nahrungsmittelbausteinen, Entwicklung Enzym-basierter Analytik) und die chemische Industrie (Suche nach Enzymen für die Synthese von Substanzen, Suche nach Enzymen für die Umsetzung von Abfallstoffen, Entwicklung Enzym-basierter Analytik).

Da an jeder Lebensäußerung einer Zelle Enzyme beteiligt sind, angefangen vom Stoffwechsel, über die Steuerung und Kommunikation bis zur Reproduktion, wird die systematische Erforschung von Enzymaktivitäten und der zugehörigen Enzyme zum besseren Verständnis von Lebensfunktionen beitragen. Als Werkzeug zur Suche nach Enzymaktivitäten unbekannter Enzyme dient die Erfindung zur funktionellen Proteomforschung. Durch Multiplex-Screening mit multifunktionellen Substraten oder/und Substratgemischen / Substratbibliotheken ist es möglich, Profile von Enzymaktivitäten von zwei zu vergleichenden Systemen zu erstellen. Mit der Erfindung lassen sich Proteinbibliotheken von jeder prokaryoten oder eukaryoten Zelle (bzw. deren Zellkulturen), jeder Zellkultur menschlicher oder tiericher Zellen, jedem menschlichen oder tierischen Organ oder jeder erdenklichen Pflanze anlegen, die gegen Substratbibliotheken auf Enzymaktivitäten durchsucht werden können. Als Substrate können sowohl bekannte als auch unbekannte Substanzen oder Gemische dienen. Die Erfindung weist ein großes Anwendungspotential auf und erstreckt sich von der Biochemie der Mikroorganismen über die Biochemie der Pflanzen bis zur klinischen Grundlagenforschung. Eine weiteres für die Life-Science Forschung wichtiges Anwendungsgebiet ist durch die Möglichkeit gegeben, Stoffwechselwege verfolgen zu können, da nicht nur unbekannte Enzyme aufgespürt und identifiziert werden, sondern gleichzeitig auch neue unbekannte Metaboliten erkannt werden können.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen beschrieben; die Erfindung wird nachfolgend auch anhand von Ausführungsbeispielen und Figuren näher beschrieben. Es zeigt:

Figur 1 Nachweis von Kallikrein-Aktivität mittels Massenspektrometrie: Massenspektrum der Reaktionslösung der Inkubation von Kallikrein (Fa. Sigma), gebunden an Partikel, mit Kallikrein-Substrat (10^{-5} mol/l), nach 30 min Inkubation. Die Signale entspre-

chen einfach geladenen protonierten Molekülionen ($[M+H]^+$-Ionen). Saralasin: Interner Standard (10^{-5} mol/l).

Figur 2 Abhängigkeit der relativen Signalintensität von Lys-Bradykinin (Signalintensität von Lys-Bradykinin : Signalintensität)

Figur 3 Nachweis von Urotensin-generierender Aktivität aus einer Proteinfraktion: Massenspektrum eines Reaktionsgemisches einer Inkubation einer an Partikel gebundenen Proteinfraktion aus Nierengewebe mit einem Urotensin-Substrat nach 4 h Inkubationszeit. Externer Standard: Saralasin.

Ausführungsbeispiele:

Herstellung von Proteinextrakten:

Für die Herstellung von Proteinextrakten werden Nieren von Schweinen verwendet. Direkt nach ihrer Entnahme im Schlachthof werden diese in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl-Lösung) bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt. Das Nierengewebe wird (bei Temperaturen von 4 bis 6°C) in ca. 1 cm^3 große Stücke geschnitten, in vorgekühlte Lyophilisationsgefäße gefüllt, in Flüssigstickstoff eingefroren und über Nacht bei –80°C gelagert. In einer Lyophilisationsanlage werden die Gewebestücke ca. eine Woche 1 Woche vollständig getrocknet. Die wasserfreien Gewebestücke werden dann mit einer Getreidemühle auf feinster Stufe pulverisiert. 10 g des Pulvers werden in 200 ml Puffer (20 mM Hepes Puffer in 50 % destilliertes Wasser, 50 % Glycerol,10^{-4} M Dithiothreitol, pH-Wert 7,4) gelöst. Hierfür wird ein Homogenisator verwendet.

Fraktionierung von Proteinextrakten:

Um geeignete Schritte für die Fraktionierung des Proteinextrakts zu finden, werden a) Fällungsversuche und b) Batch-Versuche (Scouting-Versuche) mit verschiedenen

für die Chromatographie von Proteinen anwendbare Gelmaterialien (z.B. Ionenaustauscher-Gele, Gele für die hydrophobe Interaktionschromatographie, etc.) durchgeführt. Aliquots der resultierenden Fraktionen werden auf ihre Proteinkonzentration mit einem Bradford-Assay und auf ihre Zusammensetzung mit der SDS-PAGE-Elektrophorese analysiert. Zum Nachweis enzymatischer Aktivitäten werden nach jedem Schritt bzw. von jeder Fraktion Proben genommen. Aus den gewonnen Daten werden dann Kombinationen von Reinigungsschritten gebildet, um Fraktionen zu erhalten, die individuelle Proteine möglichst hoher Reinheit enthalten. Die Kombination der Schritte ist abhängig von den Zielen, die mit der Reinigung verfolgt werden. Grundsätzlich können zwei unterschiedliche Ziele verfolgt werden, nämlich 1.) die gezielte Reinigung eines einzigen Enzyms oder 2.) eine hochauflösende Fraktionierung unter Erhalt einer Vielzahl von Aktivitäten. Die chromatographischen Reinigungsschritte werden so kombiniert, das Proteinfraktionen erst nach dem letzten Reinigungsschritt das Chromatographie-System verlassen und in Sammelgefäßen (Deep-Well-Platten) gesammelt werden. Aliquots der Fraktionen werden für die Rücklage-Systeme aliquotiert.

Bindung der Proteine an Partikel:

Die Kupplung der Proteinen an Partikel erfolgt beispielsweise entsprechend Hermanson et al. (Academic Press, 1992), 53-56). In dieser Vorschrift werden zur Bindung von Proteinen an Partikel Bromcyan-aktivierte Partikel (Fa. Amersham) eingesetzt. Die Partikel werden in der vierfachen ihrer eigenen Menge 1 mM HCl (pH 2-3) gelöst. Das gequollene Gel wird mehrmals mit dem 100-fachen des eigenen Volumens mit HCl gespült. Dann wird es mit dem 5-10-fachen des eigenen Volumens mit Wasser gewaschen. Anschließend wird mit 5 ml Kopplungspuffer A (0,1 M $NaHCO_3$-Puffer in 0,5 M NaCl, pH 8,3) pro Gramm trockenem Gel gewaschen und anschließend sofort das zu koppelnde Protein, gelöst im Kopplungspuffer A (5-10 mg Protein pro ml Gel), zum Gel zugegeben und unter ständigem Umschwenken über Nacht bei 4°C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundenes Protein wird durch Spülen mit Kopplungspuffer A entfernt. Dann werden nicht gebundene aktive Gruppen des Gels mit Glycin blockiert. Dazu wird das Gel mit dem 2 bis 3-fachem des Gelvolumens an Kopplungspuffer B (0,2 M Glycin-Puffer in Kopplungspuffer A) bei Raumtemperatur zwei Stunden oder bei 4°C über Nacht unter ständigem Umschwenken inkubiert. Es wird 3 mal abwechselnd mit Tris-HCl

Puffer, pH 8,0 und Na-Acetat-Puffer, pH 4 gespült. Die Lagerung des fertigen Gels erfolgt bei 2-8°C in 0,02%iger Natriumazidlösung.

Messung der enzymatischen Aktivität mittels Massenspektrometrie:

Um Aussagen über die enzymatischen Aktivitäten individueller Fraktionen treffen zu können, muss die individuelle Fraktion mit einem Substrat inkubiert werden, das durch die nachzuweisende Aktivität chemisch verändert wird. (Im Beispiel der Fig. 1a: Proteolytische Spaltung von Kallikrein-Substrat durch Kallikrein zum Reaktionsprodukt Lys-Bradykinin). Der Nachweis der Aktivität gelingt über den massenspektrometrischen Nachweis des resultierenden Reaktionsprodukts. Um die Reaktionsprodukte einer enzymatischen Aktivität einer massenspektrometrischen Messung mit der Elektrospray- (ESI-) oder der MALDI-MS zugänglich zu machen, muss die zu analysierende Probe weitgehend von Salzen und anderen niedermolekularen Substanzen befreit sein. Diese Bedingung kann erfüllt werden, wenn a) die Komponenten der Fraktionen zuvor an Partikel gebunden werden und von Salzen befreit werden und b) die Substrate in hochreinem Wasser gelöst werden und in dieser Lösung die Inkubation stattfindet. Die Reaktionsprodukte können dann direkt ohne weitere Probenvorbereitung massenspektrometrisch analysiert werden.

Im hier angegebenen Beispiel der Fig. 1 wurde eine Kallikrein-Präparation an Partikel gebunden und mit Kallikrein-Substrat inkubiert. Nach einem definierten Zeitintervall (30 min) wird ein Aliquot der Reaktionslösung (1,5 µl) abgenommen und auf die Oberfläche eines metallenen Ankertellers (Fa. Bruker) pipettiert. Anschließend werden 1,5 µl der UV-absorbierenden Desorptionsmatrix Hydroxy-α-cyano-Zimtsäure (gesättigt in ACN/H_2O (50/50) mit 0,1% Trifluoressigsäure) hinzugegeben. Nach Kristallisation der Probe auf dem Probenteller wird dieser über eine Vakuumschleuse in das Massenspektrometer (Reflex III, Fa. Bruker) gebracht. Durch den Impuls eines Stickstoff-Laserstrahl (VSL-337 ND, Laser Science, Wellenlänge 337 nm, Impulsdauer 4 ns, Energie 10^6-10^7 W/cm^2, Durchmesser des Bestrahlungsfeldes 50 – 100 µm) erfolgt die Desorption der Probenionen. Die Beschleunigungsspannung U_{acc} im elektrostatischen Feld betrug 10 kV, der im System vorliegende Druck 6-8 x 10^{-7} mbar. Die Aufzeichnung der Massenspektren wird mit einem LeCroy 9400 Transientenrecorder durchgeführt. Bei der Detektion werden 200 Spektren summiert.

Als weiteres Beispiel wird der massenspektrometrische Nachweis einer Urotensin-generierenden Aktivität dargestellt. Als Substrat wird ein Peptid (Urotensin-generierendes-Enzym-Substrat) mit der Sequenz RIKKPYKKRGPPSECFWKY (2430,3 Da) in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l in HPLC-reinem Wasser gelöst. Im Fall der Anwesenheit einer Urotensin-generierenden Aktivität entsteht GPPSECFWKY (hier "Urotensin" genannt). Im Massenspektrum ist dann ein Signal der Masse 1214,33 Da zu erkennen (siehe Fig. 3). Dieses Signal entspricht dem einfach protonierten Ion eines Urotensin-ähnlichen Peptids. Aus dem Rücklagesystem 1 wird ein Aliquot der an Partikel gebundenen Proteine entnommen und mit der Urotensin-generierendes-Enzym-Substrat-Lösung inkubiert. Nach einem definierten Zeitintervall wird ein Aliquot der Reaktionslösung (1,5 µl) abgenommen und auf die Oberfläche eines metallenen Ankertellers (Fa. Bruker) pipettiert. Anschließend werden 1,5 µl der UV-absorbierenden Desorptionsmatrix Hydroxy-α-cyano-Zimtsäure (gesättigt in ACN/H_2O (50/50) mit 0,1% Trifluoressigsäure) hinzugegeben. Nach Kristallisation der Probe auf dem Probenteller wird dieser über eine Vakuumschleuse in das Massenspektrometer verbracht und die Probe analysiert, wie oben angegeben.

Berechnung der relativen Enzymaktivität:

Die relative Enzym-Aktivität wird hier definiert als Menge des Reaktionsprodukts, die pro Zeiteinheit entsteht:

$$\text{relative Enzymaktivität} = \frac{rel.Int_{t2} - rel.Int_{t1}}{t_2 - t_1}$$

$rel.Int_{t1}$: relative Intensität des Analyten, bezogen auf den internen Standard, bezogen auf den Inkubationszeitraum t_1.

Bei der Quantifizierung von Analyten (Reaktionsprodukten) mit dem MALDI-Massenspektrometer tritt das folgende Problem auf: Das Signal der MALDI-MS ist abhängig vom Ort, den der Laser auf der kristallisierten Probe trifft. Bedingt durch die nicht gleichmäßige Ausrichtung der Kristalle zum Laser, variiert die Strahlungsenergie, die der vom Laser getroffene Bereich absorbiert. Als Folge werden bei der wiederholten Messung einer einzigen Probe unterschiedliche Intensitäten der Signa-

le aufgrund der unterschiedlichen Intensität der absorbierten Strahlungsenergie detektiert. Infolge dessen ist häufig bei Einzelspektren kein direkter Zusammenhang zwischen Signal-Intensität und Analyt-Konzentration zu erkennen.

Das Problem wird durch folgende Maßnahmen umgangen: Die Probe wird durch ein automatisiertes Verfahren gemessen, bei dem der Laser der MALDI-MS nach vorgeschriebenen Bahnen die Probe beschießt, um Bereiche zu finden die eine optimale Ausbeute an Signalintensität gewährleisten. Sobald ein Signal detektiert ist, wird automatisch die Laserintensität optimiert. Pro Bereich wurden in diesem Beispiel maximal 60 Impulse des Lasers auf die Probe gegeben. Wurde vor Erreichen der 60 Impulse kein Signal mehr detektiert, wird automatisch ein neuer Bereich auf der Probe gesucht. Für ein Gesamtspektrum wurden 200 Spektren summiert und gemittelt. Als weitere Maßnahme zur Gewährleistung, dass Signalintensität und Analyt-Konzentration sich proportional zueinander verhalten, wird ein externer Standard der Matrix Saralasin (10^{-5} M bis 10^{-10} M) zugegeben. 1,5 µl Lösung der Standard-Matrix-Mischung werden dann anschließend mit 1,5 µl Löung des Analyten (hier Lys-Bradykinin) vermischt wird. Nach der MS-Analyse wird der Quotient der relativen Intensität der Saralasinkonzentration und der relativen Intensität der Reaktionsprodukt-Konzentration bestimmt. Fig. 2 gibt das Verhältnis der relativen, d.h. auf den internen Standard bezogenen Signalintensität von Lys-Bradykinin zur Konzentration des Analyten wieder.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erkennen von Enzymaktivitäten von beliebigen Proteinextrakten, bestehend aus folgenden Verfahrensschritten:

   a) Gewinnung eines Proteinextrakts,

   b) Fraktionierung des Proteinextrakts,

   c) Teilen der Fraktionen des Proteinextrakts zur Erstellung einer Proteinbibliothek, wobei ein Teil jeder Fraktion distinkt immobilisiert wird (immobilisierte Proteinbibliothek) und der korrespondierende, nicht immobilisierte Teil der Proteinfraktion zur späteren Identifizierung eingefroren wird (gelöste Proteinbibliothek),

   d) Immobilisierte Proteinfraktionen der immobilisierten Proteinbibliothek werden mit einem Substrat inkubiert,

   e) Massenspektrometrische Messung der Proben nach d),

   f) Vergleich der Proben, die Enzymaktivitäten aufweisen mit den Fraktionen nach b),

   g) Identifizierung der Proben, die Enzymaktivitäten aufweisen mit den Fraktionen der gelösten Proteinbibliothek nach c).

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Verfahrensschritte b) bis e) zyklisiert wiederholt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Proteinextrakt über ein multidimensionales Chromatographie-System gereinigt und fraktioniert wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 3, wobei die Fraktionen in Fraktionssammelgefäßen oder Multi-Deep-Well Platten (mit n Kavitäten, $n > 1$) gesammelt werden.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Partikel der einzelnen Fraktionen durch kovalente Bindung an geeignete Immobilisierungssubstanzen immobilisiert werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Immobilisierung an magnetische Beads oder Affinitätschromatographie-Gele erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Immobilisierung in Reaktionsgefäßen oder auf Multi-Well-Platten (mit n Kavitäten, n > 1) erfolgt.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als Substrate natürliche Biomoleküle jeglicher Art, aber auch synthetische organische Moleküle bzw. Hybride von in der Natur vorkommenden Biomolekülen verwendet werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei als Substrate auch Substratbibliotheken, bestehend aus einem Gemisch von mehreren Substraten verwendet werden.

10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, wobei die Verfahrensschritte b) bis g) automatisiert werden.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, wobei die massenspektrometrische Messung der Proben nach Verfahrensschritt e) in definierten Zeitintervallen erfolgt.

12. Verfahren nach den Anspruch 1 oder 8, wobei Verfahrensschritt e) ein- oder mehrfach wiederholt wird

Fig. 1

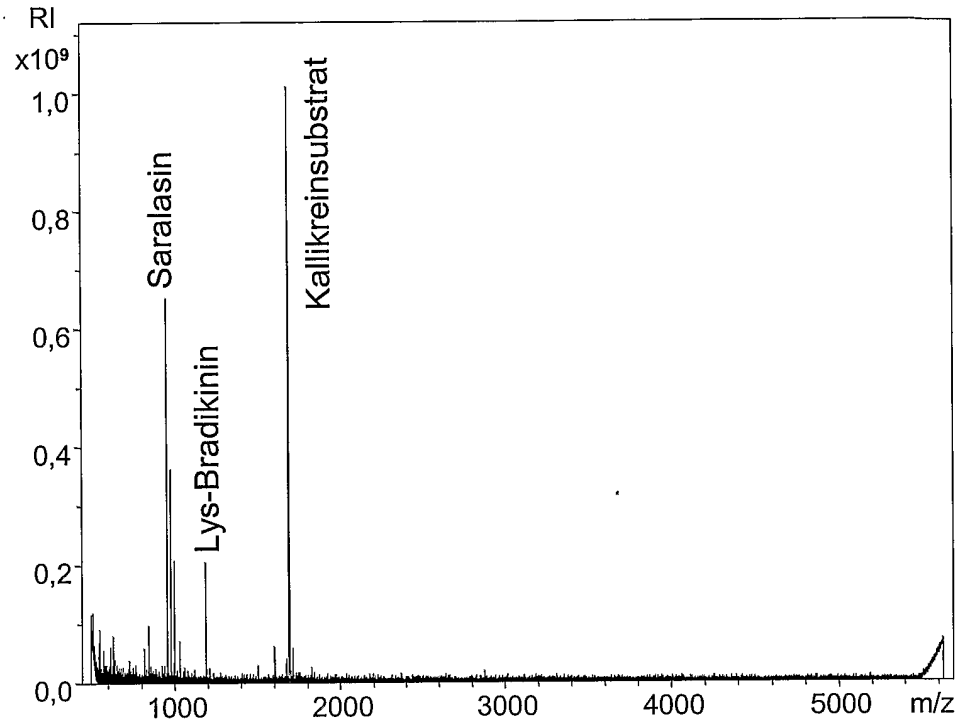
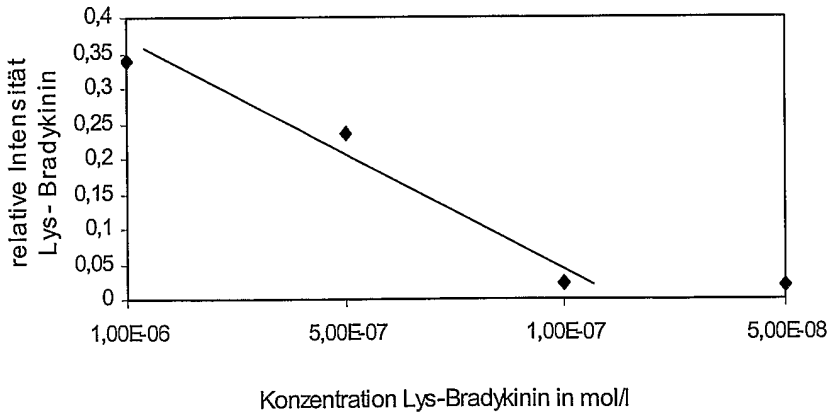

RI
x10⁹
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Saralasin
Lys-Bradikinin
Kallikreinsubstrat
1000
2000
3000
4000
5000
m/z

Fig. 2


relative Intensität Lys- Bradykinin
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
1,00E-06
5,00E-07
1,00E-07
5,00E-08
Konzentration Lys-Bradykinin in mol/l

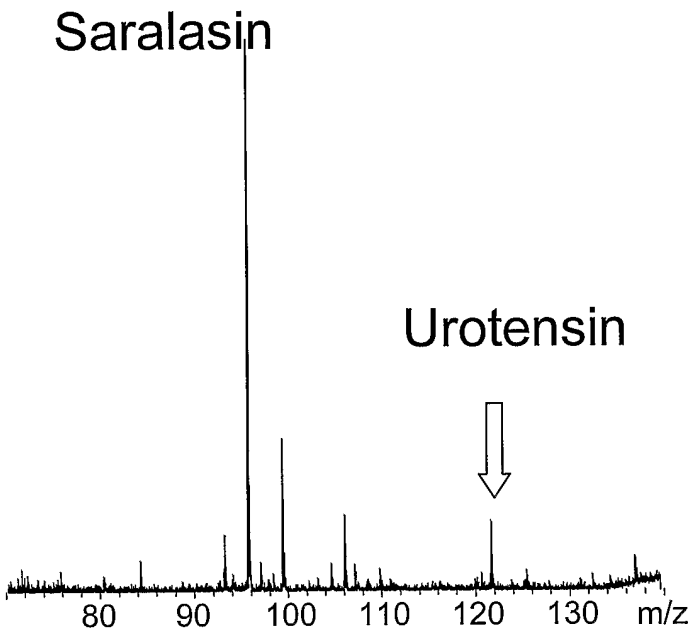



Fig. 3