

Zusammenfassung der wissenschaftlichen Ergebnisse zur Dissertation

Investigations of enzymatic reactions using mass spectrometry

der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der
Universität Leipzig

eingereicht von

Diplom-Biochemiker Gunter G. C. Kuhnle

angefertigt am Institut für Biochemie

Juni 2001

Ziel und Problemsituation

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine anerkannte Methode zur Untersuchung von Biopolymeren wie Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden oder Polysacchariden, ebenso wie zur Charakterisierung von Naturstoffen. Dennoch gibt es nur wenige Anwendungen zur Untersuchung enzymatischer Reaktionen mit Hilfe der besonderen Eigenschaften dieser Technik. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Methoden für die massenspektrometrische Untersuchung enzymatischer Reaktionen, insbesondere mit Elektrospray-Ionisation (ESI) Massenspektrometrie und MALDI Massenspektrometrie.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag in der Entwicklung von Methoden zur weiteren Untersuchung des Enzyms Ribonuklease T₁ (RNase T₁, EC 3.1.27.3), da die bisher etablierten Methoden nicht ausreichende Möglichkeiten zur Untersuchung von länger-kettigen Substraten, erhöhten Substratkonzentrationen und alternativen Substraten bieten. Weiterhin sollten Methoden entwickelt werden, die eine schnelle und einfache Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften von Ribonuklease T₁ in Bezug auf eine geänderte Spezifität erlauben und sich zur Kombination mit semi-rationalen Methoden des Protein-Designs eignen.

Ergebnisse

Es wurden drei Methoden zur Untersuchung enzymatischer Reaktionen mit massenspektrometrischen Techniken entwickelt und ihre Leistungsfähigkeit am Beispiel von Ribonuklease T₁ (wildtyp) und einer Variante gezeigt. Zur Durchführung der *online* Untersuchungen wurde eine nano Elektrospray Ionenquelle entwickelt.

1. Zur Bestimmung von enzymkinetischen Parametern wurde eine *offline* Methode entwickelt. Bei dieser Methode werden regelmäßig Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen und massenspektrometrisch untersucht. Der Einsatz der Massenspektrometrie erlaubt die Untersuchung auch von komplexen Reaktionsgemischen ohne vorherige Trennung, wie z. B. HPLC, wodurch eine bessere Zeitauflösung der Meßpunkte erreicht werden kann. Durch den Einsatz eines Autoinjektors und Programmen zur automatischen Datenverarbeitung, die in dieser Arbeit entwickelt wurden, läßt sich diese Technik auch zum Durchmustern (*screenen*) von Enzym-Bibliotheken z. B. im Hinblick auf Änderungen der Spezifität verwenden.

Um die Fähigkeiten dieser Methode zu demonstrieren wurden Parameter für die enzymatische Umesterung von GpC (Guanylyl-3',5'-cytidin) zu cGMP (Guanosin-2',3'-phosphodiester) und Cytidin, dem Standardtest für die Untersuchung von RNase T₁, ermittelt. Die ermittelten Parameter ließen sich jedoch nur unter bestimmten Voraussetzungen mit den in der Literatur veröffentlichten Daten vergleichen, da die Reaktionen in einer veränderten Umgebung mit deutlich geringerer Ionenkonzentration durchgeführt wurden. Dies spricht aber nicht gegen den Einsatz als *screening* Methode, da in diesem Fall alle Reaktionen unter identischen Bedingungen durchgeführt werden.

Weiterhin wurden kinetische Parameter für die Umesterung von ApC (Adenylyl-3',5'-cytidin) zu cAMP (Adenosin-2',3'-phosphodiester) und Cytidin durch eine Variante von RNase T₁ (RNase T₁ RV) bestimmt. Im Gegensatz zum spektrophotometrischen Test ist die Untersuchung mit Massenspektrometrie nicht durch die hohe Eigenabsorption des Substrats ApC eingeschränkt.

Zur Untersuchung des zweiten Reaktionsschritts der durch RNase T₁ katalysierten Spaltung von Ribonukleotiden, der Esterhydrolyse von Nukleosid-2',3'-phosphodiestern zum Nukleosid-3'-monophosphat durch RNase T₁, existiert zur Zeit kein spektrophotometrischer Test. Durch den Einsatz der hier entwickelten Methode war es möglich, enzymkinetische Parameter für diese Reaktion zu ermitteln.

2. Mit Hilfe von *online* Untersuchungen enzymatischer Reaktionen mit Massenspektrometrie lassen sich kontinuierliche Zeit-Intensitätskurven für alle Reaktanten (Substrate, Intermediate, Produkte und mögliche Modulatoren) aufnehmen. Diese Daten erlauben eine umfassende Untersuchung der zu Grunde liegenden Mechanismen der enzymatischen Reaktion und geben wichtige Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen z. B. mit Hilfe der hier vorgestellten *offline* Methode.

Die Möglichkeiten der *online* Untersuchungen wurden durch die Untersuchung der enzymatischen Spaltung von Dinucleosidmonophosphaten durch RNase T₁ demonstriert. Die dabei gesammelten Daten bestätigten den von JAN BACKMANN *et al.*^[1] vorgeschlagenen Mechanismus der RNase T₁.

[1] BACKMANN J, *et al.* (1994) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199**(1):213.

3. Zur Durchführung der *online* MS Untersuchungen wurde eine *nano* Elektrospray (*nano*ES) Ionenquelle entwickelt^[2]. Diese Ionenquelle ist eine Erweiterung der Standardionenquelle (eine pneumatisch-unterstützte Elektrospray Ionenquelle) des verwendeten Instruments (*Perkin Elmer API 365*). Die entwickelte *nano*ES Ionenquelle wurde so konstruiert, daß sie die Funktion der Standardionenquelle in keiner Weise beeinträchtigt und ein schneller Wechsel zwischen beiden Ionenquellen im laufenden Betrieb, sogar während einer Messung, möglich ist.

Die Eigenschaften der in dieser Arbeit entwickelten *nano*ES Ionenquelle (Untersuchung von wässrigen Lösungen ohne den Zusatz von leichtflüchtigen Lösungsmitteln, geringe Flußraten) konnte durch zahlreiche Versuche bestätigt werden; zum einen durch die *online* Untersuchungen enzymatischer Reaktionen, die in gepufferten wässrigen Lösungen durchgeführt wurden. Zum anderen konnten durch die geringen Flußraten und die daraus resultierenden langen Untersuchungszeiten auch mit kleinen Probenmengen die Struktur einiger Metaboliten aufgeklärt werden^[3,4,5,6].

4. Mittels *Spaltungsmusteranalyse* (cleavage pattern analysis) läßt sich die Spezifität von polymerspaltenden Enzymen untersuchen. Dazu wird ein definiertes Substrat durch das Enzym umgesetzt und die entstehenden Reaktionsprodukte zeitaufgelöst mit MALDI-MS untersucht.

Zur Untersuchung von RNase T₁ wurde ein Substrat entwickelt, das von RNase T₁ Wildtyp an genau zwei Stellen gespalten werden konnte. Die Untersuchung von RNase T₁ (Wildtyp) und der RNase T₁ Variante RV ergab, daß RNase T₁ eine Präferenz für Spaltstellen hat, die in eine längere Oligonukleotidkette eingebettet sind. Weiterhin lieferte diese Untersuchung eindeutige Hinweise darauf, daß RNase T₁ eine weitere, bisher unbekannte Bindungsstelle für ein Nukleosid oder eine Phosphatgruppe hat.

-
- [2] KUHNLE GG, *et al.* (2000) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **14**(14):1307.
[3] KUHNLE G, *et al.* (2000) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**(1):212.
[4] KUHNLE G, *et al.* (2000) *Biochemical and Biophysical Research Communication* **277**(2):507.
[5] SPENCER JPE, *et al.* (2001) *Biochemical Journal* **354**:493.
[6] RECHNER AR, *et al.* (2001) *Free Radical Biology & Medicine* **30**(11):1213.