

3. Ergebnisse

3.1. Miniaturisierung und Automatisierung der Probenpräparation für die Matrix-assistierte Laser Desorptions / Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-MS)

3.1.1. Funktionelle Eigenschaften der Piezojet-Mikrodispenser

Die Verwendung von piezoelektrischen Mikrodispensern ermöglicht es, geringste Substanzmengen gezielt auf unterschiedlichen Probenträgern wie Matrixdünnschichtpräparationen oder Edelstahl-oberflächen anzutragen. Bei den verwendeten Piezojets (Konstruktion und Herstellung s. Abschnitt 2.2.1) wird eine Glaskapillare durch die sie umgebende Piezokeramik pulsartig kontrahiert, wenn die Piezokeramik mit einem rechteckigen elektrischen Puls angesteuert wird. Die Schockwelle, welche daraufhin durch die Flüssigkeit läuft, führt zum Austritt eines kurzen Flüssigkeitsstrahls am unteren verjüngten Kapillarenden. Wenige μs nach dem Verlassen dieser Glasdüse schnürt der Strahl infolge der Oberflächenspannung ein und fliegt als einzelner Tropfen weiter (Abbildung 3-1).

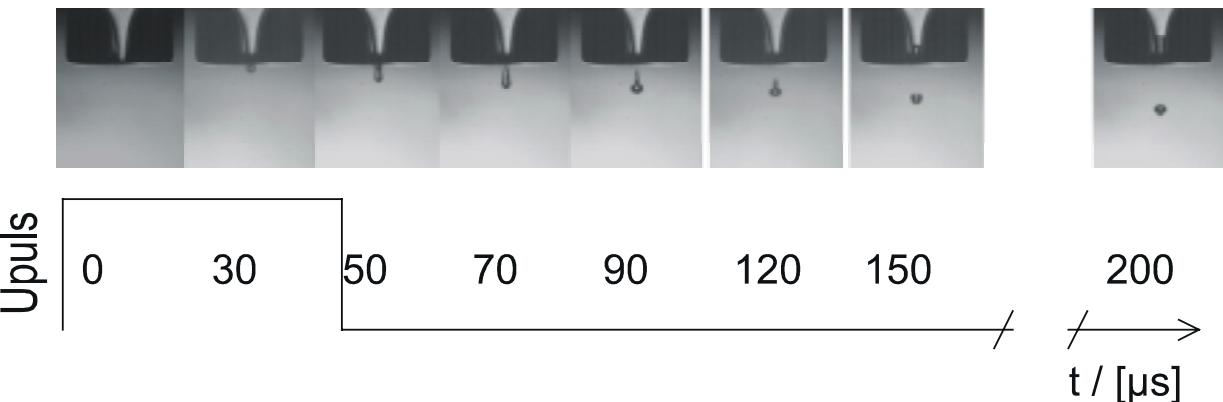


Abbildung 3-1: Zeitlicher Verlauf des Tropfenabriß und des elektrischen Spannungspulses am Piezoelement.

Abhängig von der Wahl der piezoelektrischen Parameter (s. Abschnitt 2.2.2), lässt sich der Tropfendurchmesser zwischen 40 und 70 μm variieren. Die entsprechenden Tropfenvolumina belaufen sich auf 65 bis 113 picoliter (pl) und werden hauptsächlich durch die Dauer des Spannungspulses beeinflusst, welcher die Kontraktion der Piezokeramik bewirkt (Abbildung 3-2). Innerhalb bestimmter Grenzen ist die Tropfengeschwindigkeit ungefähr proportional zur Amplitude des angelegten Spannungspulses (Abbildung 3-3). Wird die Mindestamplitude des Spannungspulses unterschritten (~ 40 V), so kommt es nicht mehr zum Tropfenabriß, die herausgedrückte Flüssigkeit schwingt zurück. Bei Überschreitung der Maximalspannung (~ 120 V) kann die Flüssigkeit aus dem Reservoir nicht mehr schnell genug in den dynamischen Teil des Piezojet-Mikrodispensers nachströmen wodurch Luft in die Austrittsdüse des Dispensers eindringt. Die entstandene Luftblase macht infolge ihrer leichten Komprimierbarkeit und der damit verbundenen Dämpfungswirkung alle weiteren Dispensierversuche zunicht.

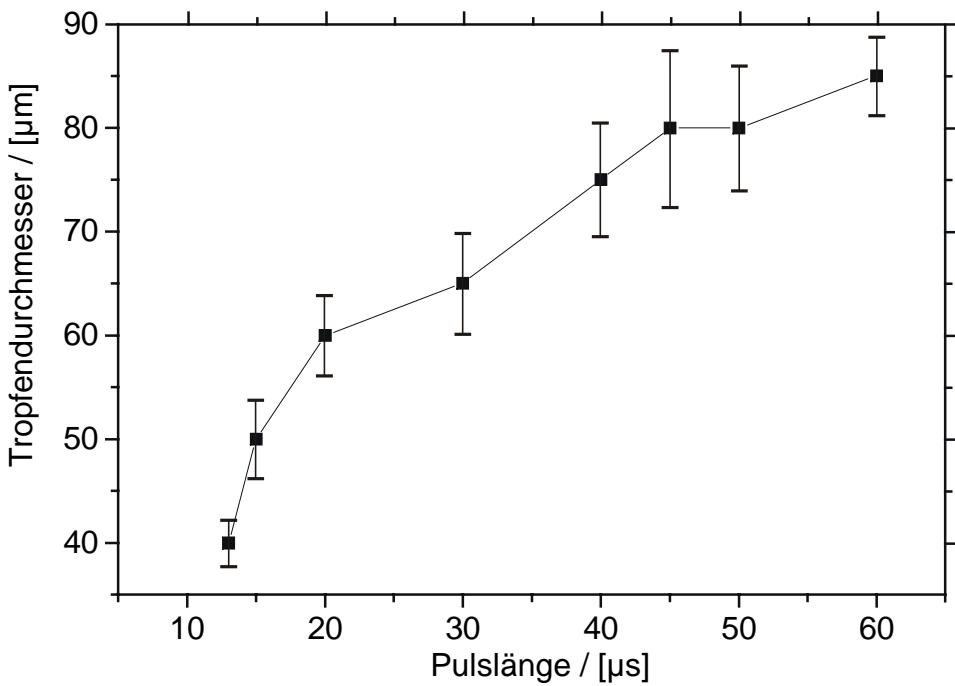


Abbildung 3-2: Abhängigkeit des Tropfendurchmessers von der Dauer des angelegten Spannungspulses. Jeder Datenpunkt stellt das arithmetische Mittel aus 9 Einzelmessungen dar.

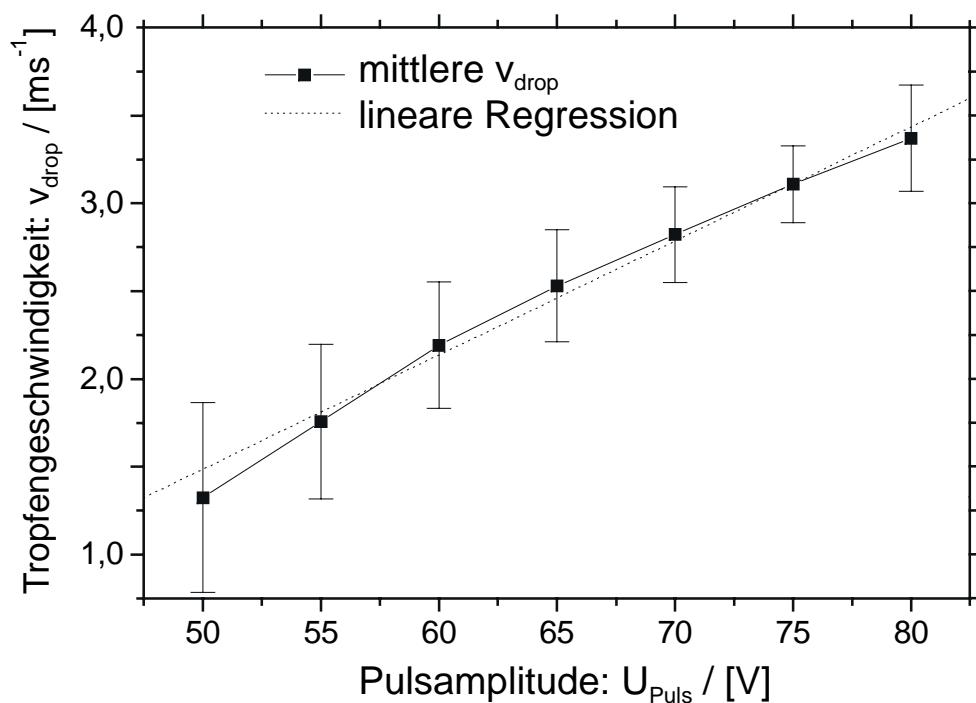


Abbildung 3-3: Proportionale Beziehung zwischen Tropfengeschwindigkeit und Amplitude des am Piezoelement angelegten Spannungspulses:

$$v_{drop} = -3,14873 (\pm 0,20601) \text{ ms}^{-1} + U_{puls} \cdot 0,08631 (\pm 0,00289) \text{ ms}^{-1} \text{ V}^1$$

Der Graph fasst die Daten 4 baugleicher Piezojet-Dispenser zusammen.

3.1.2. MALDI-MS-Analysen mikrodispensierter Peptide

Um mit dem verfahrbaren Probentisch des MALDI-Massenspektrometers die Probe genau unter den Fokus des Laserstrahls ausrichten zu können, ist es sowohl für automatische als auch für manuelle Messungen essentiell, über eine genaue Positionierkontrolle zu verfügen. Dies geschieht beim verwendeten MALDI-Massenspektrometer über optische Beobachtung, die aus einem Spiegelsystem und einer Videokamera mit Mikroskopoptik besteht. Gut sichtbare Matrixkristalle können hiermit manuell anvisiert werden. Tatsächlich sind jedoch die farblosen Auftragstellen der Peptide auf HCCA-Dünnschichten unsichtbar. Eine Probenposition müßte also z.B. durch benachbarte Farbspots („*guide spots*“) zusätzlich markiert werden. Dieses Problem läßt sich durch Beimengung organischer Lösungsmittel zur Probenlösung (s. Abschnitt 2.5.2) umgehen. Der Dispersionseffekt des zuvor einheitlichen, wasserunlöslichen HCCA-Kristallfilms wird durch Rekristallisation an den Auftragsstellen unterbrochen (Abbildung 3-4). Für die nun als helle Stellen erscheinenden Probenflächen, die durch Übertragung einzelner Tropfen erzeugt wurden, wurden Durchmesser um 120 µm gemessen.

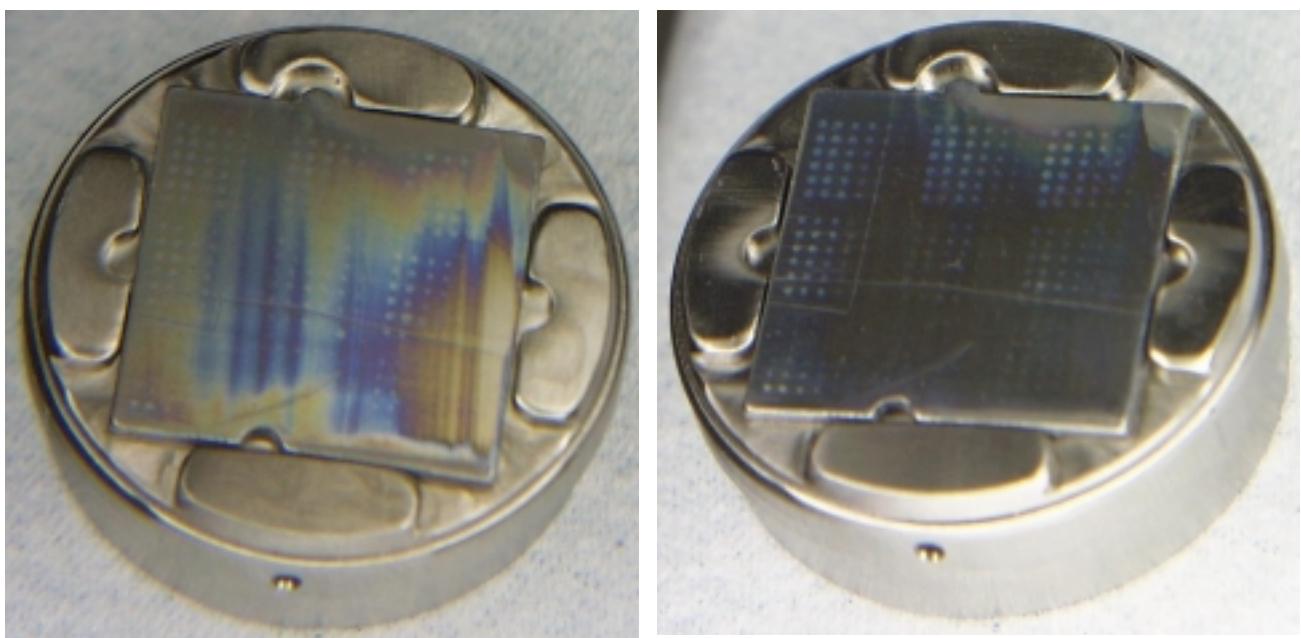


Abbildung 3-4: Target mit mikrodispensierten Peptiden auf Halterung. Die doppelte Abbildung aus leicht unterschiedlichen Blickwinkeln verdeutlicht den Dispersionseffekt des Matrixfilms, der durch rekristallisierten Stellen unterbrochen wird. Auf dem Target sind 9 6x6 Raster zu sehen. Jede Zeile eines Rasters stellt zudem eine Konzentrationsreihe dar: von links nach rechts nimmt die Tropfenzahl von 60 auf 10 Tropfen ab.

Die gemessene Ionen-Signalintensität hängt bei der MALDI-MS nicht nur von der eingesetzten Analytmenge (hier Peptidmenge) sondern auch vom Matrix/Analyt-Verhältnis ab. Zu dessen Bestimmung wurde die aufgetragene Matrixmenge (=HCCA-Menge) auf die Fläche der Auftragsstellen umgerechnet. Die Größe dieser Fläche ergibt sich aus dem Spotdurchmesser, der wie in Abbildung 3-5 gezeigt von der Größe des mikrodispensierten Volumens (und somit von der Tropfenzahl) abhängt. Wird durch Auftragen größerer Peptidmengen das molare Matrix/Analyt-Verhältnis von ca. 7000-8000 überschritten, so bewirkt dies eine Abnahme der Ionenintensität bei MALDI-MS Messungen. Auch manuelle MALDI-MS Analysen können noch bei einem größerenordnungsmäßig vergleichbarem Matrix/Analyt-Verhältnis (wie in Tabelle 3-1 aufgeführt) erfolgen. Allerdings werden bei der manuellen Probenpräparation in der Regel Peptidkonzentrationen zwischen 0,1-0,5 pmol/µl verwendet.

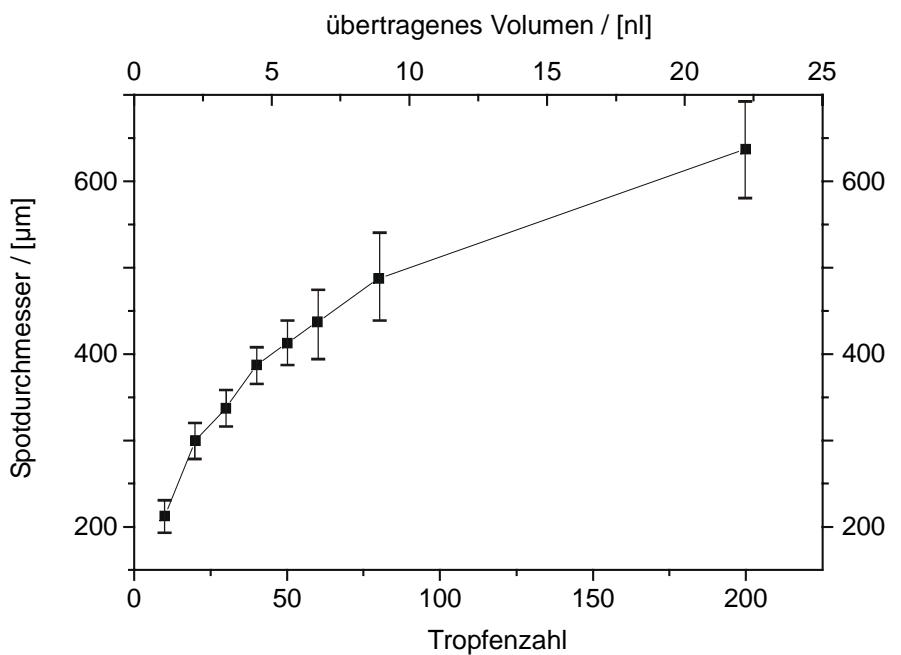


Abbildung 3-5: Korrelation zwischen Tropfenzahl (bzw. Flüssigkeitsvolumen) und dem Durchmesser des entstandenen Substanzspots (62 Einzelmessungen pro Datenpunkt). Das Flüssigkeitsvolumen ist aus Tropfen-Zahl und Durchmesser berechnet. Die Spotdurchmesser wurden per Mikroskop bestimmt.

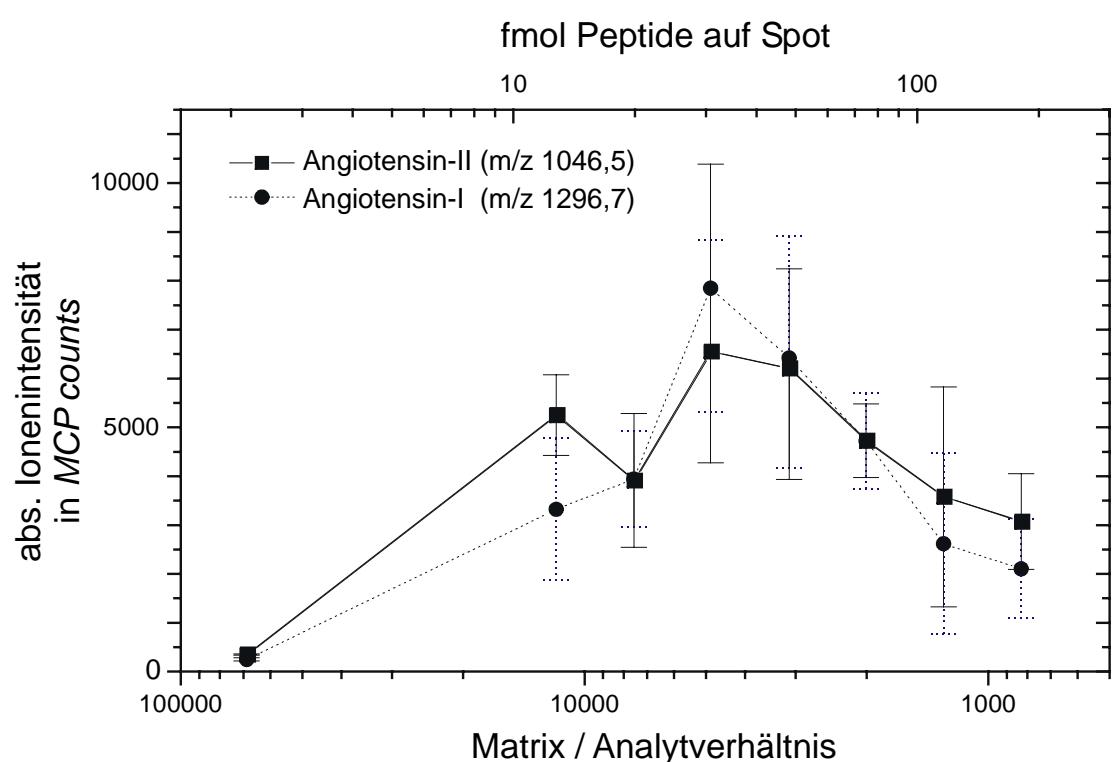


Abbildung 3-6: Abhängigkeit der Signalintensität vom der Peptidmenge bzw. dem Matrix / Analyt-Verhältnis. Analyte: Angiotensin-I und -II. Die Datenpunkte stellen jeweils das arithmetische Mittel der Signalintensitäten von 9 Proben dar, die gleichartig mit einem Piezoflat-Mikrodispenser präpariert wurden. Jede Probe wurde durch Akkumulation von 5 Einzelschußspektren gemessen. Die Spotdurchmesser betrugen je ca. 400 μm. Ab ~30 fmol Peptide/Spot kommt es zu Übersättigungseffekten und einem entsprechendem Rückgang der Signalstärke.

	Manuell (mit Gilson C-10 Pipettenspitzen)	Automatisiert (Verwendung von Piezojets)
<u>Spotdurchmesser:</u>	3 mm	~ 400 µm
<u>Matrix:</u>	0,1 µl 20 µg/µl HCCA ⇒ 10,6 nmol pro Spot	100µg HCCA auf einem 21x21 mm <i>Target</i> ⇒ 151,0 pmol pro Spot (= 28,6 ng)
<u>Analyt:</u>	0,3 µl von 5,0 pmol/µl Angiotensin-I/II Gemisch ⇒ 1,5 pmol pro Spot	3,5 nl von 5,0 pmol/µl Angiotensin-I/II (≡ 35 Mikrotropfen) ⇒ 17,5 fmol pro Spot
<u>molares Matrix/Analyt- Verhältnis:</u>	7066	8628

Tabelle 3-1: Beispiel für den Vergleich manueller und automatischer Targetpräparation. Bei gleichen Konzentrationen der Ausgangslösung liegt das molare Matrix/Analyt-Verhältnis in derselben Größenordnung.

3.1.3. Reproduzierbarkeit der dispensierten Volumina

Stroboskopische Aufnahmen der arbeitenden Piezojet-Dispenserspitze zeigen ein scharfes Bild der Tropfen nach dem Austritt aus dem Dispenser (Abbildung 3-1) obwohl es sich bei der Abbildung immer um mehrere Tropfen zum gleichen Zeitpunkt handelt. Dies lässt bereits vermuten, daß auch das Volumen einzelner Tropfen bei jeder Kontraktion des Piezoelementes konstant bleibt, solange die piezoelektrischen Parameter nicht verändert werden (s. Abschnitt 3.1.1). Aufnahmen einzelner Tropfen mit einer sog. *Framegrabber*-Karte zeigen ebenfalls die Konstanz der Tropfengröße und bestätigen diese Vermutung.

Die Abnahme des Flüssigkeitsstandes im Reservoirteil des Piezojet-Mikrodispensers gibt Aufschluß über das dispensierte Volumen ab ~ 1000 Tropfen. Bei Dispensern, die eine Verjüngung im oberen Teil der Glaskapillare aufweisen (s. Abbildung 2-2 in Abschnitt 2.2.1) ist die Volumenabgabe pro Tropfen unabhängig vom Flüssigkeitsstand im Reservoirteil der Kapillare. Ohne diese als Drossel wirkende Verjüngung müssen die piezoelektrischen Parameter Pulslänge und –Amplitude ständig variiert werden, damit überhaupt noch Tropfen abgegeben werden können. In diesem Fall lässt sich kein konstantes Tropfenvolumen reproduzieren.

3.1.4. Reproduzierbarkeit der MALDI-MS Analyse automatisch erzeugter Substanzraster

Der Vergleich der Signalintensitäten der Molekülionen aus mehreren mikrodispensierten, gleichartigen präparierten MALDI-MS-Proben zeigt eine durchschnittliche Schwankungsbreite von ~20 bis ~30% (Abbildung 3-7). Größenordnungsmäßig stimmt dies mit den Schwankungsbreiten überein, welche die Signalintensitäten aus manuell hergestellten Proben mit größeren Substanzmengen aufweisen (Tang, Allman *et al.*, (1993)).

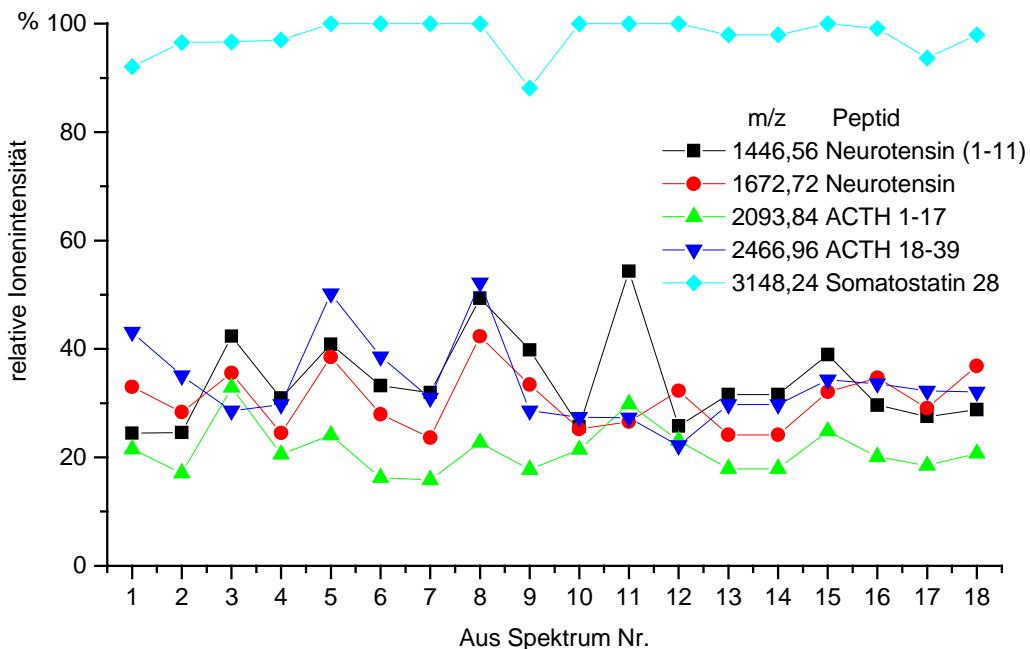


Abbildung 3-7: Signalintensitäten von 18 mikrodispensierte Proben eines Peptidgemisches („Sandwich“-Präparation). In jedem Matrixspot ($\varnothing = 625 \mu\text{m}$) befinden sich 10 fmol eines jeden Peptides (bzw. 20 fmol Somatostatin 28). Zur Spektrenaufnahme wurden an jeweils zwei Stellen eines Spots 50 Einzelspektren akkumuliert.

3.1.5. Vergleich von Dünnschicht und „Sandwich“-Mikropräparation

Auf einem MALDI-MS Target erzeugte Matrix-Dünnschichtspots (s. Abschnitt 2.5.2) werden mit je 100 Mikrotropfen (~20 nl) eines Peptidgemisches (MS-Standards s. Tabelle 2-2 in Abschnitt 2.1.1; $c_{\text{Peptid}} = 1,0 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) beladen. Diese Dünnschichtpräparationen enthalten also von jedem Peptid-Standard 10 fmol. Für eine „Sandwich“-Mikropräparation werden zudem 200 Mikrotropfen der Matrixlösung aus einem zweiten Mikrodispenser in die noch nicht eingetrockneten Probentropfen dispesierte. Für diesen Schritt ist ein genauer Positionsabgleich der Tropfenzielpositionen der einzelnen Mikropipetten erforderlich (s. 3.1.7 unten). Die MALDI-MS Analyse der Proben erfolgt jeweils durch Aufnahme von Teilspektren á 20 Laserschüssen, die anschließend zum Gesamtspektrum akkumuliert werden. In Abbildung 3-8 ist beispielhaft der Verlauf der Ionenintensität für vier Peptide in Abhängigkeit von der Schußzahl aufgeführt. Bei den Dünnschichtpräparationen nehmen die anfangs starken Ionensignale schon nach wenigen Schüssen ab. Die Anfangsintensitäten der Ionen aus einer „Sandwich“-Mikropräparation sind zwar geringer als bei der Dünnschichtpräparation, jedoch können bis zum Verschwinden der Signalintensität wesentlich mehr Teilspektren aufgenommen werden. Außerdem sind die Intensitätsschwankungen der Ionen der einzelnen Peptide zueinander geringer. Nach insgesamt 220 Laserschüssen liegen die akkumulierten Ionenintensitäten des Gesamtspektrums bei der „Sandwich“-Methode fast bei doppelt so hohen Werten als bei den Dünnschichtpräparaten.

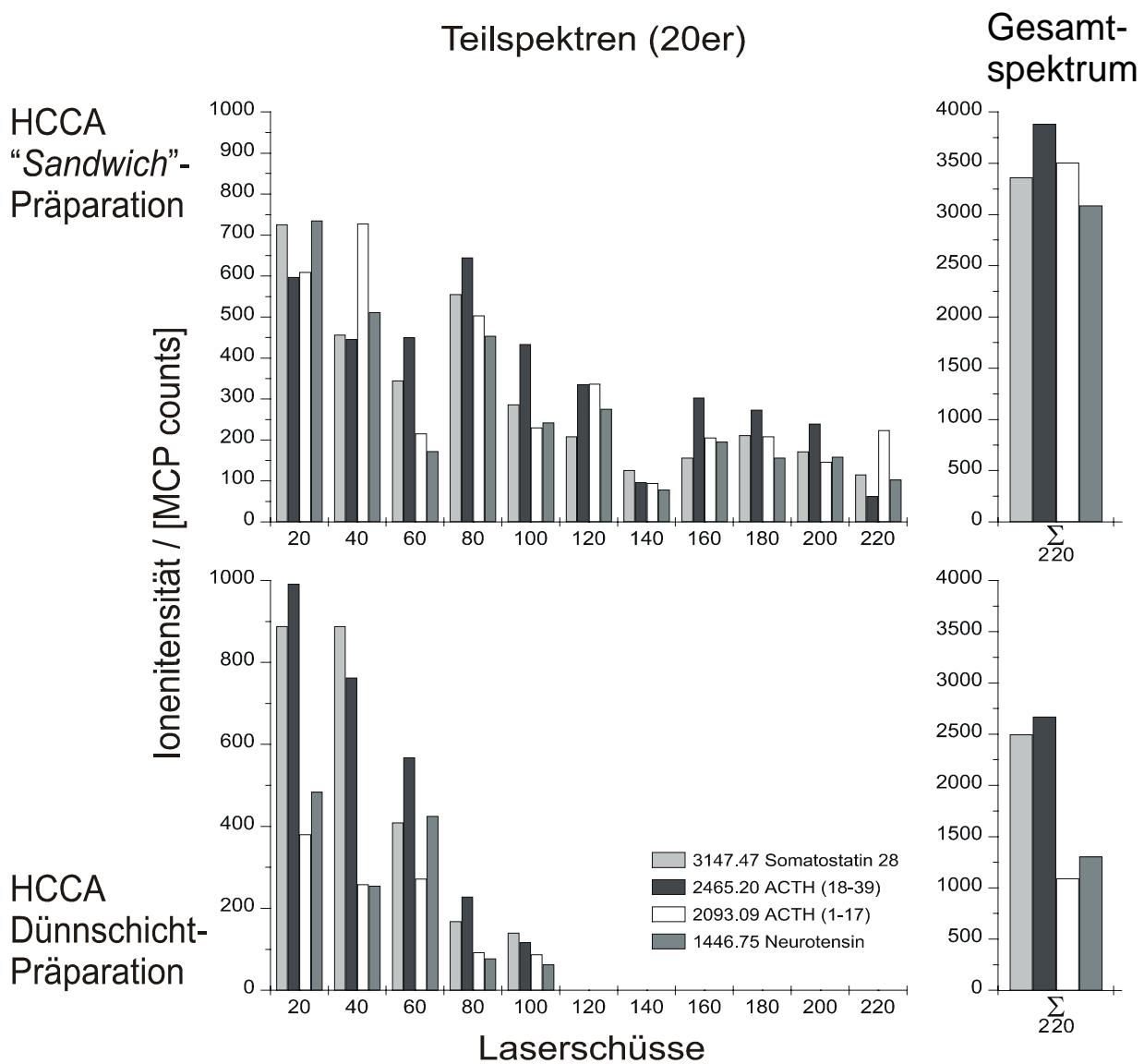


Abbildung 3-8: Vergleich der Intensitätsverläufe bei MALDI-MS Messungen mikropräparierter Peptidgemische mit je 10 fmol Peptid.

3.1.6. Regeln für zuverlässiges Arbeiten mit Piezojet-Mikrodispensern

Im Gegensatz zum meist problemlosen Flüssigkeitstransfer mit herkömmlichen Pipetten und auswechselbaren Kunststoffspitzen, treten beim Dispensieren von Kleinstvolumina mit Piezojets häufig Probleme auf, die eine gezielte und zuverlässige Flüssigkeitsabgabe verhindern. Um dennoch die Mikrodispensiertechnik zur Erzeugung von exakt definierten Probenanordnungen in Rasterform auf kleinsten Flächen nutzen zu können, müssen die folgenden empirisch ermittelten Arbeitsregeln strikt eingehalten werden:

- 1.) Sämtliche Flüssigkeiten müssen vor dem Einsaugen in den Dispenser entgast werden (s. Abschnitt 2.2.3). Ansonsten bilden sich während des Einsaugens oder beim Betrieb des Dispensers leicht kleine Luftblaschen in der Flüssigkeit an der Glaswand des Dispensers. Diese Luftblaschen sind so klein, daß sie nicht in der Flüssigkeit aufsteigen. Sie verbleiben im Arbeitsbereich des Dispensers und beeinträchtigen den Tropfenabschuß (s. Abschnitt 3.1.1).

- 2.) Die zu dispensierenden Flüssigkeiten müssen zuvor mikrofiltriert oder zentrifugiert werden (s. Abschnitt 2.2.3). Ansonsten können feinste Staubpartikel (oder z.B. Textilfussel) an der Dispensermündung hängenbleiben und so den Tropfenabriß verhindern.
- 3.) Es sollten keine hohen Konzentrationen gelöster Feststoffe in leichtflüchtigen Lösungsmitteln verwendet werden (z.B. für HCCA maximal ~5mg/ml in 50% Acetonitril). Ähnlich wie die genannten Staubpartikel beeinträchtigen bereits feinste Kristallnadeln auskristallisierender Substanzen den Tropfenabriß und können im schlimmsten Fall zur Verstopfung der Dispenserdüse führen.
- 4.) Vor dem Dispensieren wässriger Lösungen sollten die gläsernen Kapillarenden der Dispenser innen und außen silanisiert werden (s. Abschnitt 2.2.1, Punkt 2). Die hierdurch geschaffene hydrophobe Oberfläche verhindert, daß nach dem Herausziehen der Kapillare aus der aufzusaugenden Lösung ein Tropfen an der Außenwand zurückbleibt (dieser würde das Dispensieren verhindern). Außerdem minimiert dies die Gefahr der Adhäsion von Schmutzpartikel. Weiterhin hemmt die Silanisierung das Auskristallisieren gelöster Feststoffe an der Tropfenaustrittsdüse. Sollen hydrophobe organische Lösungsmittel oder tensidhaltige wässrige Lösungen verwendet werden, so wirkt sich die Silanisierung eher ungünstig auf einen stabilen Tropfenabriß aus.
- 5.) Die Verwendung einheitlicher Trägerflüssigkeiten vereinfachen das Abstimmen der Dispenser. Die piezoelektrischen Parameter müssen für jeden einzelnen Piezoflot und für verschiedene Lösungen (in Abhängigkeit von ihrer Viskosität) abgestimmt werden. Wird jedoch nur die Spitze der Dispenserkapillare mit der zu transferierenden Probenlösung beschickt, während der dynamische Teil des Dispensers noch mit der Trägerflüssigkeit (z.B. Wasser oder Acetonitril/Wassergemische) gefüllt ist, so muß meistens nichts weiter verändert werden. Ist die Trägerflüssigkeit zugleich als Spülflüssigkeit geeignet, vereinfacht sich die Reinigungsprozedur.
- 6.) Nicht verwendete Piezoflot-Dispenser sollten mit Flüssigkeit gefüllt „geparkt“ werden. Unmittelbar nach dem Befüllen verändern sich ständig die piezoelektrischen Eigenschaften eines zuvor trockenen Dispensers. Eine wenigstens 24 h alte Flüssigkeitsfüllung garantiert hingegen Parameterstabilität.

3.1.7. Verbesserte Positionierbarkeit der Kleinstvolumina mit dem HARP-System

Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, können die von einem Piezoflot-Dispenser emittierten Mikrotröpfchen auf elektroakustischem Wege detektiert werden, obwohl ihre kinetische Energie nur ca. 200 pico Joule beträgt ($E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2$; mit $m \approx 0,1 \mu\text{g} \sim 0,1 \text{ nl}$ und $v \approx 2 \text{ ms}^{-1}$). Ein mit der Membran eines Elektret-Kondensatormikrofons verbundener, gespannter Metallfaden dient hierbei als linearer Detektor, wobei die Detektion der Mikrotropfen unabhängig von der Stelle ist, an welcher sie den Draht treffen. Dieses Meßprinzip kann zur exakten Positionierung von Multidisponsen verwendet werden, in denen zahlreiche Mikrodispenser (auch in mehreren Reihen) auf einem festen Träger angeordnet sind.

In Abbildung 3-9 und in Tabelle 3-2 ist beispielhaft ein Meßergebnis für die Positionsbestimmung der Tropfenfangdrähte mit dem Referenzdispenser aufgeführt. Die hieraus resultierende Statistik in Tabelle 3-3 zeigt, daß die Genauigkeit der ermittelten Position der Fangdrähte bei ~9,3 bis 9,8 μm liegt. Diese Werte, die sich als Fehler der Regressionsgeraden darstellen lassen, beeinflussen die Genauigkeit, mit der nachfolgend die Positionen der auszurichtenden Mikrodispenser korrigiert werden.

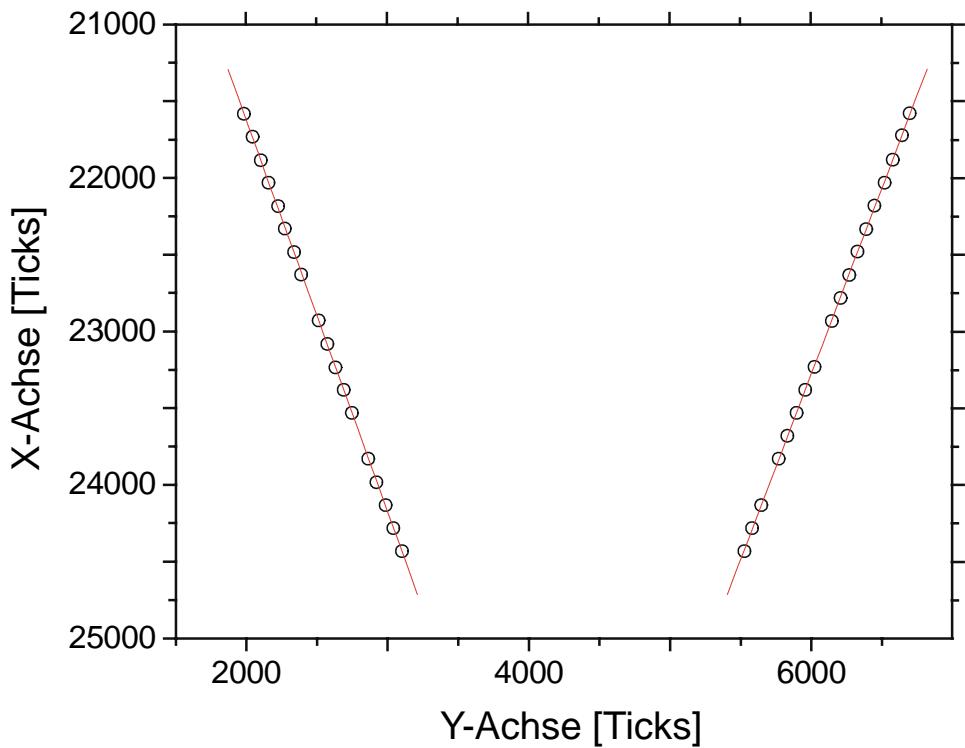


Abbildung 3-9: Regressionsgeraden der Tropfenfangdrähte und Auftreffpunkte der vom Referenzdispenser emittierten Tröpfchen.

$$\text{rechter Draht: } Y = 0,392416 (\pm 0,000668) \cdot X - 6486,63 (\pm 15,36)$$

$$\text{linker Draht: } Y'' = -0,412595 (\pm 0,000725) \cdot X'' + 15603,03 (\pm 16,65)$$

rechter Tropfenfangdraht					linker Tropfenfangdraht					
Startposition		Trefferposition			Startposition		Trefferposition			
X°	Y°	X	Y	Δ	X''°	Y''°	X''	Y''	Δ''	
21581	1458	21581	1981	1,03	21578	6268	21578	6696	3,75	
21731	1522	21731	2043	1,89	21722	6210	21722	6640	0,59	
21883	1574	21883	2102	1,29	21881	6139	21881	6576	0,89	
22032	1634	22032	2157	1,94	22031	6080	22031	6518	4,48	
22183	1694	22183	2223	4,34	22181	6018	22181	6447	3,94	
22331	1751	22331	2273	3,18	22332	5956	22332	6389	0,04	
22482	1810	22482	2338	2,16	22481	5894	22481	6326	1,37	
22630	1871	22630	2388	5,35	22631	5833	22631	6267	1,30	
22930	1993	22930	2510	1,37	22782	5771	22782	6206	2,50	
23081	2053	23081	2572	1,18	22931	5710	22931	6145	2,95	
23233	2111	23233	2632	1,51	23232	5588	23232	6020	2,20	
23380	2170	23380	2689	0,87	23381	5524	23381	5957	0,79	
23530	2232	23530	2748	1,00	23530	5463	23530	5894	0,62	
23830	2350	23830	2863	1,54	23681	5402	23681	5830	2,19	
23981	2411	23981	2922	1,77	23831	5341	23831	5769	1,37	
24132	2472	24132	2984	0,78	24132	5220	24132	5646	0,27	
24281	2530	24281	3041	0,59	24281	5160	24281	5581	3,52	
24430	2590	24430	3102	1,77	24430	5096	24430	5526	2,46	

Tabelle 3-2: Vermessung einer Referenznozzle mit den beiden Tropfenfangdrähten des HARP-Sensors. Alle Werte sind in Achseninkrementen (Ticks) angegeben (1 Tick ~ 5 µm). Die Abweichungen Δ und Δ'' geben den kürzesten Abstand des jeweiligen Auftreffpunktes zu den Fangdrähten (als Länge des Lots auf die Regressionsgerade) an.

rechter Draht				linker Draht			
mittlere Abweichung	Standardabweichung						
Ticks	µm	Ticks	µm	Ticks	µm	Ticks	µm
1,865	9,3	1,217	6,1	1,957	9,8	1,322	6,6

Tabelle 3-3: Abweichungen der Tropfenaufstreffpositionen von den Fangdrähten in Achseninkrementen und in µm. Den angegebenen Werten liegt eine Messung mit 18 Tropfentreffern pro Draht zu Grunde (aus Tabelle 3-2).

Der letztendlich resultierende Gesamtmeßfehler entspricht größtenteils der Genauigkeit des Achsensteuersystems von 20 µm, wie sie vom Hersteller (Cybertron, Berlin) angegeben wird. Der Durchmesser des Fangdrahtes beträgt 40 µm und der Tropfendurchmesser liegt bei ca. 60 µm. Hieraus wird klar, daß das Streifen des Drahtes durch einen vorbeifliegenden Mikrotropfen zur Detektion genutzt wird. Der Vergleich eines mit dem HARP-System und der Videokamera ausgerichteten Mehrfach-Mikrodispensers ist in Abschnitt 4.1.2 (Abbildung 4-2) anhand eines mikrodispensierten Farbstoffrasters gezeigt.

3.1.8. Reinigung und Anreicherung von Peptiden mit magnetischen Partikeln

Peptide lassen sich, wie z.B. in Abschnitt 2.4.10 beschrieben, aus wässrigen Lösungen an hydrophoben Oberflächen (z.B. C₁₈-Material) binden, reinigen und in angereicherter Form mit organisch / wässrigen Lösungsmittelgemischen eluieren. Säulenchromatographische Verfahren sind jedoch schwer automatisierbar. Da in der Regel komplizierte Druck- und Pump- Systeme erforderlich sind, wie z.B. bei der HPLC, können diese Verfahren auch nur mit hohem technischen Aufwand für einen großen Probendurchsatz ausgelegt werden. Wesentlich einfacher ist es daher, die hydrophobe Phase an leicht bewegliche magnetische Partikel zu binden, welche sich im Bedarfsfall durch ein Magnetfeld immobilisieren lassen. Ein örtlich veränderliches Magnetfeld kann außerdem genutzt werden, um magnetisierbare Partikel in einer Flüssigkeit zu bewegen, wodurch eine bessere Durchmischung unter optimaler Oberflächenausnutzung erzielt wird. Zur Evaluierung der Reinigungs- und Anreicherungsmöglichkeiten der Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie, werden je 125 µg magnetischer Partikel (Daten siehe Abschnitt 2.4.11) mit 150 µl Lösung Peptidstandards (bestehend aus Angiotensin-II, -I, Substanz-P-methylester, Neurotensin (1-11), Neurotensin, ACTH (1-17), ACTH (18-39) human und Somatostatin-28) in verschiedenen Konzentrationen (in einem 0,5 ml cup) gemischt. Unter magnetischer Separation und Resuspension der Partikel werden Wasch-, Spül- und Elutions- Vorgänge, wie in Abschnitt 2.4.11 beschrieben, durchgeführt. Automatische MALDI-MS Analysen der Ausgangslösung vor und nach Partikelzusatz, sowie der Spülüberstände und der Eluate ermöglichen eine objektive Bewertung der Methode (s. Abbildung 3-10).

Die Spektren, welche mit äquivalenten Volumen (0,3 µl) der Ausgangslösung und des Überstands nach Partikelzusatz aufgenommen werden, zeigen jeweils geringe Abnahmen der Signalintensitäten (s. Abbildung 3-10). Durch Spülung der Partikel mit bidestilliertem Wasser werden offensichtlich Peptide freigesetzt, wie in den Spektren des Spülüberstands ersichtlich ist. Die MALDI-MS Analysen der Eluate verdeutlichen schließlich den Anreicherungseffekt: Obwohl die Spektren der Ausgangslösungen der Konzentrationen 1,0 und 5,0 fmol / µl nicht alle Signale oder nur geringe Signalintensitäten des Peptidstandards aufweisen, sind alle Ionensignale in den Spektren der entsprechenden Eluate enthalten. Bei den höheren Peptidkonzentrationen (50-100 fmol / µl) beeinflußt ein Verdrängungseffekt das Ergebnis dieser affinitätschromatographischen Methode: Die Signale der hydrophoberen Peptide Somatostatin-28 und ACTH (18-39) bei m/z 3147 bzw. 2465 (Werte gerundet) gewinnen hier gegenüber den Signalen der hydrophileren Peptide wie Angiotensin-II und -I (bei m/z 1047 bzw. 1297) deutlich an Intensität. Derartige Verdrängungseffekte sind bei Peptiden seit längerem bekannt, sie finden beispielsweise in der „displacement chromatography“ eine technische Anwendung (Cramer, el Rassi *et al.*, (1987)).

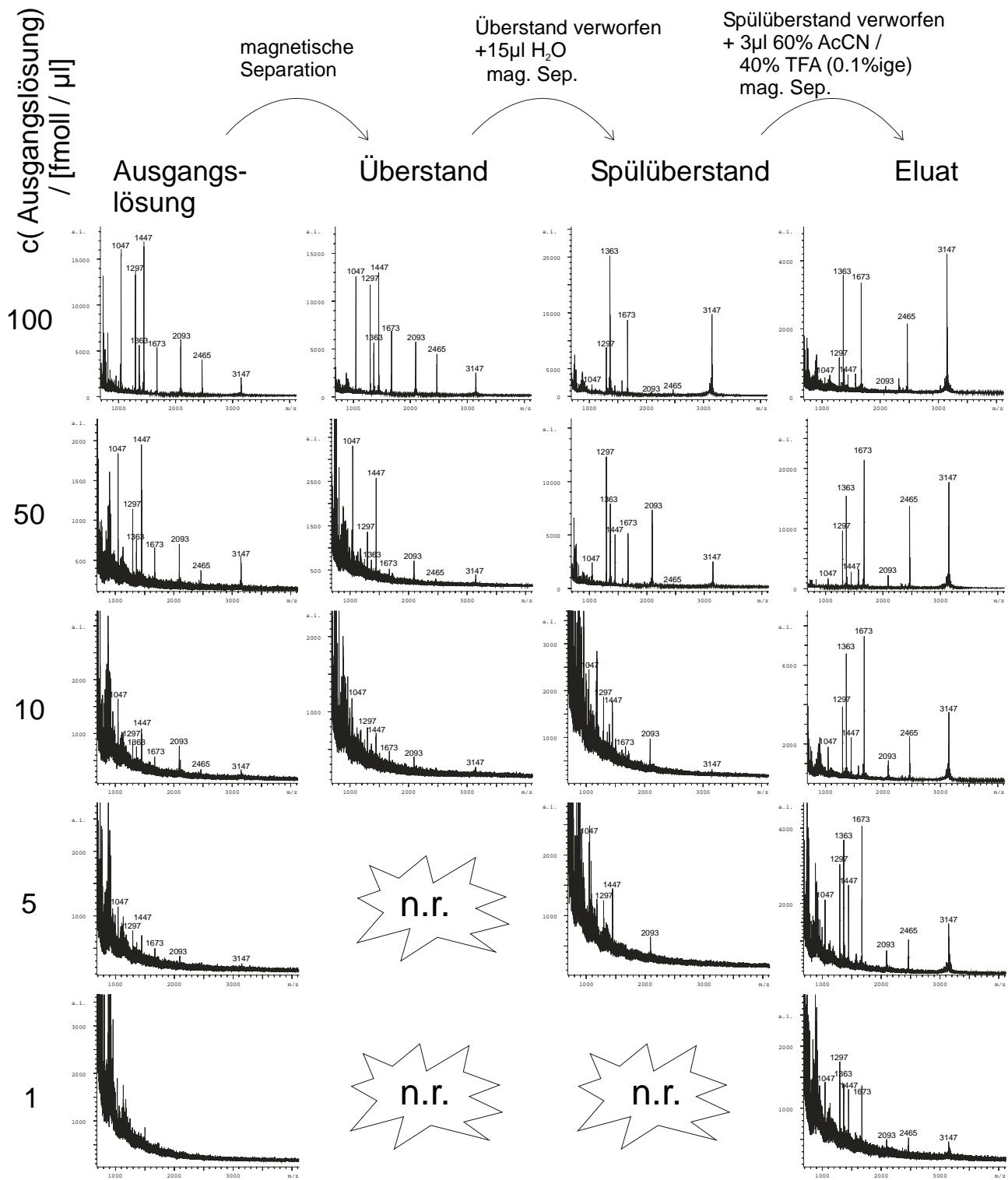


Abbildung 3-10: MALDI-MS Analyse von Peptidstandards zur Evaluierung der Proben- Reinigungs- & Anreicherungs- Prozedur mit magnetischen Partikeln, ausgehend von verschiedenen Konzentrationen (= c) der Ausgangslösung. „n.r.“ bedeutet „not recorded“, d.h. die Proben wurden zwar gemessen, jedoch von der automatischen Meßroutine nicht zu Spektren akkumuliert, da die Signalpegel objektiv zur schwach waren, um vom Rauschen unterschieden zu werden. (m/z-Werte der Peptide s. Tabelle 2-2 in Abschnitt 2.1.1).

3.2. Identifizierung RP4-kodierter Proteine aus vergleichender zweidimensionaler gelelektrophoretischer Trennung

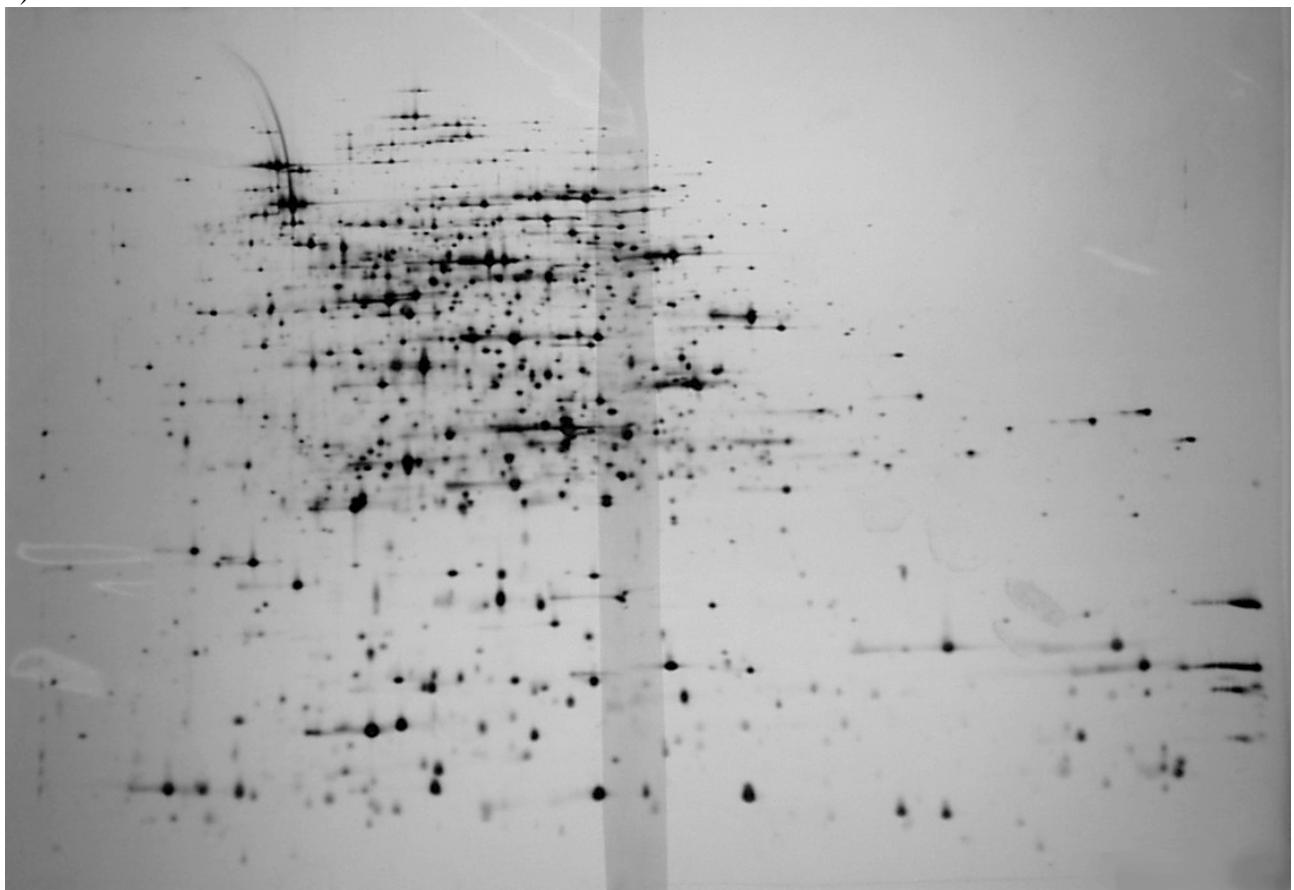
Als Untersuchungsmaterial dienten der *E. coli* Stamm SCS1, derselbe Stamm mit dem Klonierungsvektor pGZ119EH und SCS1(pDB126) welcher plasmidkodiert die komplette Tra1-Core-Region, die Tra2-Core-Region sowie TrbM und einen Teil von TrbN von RP4 beinhaltet (Balzer, Pansegrau *et al.*, (1994), s. Abschnitt 1.2.1) Dieser Stamm ist als Donor zum Gentransfer bei bakterieller Konjugation fähig. Um die Frage zu klären, welche der plasmidkodierten Proteine in der stationären Wachstumsphase der Zellen, im nicht induzierten Zustand, in nachweisbaren Mengen exprimiert werden, wurden Proteinextrakte der drei Stämme angefertigt und nach gelelektrophoretischer Trennung miteinander verglichen*.

Jedes der erhaltenen Gele zeigt die Auftrennung von ca. 1400 Proteinen im MW-Bereich 205 - 8 kDa und im pI Bereich 3 - 11. Der Pufferbereich der ersten Dimension liegt zwischen pH 3 und 9, der Proteinextrakt wurde allerdings auf der sauren Seite aufgetragen und die Fokussierung nicht bis zum Ende vollzogen. Da die drei Gele mit reproduzierbarer Trennwirkung angefertigt wurden, sind die Gele untereinander vergleichbar. Der Vergleich der Spotmuster von SCS1 mit SCS1(pGZ119EH) zeigt, das durch den hinzugekommen Vektor neben einem zusätzlichen Spot geringer Intensität, ein neuer sehr intensiver Spot bei MW ~40 kDa und beim pI ~7 beobachtet wird (s. Abbildung 3-11; vergl. a) und b)). Dieser Spot wird auch im Gel des Konstruktions SCS1(pDB126) beobachtet (Abbildung 3-11 c)). Daneben zeichnen sich noch werden noch 4 weitere intensive Spots und 9 Spots geringer Intensität im Gel von SCS1(pDB126) ab. Im Gel von SCS1(pGZ119EH) fehlen 2 kleinere Spots, die im Gel des plasmidfreien Stammes erkennbar sind.

In den beiden Gelen der plasmidtragenden Stämme finden sich Spots an den gleichen Positionen wie im Gel der plasmidfreien Spezies, die sich jedoch in ihren Intensitäten deutlich voneinander unterscheiden (blaue Pfeilmarkierungen in Abbildung 3-11 b) und c)).

* Herrn Prof. Dr. Joachim Klose sei herzlichst für die Durchführung der 2-DE, die Isolation der Gelspots und seine Expertise bei der Auswertung gedankt.

a)



b)



c)



Abbildung 3-11: Vergleichende 2-DE Trennung von Proteinextrakten aus *Escherichia coli* SCS1-Stamm:

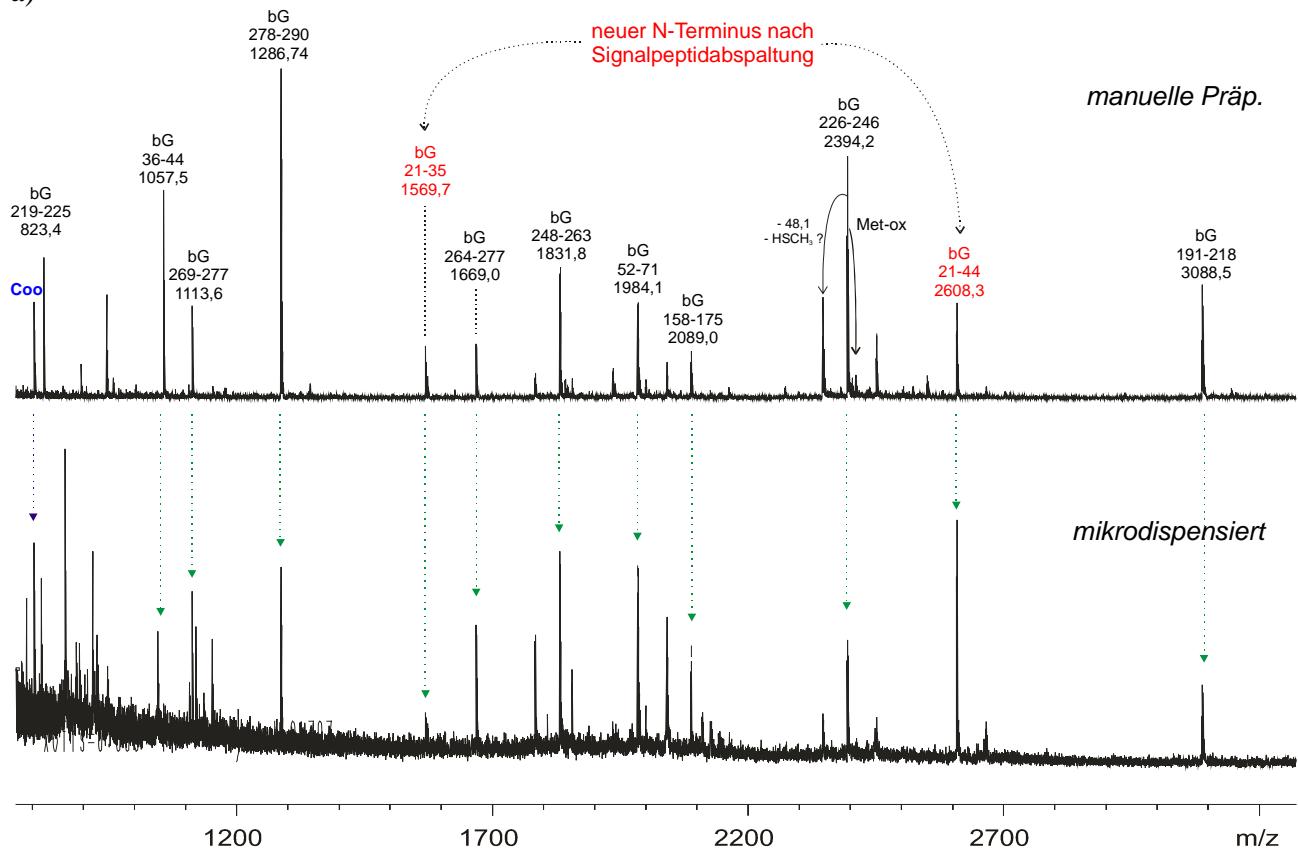
- a) ohne Plasmid
- b) SCS1(pGZ119EH) d.h. mit Klonierungsvektor
- c) SCS1(pDB126) = vollständiges Konstrukt bestehend aus pGZ119EH, Tra1- und Tra2-core Region von RP4

Legende: Spot links neben ↑ ist deutlich intensiver als in a); Spot links neben ↓ ist schwächer als in a); Spot geringer Intensität links neben + ist in a) nicht vorhanden; an der Stelle von - fehlt ein Spot, der jedoch in a) vorhanden ist. Die markierten, mit 1 bis 5 numerierten intensiven Spots sind in a) nicht vorhanden.

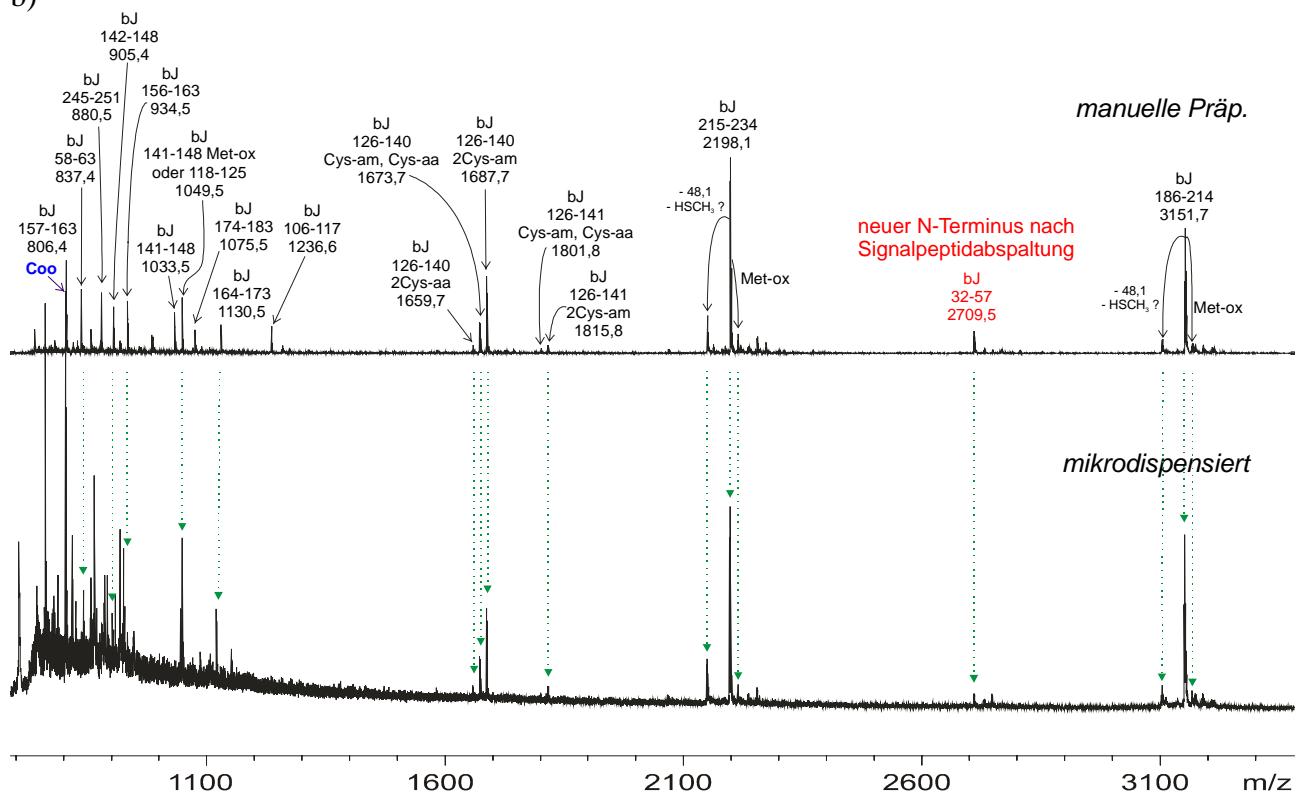
3.2.1. Identifizierung der unterschiedlichen Proteinspots durch manuelle und automatisierte massenspektrometrische Analyse

Die im Gel von pDB126 gegenüber dem Gel des unveränderten Stammes hinzugekommenen 5 intensiven Spots (nummeriert in Abbildung 3-11) werden aus einem erneut erzeugten, Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten, wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben prozessiert und durch automatische MALDI-MS Messung analysiert. Die Proben werden sowohl in der bekannten manuellen als auch in der mikrodispensiert hergestellten Präparation („Sandwich“-Verfahren) gemessen (s. Diskussion, Abschnitt 4.2.2). Beim letztgenannten automatisierter Probenherstellungsverfahren werden auf vorgelegte, durch einen Mikrodispenser erstellte Matrixflächen, 200 Tropfen (~20 nl) der Abbaupeptide aufgetragen und mit weiteren 200 Tropfen Matrixlösung (1 mg/ml HCCA) vereinigt. Wie z.B. das Spektrum in Abbildung 3-12 zeigt lassen sich hier hauptsächlich dieselben Peptidmassen ermitteln wie bei der Messung der manuell erstellten Probe.

a)



b)



c)

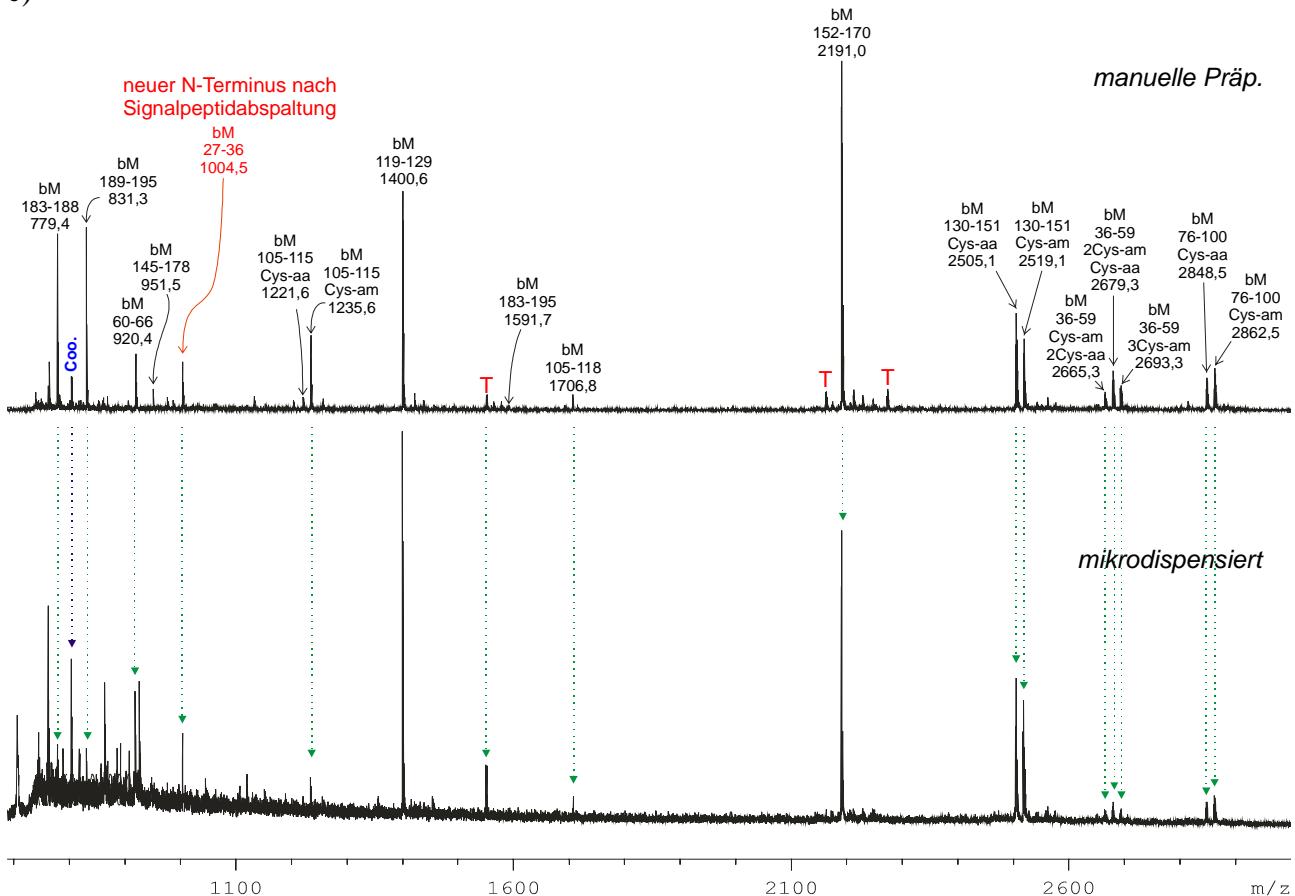


Abbildung 3-12: interpretierte MALDI-MS Spektren der Peptidextrakte von 2-DE Spot Nr. 2; 4; 5 entsprechend: a.) bG = TrbG; b.) bJ = TrbJ; c.) bM = TrbM, nach manuell pipettierter (oben) und automatisch, per Mikrodispenser erstellter Probe (unten). Auf dem Spot der mikrodispensierte Probe befinden sich ca. 5-20 fmol Peptide, während die manuell präparierte Probe schätzungsweise 0,5-1,0 pmol Peptide enthält. Die nach Abspaltung der vorhergesagten Signalsequenz zugeordneten Signale sind gesondert markiert. **Coo** kennzeichnet das $[M+H]^+$ -Signals des Coomassie blue Farbstoffs bei m/z 804,3; **T** bedeutet: Trypsin Autoproteolyseprodukt; mit Met-ox ist das Signal des Peptides mit oxidiertem Methionin gekennzeichnet; Cys-aa gibt an, daß ein Cysteinrest mit Acetamid modifiziert wurde; Cys-am steht für einen Acrylamid modifizierten Cysteinrest.

Spot Nr*	Protein- bezeichnung /Organismus	NCBI Acc. Nr.	berechnet		Geldaten		x von y Signale zuge- ordnet	Sequenz- abdeckung AS von AS
			24.8.98	MW / [Da]	MW / [kDa]	pI		
1	synth. construct LacI	AJ223123	38590,4	6,39	40	7,0-8,0	10/11	62 226/360
2	TrbG Plasmid RP4	/ 348628	32583,2	6,53	30	5,5-6,5	6/14	49 146/297
3	TraL Plasmid RP4	/ 731010	26566,7	5,39	26	5,0-6,0	6/9	51 123/241
4	TrbJ Plasmid RP4	/ 95795	28077,8	9,08	25	5,5-6,5	8/9	51 133/258
5	TrbM Plasmid RP4	/ 348634	22155,9	8,50	20	6,5-7,5	9/10	67 135/199

Tabelle 3-4: Identifizierte 2-DE aufgetrennte Genexpressionsprodukte von pDB126 aus nicht-induzierten *E. coli* Bakterien. * Spotnummerierung aus Abbildung 3-11 c)

Der Abgleich der erhaltenen Peptidmassen gegen die NCBI.24.8.98-Datenbank liefert als Ergebnis die Identifizierung der Proteine: Lactose Operon Repressor (LacI), TrbG, TraL, TrbJ und TrbM (die 4 letztgenannten je von RP4). Tabelle 3-4 faßt das Ergebnis zusammen und gibt Aufschluß über die Güte der Analysen. In Tabelle 3-5 sind die einzelnen Zuordnungen der massenspektrometrischen Daten aus den Experimenten aufgeführt. Der Lactose Operon Repressor bewirkt das Auftreten des im Gel von pDB126 und von pGZ119EH gemeinsamen Spots.

Spot Nr	m/z von [M+H] ⁺	Bereich			Peptid	Modifi-zierung**
Protein	ge-messen	berech-net	Δ ppm	von AS	bis AS	Aminosäuresequenz*
1.) LacI	814,49	814,48	14,02	52	59 (R)VAQQLAGK(Q)	
	846,43	846,47	-41,47	256	263 (R)AITESGLR(V)	
	988,50	988,54	-42,22	295	303 (R)LLGQTSVDR(L)	
	1068,54	1068,58	-36,85	208	216 (R)NQIQPIAER(E)	
	1139,57	1139,62	-44,22	23	33 (R)VVNQASHVSAK(T)	
	1167,68	1167,71	-23,58	315	325 (K)GNQLLPVSLVK(R)	
	1184,66	1184,70	-37,22	304	314 (R)LLQLSQGQAVK(G)	
	1188,61	1188,64	-24,03	341	351 (R)ALADSLMQLAR(Q)	
	1204,60	1204,64	-33,77	341	351 "	1Met-ox
	1357,72	1357,71	6,21	328	340 (K)TTLAPNTQTASPR(A)	
	1485,84	1485,80	27,78	327	340 (R)KTTLAPNTQTASPR(A)	
	1560,85	1560,81	28,34	87	101 (R)ADQLGASVVVSMVER(S)	
	1576,81	1576,80	4,07	87	101 "	1Met-ox
	1590,78	1590,80	-6,73	38	51 (K)VAAAMAELNYIPNR(V)	
	1803,93	1803,94	-5,66	85	101 (K)SRADQLGASVVVSMVER(S)	
	1847,94	1847,93	5,97	36	51 (R)EKVAAAMAELNYIPNR(V)	
	2477,21	2477,24	-9,99	1	22 (-)MKPVTLYDVAEYAGVSYQTCSR(V)	
	2488,43	2488,45	-6,83	60	84 (K)QSLLIGVATSSLALHAPSQIVAAIK(S)	
	2736,48	2736,55	-25,56	169	195 (R)LGVEHLVALGHQQIAALLAGPLSSVSAR(L)	
	2929,32	2929,40	-28,90	264	290 (R)VGADISVVGYDDTEDSSCYIPPLTIK(Q)	1Cys-am
2.) TrbG	823,41	823,43	-22,58	219	225 (R)VYNDGKK(T)	
	1057,50	1057,53	-21,95	36	44 (K)NPELTAQER(A)	
	1113,59	1113,58	8,89	269	277 (R)YIVDTIFDK(A)	
	1286,74	1286,71	25,77	278	290 (K)AILIAGVGSSQDR(V)	
	1668,95	1668,86	51,23	264	277 (R)VQGDRYIVDTIFDK(A)	
	1831,88	1831,82	31,91	248	263 (R)EGGLFSDDDETVMVNVR(V)	
	1984,08	1984,02	29,24	52	71 (K)KWEAGTAGMRPVAGPGGSVR(F)	
	2089,05	2089,00	25,22	158	175 (R)TQYMPQVSFTYPEDALAK(W)	
	2394,28	2394,25	13,03	226	246 (K)TIIQMPHSMEQTEAPTLVVR(R)	
	2410,25	2410,25	3,06	226	246 "	1Met-ox
	3088,50	3088,54	-12,88	191	218 (K)TIPQTGEYLGNLSFNYSVSGSTSWKPVR(V)	
3.) TraL	925,52	925,53	-7,06	4	11 (K)IHMVLQGK(G)	
	941,48	941,52	-51,56	4	11 "	1Met-ox
	1140,48	1140,50	-21,44	196	204 (R)DFSDMLQER(L)	
	1148,63	1148,67	-31,11	17	27 (K)SAIAAAIAQYK(M)	
	1156,47	1156,49	-22,88	196	204 (R)DFSDMLQER(L)	1Met-ox
	1168,69	1168,73	-33,57	179	189 (R)VSSIIIQIPALK(E)	
	1332,64	1332,66	-11,24	57	68 (R)LNIMAGDEINSR(N)	
	1348,64	1348,65	-10,00	57	68 "	1Met-ox
	1402,77	1402,77	1,54	229	241 (R)RGLFEQLDAAVL(-)	
	1460,81	1460,80	4,06	69	81 (R)NFDTLVELIAPTK(D)	
	1488,77	1488,76	10,09	56	68 (R)RLNIMAGDEINSR(N)	
	1504,73	1504,75	-17,94	56	68 "	1Met-ox
	1522,80	1522,83	-17,48	17	30 (K)SAIAAAIAQYKMDK(G)	
	1904,05	1904,05	-1,73	179	195 (R)VSSIIIQIPALKEETYGR(D)	
	1924,97	1924,97	0,52	205	221 (R)LTFDQALADESLTIMTR(Q)	
	1940,94	1940,96	-12,53	205	221 "	1Met-ox
	2240,06	2240,05	3,20	31	50 (K)GQTPLCIDTDPVNATFEGYK(A)	1Cys-am
	2614,30	2614,22	31,97	28	50 (K)MDKGQTPLCIDTDPVNATFEGYK(A)	1Cys-am
4.) TrbJ	806,40	806,42	-20,18	157	163 (K)ANDALFR(G)	
	837,41	837,41	-2,22	58	63 (K)QIEEYR(T)	
	880,46	880,46	-0,90	245	251 (K)LREGSYR(A)	
	905,43	905,43	3,29	142	148 (K)AMEENRR(L)	
	934,50	934,51	-12,67	156	163 (K)KANDALFR(G)	
	1049,49	1049,53	-41,99	118	125 (K)FKDVSYYKF(G)	1Cys-am

Spot Nr	m/z von [M+H] ⁺	Bereich	Peptid	Modifi-			
Protein	ge- messen	berech- net	Δ ppm	von AS	bis AS	Aminosäuresequenz*	zierung**
evtl.:	1049,49	1049,52	-28,11	141	148 (R)KAMEENRR(L)		1Met-ox
	1075,52	1075,56	-37,31	174	183 (K)SDAATLEQLK(G)		
	1130,54	1130,58	-37,22	164	173 (R)GLDQQQSNLK(S)		
	1236,57	1236,62	-41,60	106	117 (K)NQAGSIDAYLGKN(F)		
	1659,68	1659,67	3,74	126	140 (K)GSPCFSLSGCSESER(K)		2Cys-aa
	1673,68	1673,69	-7,08	126	140 "		Cys-aa +Cys-am
	1687,71	1687,71	2,61	126	140 "		2Cys-am
	1815,79	1815,80	-3,83	126	141 (K)GSPCFSLSGCSESER(K)		2Cys-am
	2198,14	2198,14	2,20	215	234 (R)GLLLAQONAIATQMQAQQDR(Q)		
	2214,12	2214,13	-4,65	215	234 "		1Met-ox
	3151,68	3151,56	38,18	186	214 (K)ATTAQGQLEALGYANQFASQQANQLMQIR(G)		
5.)	920,44	920,51	-74,68	60	66 (R)YFGIHKR(K)		
TrbM	1221,57	1221,59	-18,66	105	115 (R)CDASSLNSVLR(E)		1Cys-aa
	1235,58	1235,61	-20,60	105	115 "		1Cys-am
	1400,62	1400,62	-2,50	119	129 (R)SWDDQFYIGNR(L)		
	1591,73	1591,73	4,62	183	195 (R)QQQYGRYGSAYR(R)		
	1706,83	1706,83	-0,72	105	118 (R)CDASSLNSVLR(S)		1Cys-am
	2190,96	2190,96	-0,82	152	170 (R)YVGTPPEEGGYWIEAADYDR(A)		
	2505,11	2505,11	-0,93	130	151 (R)LPDYCAAYTGHAYTDFNTTAPR(Y)		1Cys-aa
	2519,13	2519,13	-0,06	130	151 "		1Cys-am
	2665,29	2665,27	-3,50	36	59 (R)LACEAILCLSTGSRPSECSPSLR(Y)		2Cys-aa +1Cys-am
	2679,31	2679,29	-5,46	36	59 "		1Cys-aa +2Cys-am
	2693,30	2693,31	-4,11	36	59 "		3Cys-am
	2848,42	2848,43	-1,83	76	100 (R)LNFLNLCPVSNQTPEMQTLVSSISR(G)		1Cys-am
	2862,45	2862,45	-1,39	76	100 "		1Cys-am

Tabelle 3-5: detaillierte Übersicht der mit MS-Fit zugeordneten massenspektrometrisch ermittelten Peptidmassen und deren jeweilige Abweichung vom theoretischem Wert. MS-Fit ist ein Programm des web-gestützten „Protein Prospector“ Paketes (<http://prospector.ucsf.edu>) von Peter R. Baker, und Karl R. Clauser.

* N-terminal vorangehende AS sowie C-terminal folgende AS stehen in Klammern

** Cys-aa = Acetamid-modifiziertes Cystein; Cys-am = Acrylamid-modifiziertes Cystein;
Met-ox = oxidiertes Methionin (Sulfoxid).

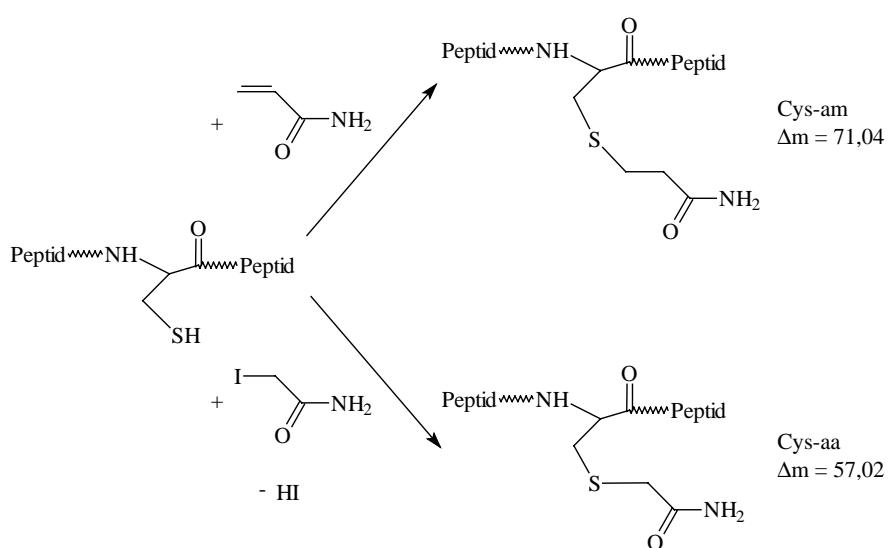


Abbildung 3-13: Alkylierung reduzierter Cysteinreste durch Acrylamid (oben) und Iodacetamid (unten)

Die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Identifizierung erhöht sich durch die massenspektrometrische Beobachtung mehrerer Reaktionsprodukte aus zwei Typen proteinchemischer Umsetzungen: a) der Alkylierung von Cysteinresten und b) der Oxidation von Methionin.

Bei TrbJ und TrbM werden nebeneinander Acrylamid und Acetamid-modifizierte Cysteinreste der Abbausteine nachgewiesen. In den Spektren der Proteolyseprodukte dieser Proteine (Spektren b) und c) in Abbildung 3-12) zeigen sich deren Signale als Mehrfach-*Peaks*, welche jeweils eine Massendifferenz von 14,0 Da zueinander aufweisen. Peptide mit Cysteinresten, welche eine freie reduzierte Thiolgruppe enthalten, wurden dagegen nicht gefunden. Die Addition des Acrylamids erfolgt während der Elektrophorese durch die offensichtliche Anwesenheit von nicht polymerisierten Acrylamidmonomeren im Gel. Dagegen werden verbleibende Thiolgruppen (auch aus reduzierten Disulfidbrücken) gezielt mit Iodacetamid modifiziert (s. Abbildung 3-13.). Dies geschieht im Rahmen der Probenpräparation bei der Prozessierung der in den ausgeschnittenen Gelspots enthaltenen Proteine durch Reduktion und anschließende Alkylierung (wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben).

Bis auf das TrbM-Abbauspektrum lassen sich in den Spektren aller übrigen vier Proteinabbau-gemische Peptide mit teilweise oxidiertem Methionin nachweisen. Die vermutlich durch Luftsauerstoff oxidierten, um 16,0 Da schwereren Peptide bewirkten Signale von etwa 5-10% der Intensität der nicht oxidierten Spezies.

3.2.2. Verfeinerte manuelle Auswertung der massenspektrometrischen Daten durch Berücksichtigung möglicher Signalpeptide

Das aus der Sequenz von TrbJ berechnete MW beträgt 28,1 kDa, sein pI 9,08. Nachgewiesen wurde TrbJ dagegen im Gel bei ~25 kDa und einem pI im Bereich von 5,5-6,5. Ähnliche Abweichungen von den berechneten Werten zeigen sich beim TrbM und TrbG. Diese Proteine wurden im Gel bei MW ~20 kDa / pI 6,5-7,5 bzw. MW 30 kDa / pI 5,5-6,5 gefunden. Das berechnete MW von TrbM beträgt zwar 22,1 kDa jedoch würde sein pI in Lösung bei 8,5 liegen. Da die isoelektrische Fokussierung nicht bis zum Ende durchgeführt wurde (beschrieben bei Klose, (1975), Klose & Kobalz, (1995)), wird die erste Dimension der 2-DE Trennung auch durch die Mobilität der Proteine beeinflußt. Größere Abweichungen der experimentellen pI-Werte von den theoretischen Werten sind daher zu erwarten.

TrbG

1	11	21	31	41
<u>MKKELFALVL</u>	AASVSVPAFA	<u>ADPGADLTDL</u>	<u>YFSGK</u> NPELT	AQER AAIAIA
51	61	71	81	91
K <u>KWEAGTAGM</u>	RPVAGPGGSV	R FLFGAQQPS	IVCAVLQVCD	VALQPGEQVN
101	111	121	131	141
SINLGDTARW	TVEPAITGSG	ANETQHLIIK	PMDVGLETSL	VVTTDRRSYH
151	161	171	181	191
<u>MRLRSHRTQY</u>	MPQVSFTYPE	<u>DALAK</u> WDAIK	<u>NREQQRDRVEK</u>	TIPQTGEYLG
201	211	221	231	241
NLSFNYSVSG	STSWKPVRVY	NDGKKTIIQM	PHSMEQTEAP	TLLVVRRREGG
251	261	271	281	291
LFSDDETVMV	NYRVQGDRYI	VDTIFDKAIL	IAGVGSSQDR	VTISRGN

TrbJ

1	11	21	31	41
<u>MKKLAKNVLA</u>	<u>AKVALVLALS</u>	<u>VGTLAVTPAQ</u>	<u>A</u> GIPVIDGTN	LSQTTVTAIQ
51	61	71	81	91
QVAQVQK<u>QIE</u>	EYR TQLQQYE	NMLQNTVAPA	AYVWDQAQST	INGLMSAVDT
101	111	121	131	141
LNYYK<u>NQAGS</u>	IDAYLG<u>KFKD</u>	VSYY<u>KGSPCF</u>	SLSGCSESER	KAMEENRR<u>LA</u>
151	161	171	181	191
SESQK<u>KANDA</u>	LFRGLDQQQS	NLK<u>SDAATLE</u>	QLK<u>GK</u>ATTAQ	GOLEALGYAN
201	211	221	231	241
QFASQQANOL	MQ<u>IRGLLLAQ</u>	QNAIATQMQA	QQDR<u>QAQQDA</u>	AGAK<u>LREGSY</u>
251				
RASPS<u>KTW</u>				

TrbM

1	11	21	31	41
<u>MQLKKAFSSA</u>	<u>ALVVALGLGA</u>	<u>TGSASA</u> QDVL	TGDTR<u>LACEA</u>	ILCLSTGSRP
51	61	71	81	91
SECSP<u>SLSRY</u>	FGI<u>HKR</u>KLSD	TLK<u>KAR</u>LNFLN	LCPVSNQTPE	MQTLVSSIS<u>R</u>
101	111	121	131	141
GAGR<u>CDASSL</u>	NSVL<u>REWR</u>SW	DDQFYIGNRL	PDYCAAYTGH	AYTDFNTTAP
151	161	171	181	191
RYVGTPEEGG	Y<u>WIEAADYDR</u>	ALKEYEAKLK	ER<u>QQQYGRY</u>G	SDAYR<u>RFER</u>

Abbildung 3-14: Fettdurck: Sequenzabdeckung durch die massenspektrometrisch nachgewiesenen Peptide für Trb-G, -J und -M. Grau hinterlegt sind bestimmte und vorhergesagte Signalsequenzen (berechnet mit SPSCAN, nach dem McGeoch Algorithmus / von Heijne Regeln (Nielsen, Engelbrecht et al., (1997)), Von Heijne, (1987), Teil des GCG Paketes); tryptische Spaltstellen sind unterstrichen.

Die Einordnung der massenspektrometrisch identifizierten Peptide in die Aminosäuresequenz (Abbildung 3-14) verdeutlicht, daß vornehmlich Peptide aus dem C-terminalen Bereich von TrbJ und TrbM gefunden werden. Zum N-terminalen Sequenzbereich lassen sich dagegen keine Peptide zuordnen.

Nach berücksichtigter Abspaltung der mit dem Programm SPSCAN berechneten Signalpeptide, ergeben sich für MW und pI neue Werte (Tabelle 3-6), die besser mit den genannten gelelektrophoretisch gewonnenen Daten übereinstimmen (vgl. Tabelle 3-4). Die Abspaltung der Signalpeptide wird daher auch in die Neuberechnung möglicher Peptidmassen einbezogen. Dies führt dazu, daß im Spektrum des tryptisch verdauten TraGs (Gelspot Nr. 2) zwei bisher unerklärbare Signale eindeutig dem prozessierten N-Terminus zugeordnet werden können (Spektrum a) in Abbildung 3-12). Es handelt sich um das vollständig proteolysierte Peptid 21-35 bei m/z 1569,7 und das durch unvollständigen tryptischen Abbau entstandene Peptid 21-44 bei m/z 2608,3. Ebenfalls lassen sich nun für TrbJ (Gelspot 4) und TrbM (Gelspot 5) die entsprechenden tryptischen Abbaupeptide des prozessierten N-Terminus bei m/z 2709,5 bzw. m/z 1004,5 zuordnen (Spektrum b) und c) in Abbildung 3-12). Der Befund stimmt mit den von Lessl durch Edman-Sequenzierung ermittelten N-Termini der Proteine TrbG und TrbJ überein. Außerdem wird die Abspaltung des für TrbM vorhergesagten Signalpeptids experimentell bestätigt (Lessl, Balzer et al., (1992)).

Auf diese Weise ergibt sich auch eine deutlich höhere Sequenzabdeckung für die jeweiligen massenspektrometrischen Peptidkartierungen, wodurch die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Proteinidentifizierung steigt (s. Tabelle 3-6).

Protein	vorhergesagtes Signalpeptid von AS - bis AS	prozessiertes Protein neue Parameter:			Verbesserung der Sequenz- abdeckung um*
		MW / [Da]	pI.	MS-Sequenzabdeckung	
TrbG	1-20	30508,5	6,13	58 % 161 / 277 AS	9%
TrbJ	1-31	25004,9	8,14	70 % 159 / 227 AS	19%
TrbM	1-26	19724,0	7,59	83 % 144 / 173 AS	16%

*Tabelle 3-6: Phys. Daten der Proteine und Sequenzabdeckung durch massenspektrometisch identifizierte Peptide nach Abspaltung der vorhergesagten Signalsequenz; * verglichen mit Tabelle 3-4.*

3.3. Der Weg zur automatischen MALDI-MS Auswertung

3.3.1. Identifizierung monoisotopischer und unaufgelöster MALDI-MS-Signale

Zur automatischen Auswertung von MALDI-MS Spektren wurde das LabView-Programm „MALDI-MS Peak Processor“ erstellt. Dieses zerlegt ein MALDI Massenspektrum zunächst in Einzelfragmente $\approx \sim 400$ Da Breite, deren Randbereichen sich um jeweils 10% überlappen. Die spektralen Fragmente werden dann einzeln von einer LabView eigenen *Peak*-Detektionsroutine unter Berücksichtigung des Rauschniveaus analysiert. Die hieraus resultierenden *Peak*-Listen werden nach *Peak*-Multipletts durchsucht, deren m/z- und Intensitäts-Werte an eine Kurvenfittingroutine übergeben werden. Da sich MALDI-massenspektrometrische Signale am besten mit Gaußkurven simulieren lassen (Loska & Ptasinski, (1994)), werden mit Hilfe des Levenberg-Marquardt Algorithmus (Press, Flannery *et al.*, (1989), National Instruments, (1998)) bis zu 5 Gaußkurven (um etwa eine Neutronenmasse separiert) an die Rohdaten des Spektrums angepaßt. Die aus der ersten *Peak*-Detektion stammenden Daten dienen hierbei als Ausgangsparameter für den Multi-Gaußkurvenfit. Die Maxima der Gaußkurven (entspr. *Centroide*) werden anschließend nach ihren Intensitäten und m/z Werten untersucht und das jeweils leichteste Isotop eines Multipletts als „monoisotopischer *Peak*“ ermittelt. Innerhalb gewisser Grenzen werden ineinander gelaufene Isotopenverteilungen automatisch anhand des Verteilungsmaximums erkannt und getrennt (Algorithmus in Anlehnung an (Loska & Ptasinski, (1994))). Isotopisch aufgelöste und nicht aufgelöste Signale werden in zwei verschiedenen Listen gespeichert und nach Signal / Rauschverhältnis sowie nach ihrer Intensität gewichtet. Die Darstellung des Spektrums erfolgt in 3 beliebig einstellbaren Teilen. Abbildung 3-15 zeigt beispielhaft das Peptid-Massenspektrum von tryptisch verdautem MetHis₆-TraH (*vide infra*).

* MALDI-MS Peak Processor: MALDI-MS Signalanalyse, © 1997 Markus Kalkum

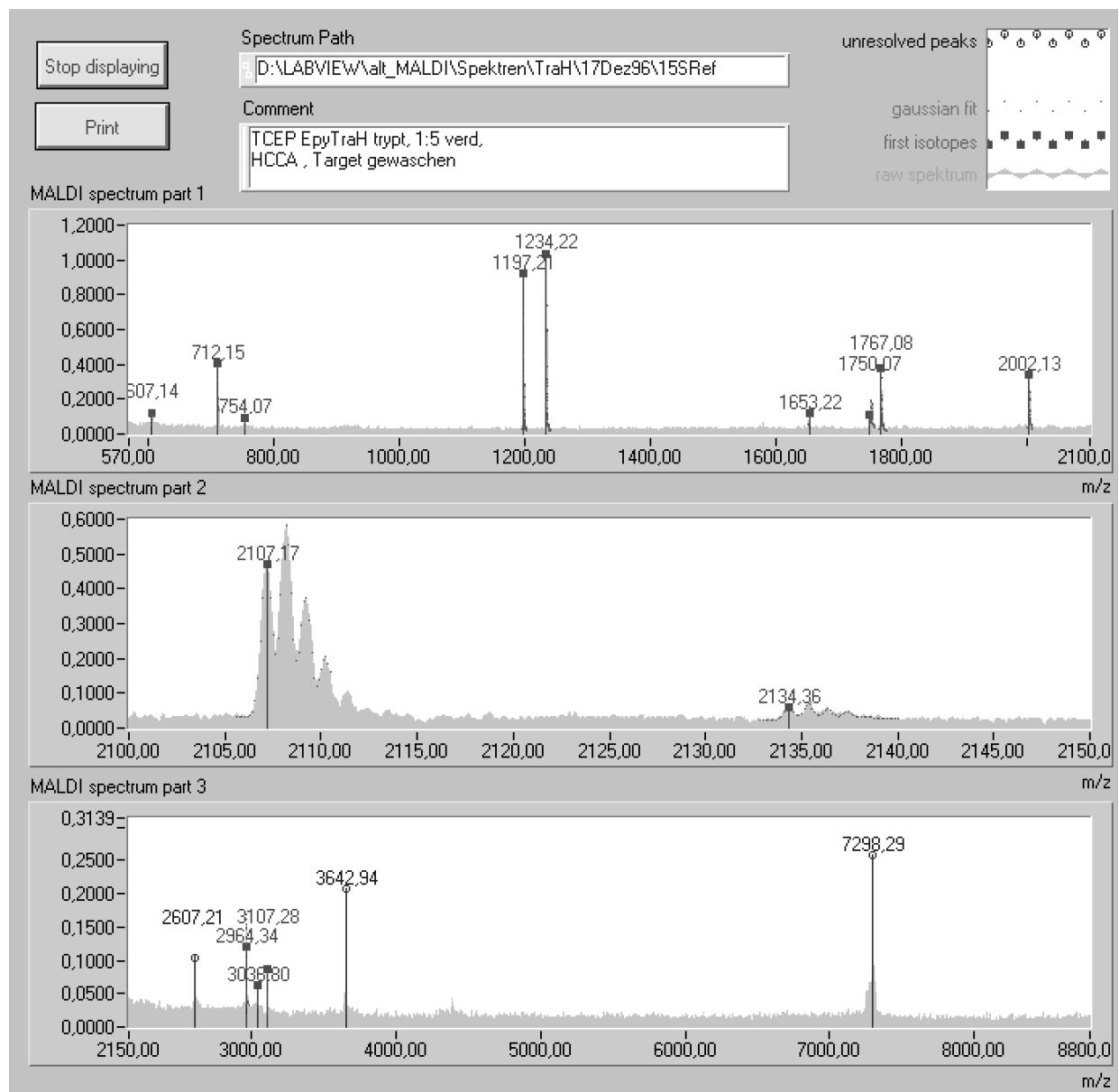


Abbildung 3-15: Automatische Signalanalyse mit dem „MALDI-MS Peak Processor“: tryptische Abbaupeptide von MetHis₆-TraH. In „part 2“ (mittleres Spektrum) ist der automatische Multi-Gaußkurvenfit zweier Peptid-Signale bei m/z 2107,17 und 2134,36 nach Levenberg-Marquardt zu sehen (gepunktete Kurven).

■ monoisotopischer Peak; ◎ nicht isotopisch aufgelöstes Signal (mittleres m/z)

3.3.2. Die Isotopenverteilung natürlicher Peptide als Hilfsmittel zur Analyse massenspektrometrischer Signale.

Die Erkennung des monoisotopischen *Peaks* bereitet besonders bei schwachen Signalen, bei „schweren“ Peptiden und bei überlagerten Isotopenverteilungen Schwierigkeiten. In schwachen Signalen wird die statistische Verteilung der Isotope nicht richtig wiedergegeben, da offensichtlich zu wenig Ionen vorhanden sind. Der monoisotopische Peak schwerere Peptide (≥ 4000 Da) ist oftmals von so geringer Intensität, daß er vom Rauschen überlagert wird und auch nicht mehr über den Gaußkurvenfit (*vide supra*) extrapoliert werden kann. Überlagerte Isotopenverteilungen können häufig nicht automatisch separiert werden, wenn diese nur ein gemeinsames Verteilungsmaximum (d.h. einen intensivsten *Peak*) aufweisen.

Aus diesen Gründen mußten die Isotopenverteilungen vieler Peptide untersucht werden. Hierzu wurde unter LabView das Programm „IsoSim“* geschrieben, welches die Isotopenverteilungen beliebig vieler zufällig zusammengestellter Peptide berechnet, und diese in Abhängigkeit ihrer Masse graphisch darstellt (s. Abbildung 3-16). „IsoSim“ liegt der von Rockwood und Van Orden entwickelte Algorithmus zur ultraschnellen Berechnung molekularer Isotopenverteilungen zugrunde. Dieser verwendet Fourier Transformationen, um die Intensitäten der **Isotopen-Peaks** (IPs) anhand stöchiometrischer Formeln und den natürlich auftretenden Häufigkeiten der Isotope der Elemente zu berechnen (Rockwood & Van Orden, (1996), Rockwood, Van Orden *et al.*, (1995) und (1996)).

Wie in Abbildung 3-16 zu sehen ist, verändern sich die berechneten, massenabhängigen Intensitäten der einzelnen IPs zueinander in definierten Grenzen. Unterhalb von $m/z \sim 1500$ weist der monoisotopische IP eines Peptids immer die höchste Intensität des Peak-Multipletts auf. Zwischen $m/z \sim 2200$ und 2800 hat in der Regel der 2. IP die maximale Intensität. Um $m/z \sim 3600$ bis ~ 4200 sind die Signale der 3. IPs am intensivsten und von $m/z \sim 5200$ bis ~ 6000 bildet der 4. IP das Maximum einer Verteilung. In den jeweils dazwischen liegenden Bereichen ist das Verteilungsmaximum von der exakten chemischen Zusammensetzung des Peptids abhängig. Es kommt sogar vor, daß zwei benachbarte IPs die gleiche Intensität aufweisen. Abbildung 3-17 stellt die experimentelle Bestätigung dieser Regel an Beispielen gemessener und berechneter Isotopenverteilungen einiger Peptide dar.

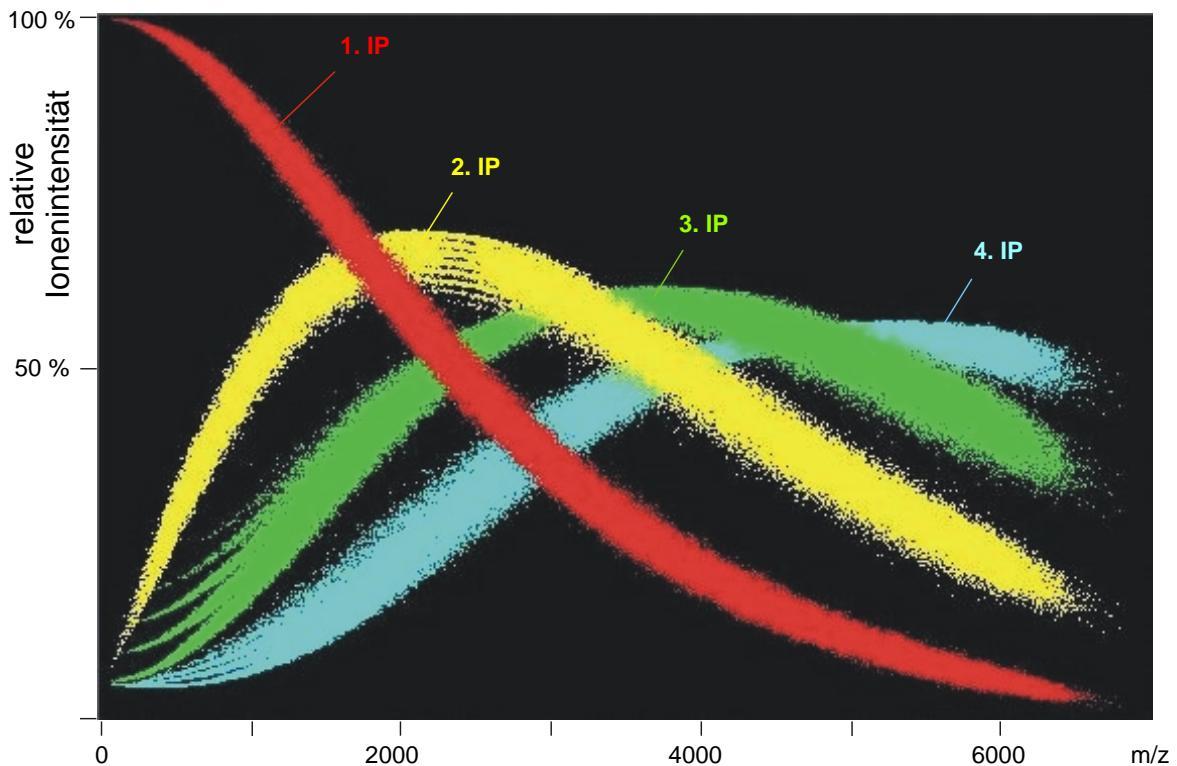


Abbildung 3-16: Simulierte Isotopenverteilungen von 10^5 Peptiden, die im Massenbereich von 0 bis 7000 Da nach dem Zufallsprinzip generiert wurden. Gezeigt sind die m/z -abhängigen Intensitätsverteilungen der ersten 4 Isotopen-Peaks (1. IP bis 4. IP). Zu einem Peptid gehört jeweils ein Punkt aus jeder Kurve, der von IP zu IP um ca. eine Neutronenmasse auf der m/z -Skala entfernt liegt. Die relative „Ionenintensität“ bezieht sich auf die berechnete Wahrscheinlichkeitsverteilung für alle IPs (1. - ∞ . IP). Die Verteilungen gelten jeweils für unendlich viele Molekülionen eines Peptids. Die erkennbaren diskreten Bereiche sind in Abbildung 3-19 dargestellt und im Text erläutert.

* IsoSim: Simulation von Isotopenverteilungen, © 1998 Markus Kalkum - MPI für molekulare Genetik, Berlin

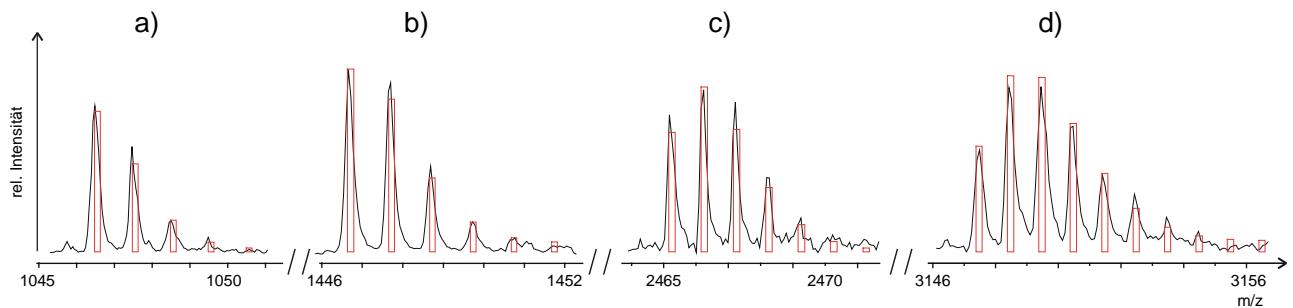


Abbildung 3-17: Mit MALDI-MS bestimmte und berechnete Isotopenverteilung (Balkendarstellung) einiger Peptidstandards.

- a) Angiotensin-II H-DRVYIHPF-OH
- b) Neurotensin 1-11 PY^{ro}ELYENKPRRPY-OH
- c) ACTH 18-39 H-RPVKVYPNGAEDESAEAFPLEF-OH
- d) Somatostatin-28 H-SANSNPAMAPRERKAGCKNFFWKTFTSC-OH

Ähnliche Massenabhängigkeit zeigen auch die Isotopenverteilungen anderer Verbindungen, die nur aus H, C, N, O und S aufgebaut sind. In den Spektren tryptischer Abbauproteine von Coomassie gefärbten Proteingelbanden findet sich häufig ein Signal-Multiplett bei m/z 804,2-807,3, in dem der 2. IP oftmals das Intensitätsmaximum bildet (Abbildung 3-18). Aufgrund der beschriebenen Regeln (*vide supra*) wird klar, daß dieses Multiplett nicht von einem einzelnen Peptid herrühren kann. Mit Einzelmessungen und berechneten Isotopenverteilungen läßt sich klären, daß die Signale auf den Farbstoff Coomassie blue und ein Autoproteolyseprodukt des Trypsins (AS 98-105) zurückzuführen sind.

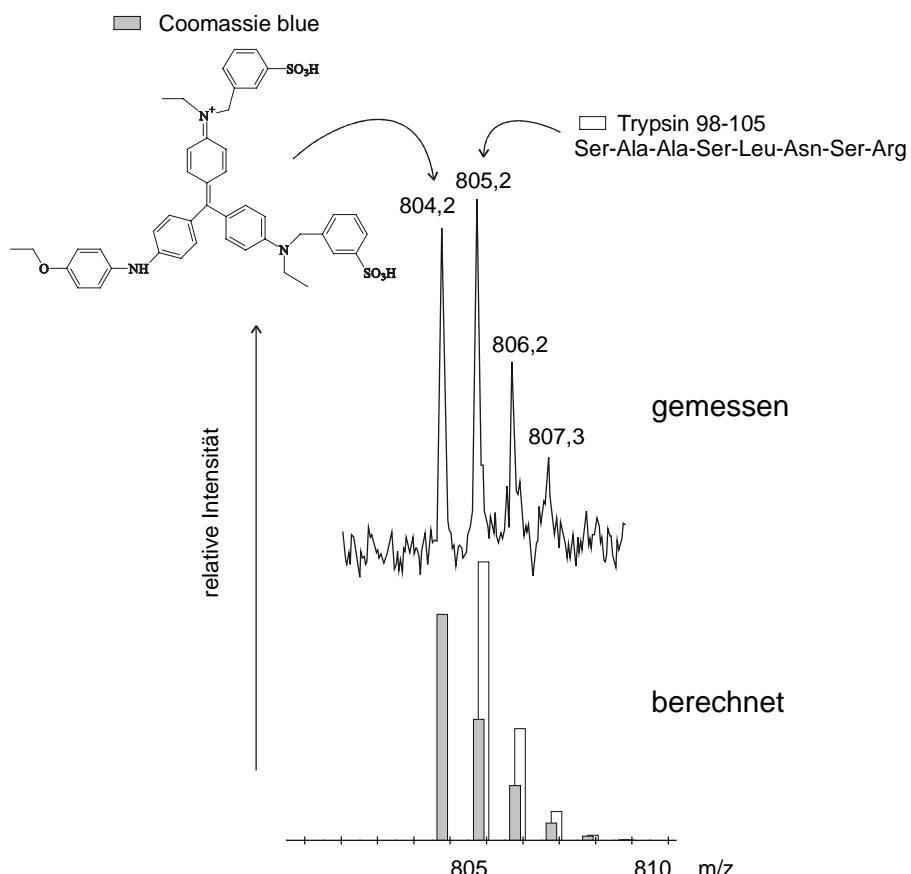


Abbildung 3-18: Die überlappenden Signale von Coomassie blue und dem tryptischen Autoproteolysepeptid AS 98-105 werden anhand Isotopenverteilung identifiziert, da diese im dargestellten m/z -Bereich für Peptide untypisch ist.

Der Messung liegt der Trypsin-Abbau einer Coomassie gefärbten Protein-Gel-Bande zugrunde. (TrbG Abbau).

In den in Abbildung 3-16 gezeigten, berechneten Intensitätsverteilungen der IPs 1-4 sind bei

näherer Betrachtung Feinstrukturen zu erkennen (s Abbildung 3-19). Besonders deutlich werden z.B. die jeweils 2. IPs zwischen m/z 2200-2400 in diskrete, relative Intensitätsbereiche unterteilt. Durch Einschränkung der AS-Auswahl bei der zufälligen Zusammenstellung der Peptide kann dieser statistische Effekt erklärt werden: Er ist auf das Vorhandensein von Schwefel in Cys- und Met-haltigen Peptiden zurückzuführen und wird durch die Kombination der 20 verschiedenen vordefinierten AS in den in Abbildung 3-19 aufgeführten m/z-Bereichen sichtbar. Der Effekt lässt sich unabhängig vom Rechenweg auch mit der klassischen kombinatorischen Methode nach Yergey, (1983), nachweisen. Identische Isotopenverteilungen werden z.B. mit dem Programm „IsoPro 3.0“ von Mike Senko berechnet, welches auf dem Yergey-Algorithmus beruht.

Durch MALDI-MS kann diese Feinstruktur derzeit nicht experimentell bestimmt werden, da die in den Messungen auftretenden Intensitätsschwankungen für zu groß befunden werden (s. Isotopenverteilungen in Abbildung 3-17).

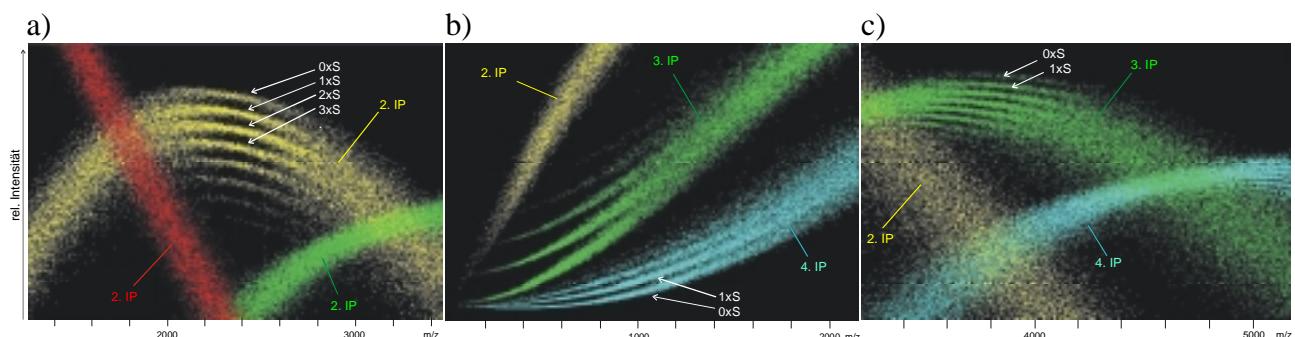


Abbildung 3-19: massenabhängige Feinstruktur der berechneten Intensitätsverteilung des a) 2. Isotopen-Peak (IP), b) & c) 3. & 4. IP beliebig generierter Peptide (vergrößerte Ausschnitte aus Abbildung 3-16). Im m/z-Bereich von 2200-2400 sind in a) die 2. IPs die intensivsten. Peptide ohne S zeigen relativ zur übrigen Verteilung ein intensiveres 2. IP als die mit einem oder mehreren S-Atomen. In b) sind im m/z-Bereich von ~200-1000 die Intensitäten des 3. und 4. IP von Peptiden ohne S weniger intensiv als die der schwefelhaltigen. Im m/z Bereich ~3600-3800, c), sind die 3. IPs schwefelfreier Peptide die intensivsten, oberhalb von m/z 5000 die Signale der jeweils 4. IP (bis m/z ~5200).

3.4. Die posttranslationalen Modifizierungen der Genprodukte von *traH* und *trbK*

3.4.1. Automatisierte MALDI-MS Peptidkartierung und manuelle ESI-MS Untersuchung von TraH

Sowohl das rekombinante MetHis₆-TraH als auch das RP4 kodierte TraH weisen eine charakteristische braune Farbe auf. Das an einer Ni(II)-Nitrilotriessigsäure-Säule aufgereinigte MetHis₆-TraH* aus SCS1(pGZ166) wird durch gelelektrophoretische Trennung weiter gereinigt. Die 23 kDa Bande (nicht gezeigt, s. Pansegrouw, (1991)) wurde ausgeschnitten. Das darin enthaltene Protein wird mit TCEP reduziert und mit 4-Vinylpyridin alkyliert, um sog. „peptide scrambling“ des cysteinreichen Proteins während des proteolytischen Abbaus zu verhindern. Die tryptischen Abbauproteide werden MALDI massenspektrometrisch analysiert und automatisch mit dem „MALDI-MS Peak Processor“ ausgewertet (s. Spektrum in Abbildung 3-15).

Die erhaltenen m/z-Werte der isotopisch aufgelösten Signale werden berechneten monoisotopischen Massen der protonierten Abbauproteide zugeordnet. Die nicht aufgelösten Signale werden gegen die entsprechenden mittleren m/z Werte abgeglichen (s. Tabelle 3-7). Die in Abbildung 3-20 dargestellte Peptidkartierung für TraH lässt eine 100%-ige Sequenzabdeckung erkennen, die durch

* freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. Günther Ziegelin, MPI für molekulare Genetik, Berlin

unvollständigen Abbau und überlappende Peptide zustande gekommen ist. Reduktion und Alkylierung verliefen nicht vollständig. Aufgrund ihrer mehrfachen Detektion bestätigen daher die nicht bis mehrfach ethylenpyridinierten, cysteinhaltenen Peptide, wie AS 75-79 und AS 108-125, zusätzlich ihre Identität.

a) Zuordnung isotopisch aufgelöster Signale:

monoisotopisches m/z von [M+H] ⁺	Bereich	Peptid			
gemessen	berechnet	von AS	bis AS	Aminosäuresequenz*	Modifizierung**
607,14	607,29	75	79	(K)TVCER(C)	
712,15	712,35	75	79	(K)TVCER(C)	1xEpyCys
754,07	754,32	94	97	(K)CYCR(V)	2xEpyCys
1197,21	1197,63	98	107	(R)VMFLVTWSSK(E)	
1234,22	1234,65	83	93	(N)SVWFASPAELK(C)	
1653,22	1653,81	80	93	(R)CPNSVWFASPAELK(C)	1xEpyCys
2002,13	2002,85	108	125	(K)EPNQLTHCDGEFLGQEEG(-)	1xEpyCys
2107,17	2107,90	108	125	(K)EPNQLTHCDGEFLGQEEG(-)	1xEpyCys
2134,36	2135,02	75	93	(K)TVCERCPNSVWFASPAELK(C)	Disulfidbrücke

b) Zuordnung der nicht aufgelösten Signale:

mittleres m/z von [M+H] ⁺	Bereich	Peptid			
gemessen	berechnet	von AS	bis AS	Aminosäuresequenz*	Modifizierung**
3038,80	3038,61	70	93	(R)RPKAKTVCERCPCNSVWFASPAELK(C)	2xEpyCys
3642,94	3641,78	80	107	(R)CPNSVWFASPAELKCYCRMFLVTWSSK(E)	3xEpyCys
7298,29	7298,28	1	69	(-)MHHHHHHSNPNEMTDEIAAAMEAFDLPQPEPPST PQAATATDGTLAPSAPAEPSHSASPTLDALDESR(R)	

Tabelle 3-7: Übersicht der zugeordneten tryptischen Peptide von *MetHis₆-TraH* aus automatischer Auswertung. Die Berechnung und Zuordnung der Peptidmassen erfolgt mit dem unter LabView erstellten Programm „MAP-IT“*.

* N-terminal vorangehende AS sowie C-terminal folgende AS stehen in Klammern

** EpyCys: 4-Ethylenpyridin-S-Cysteinrest

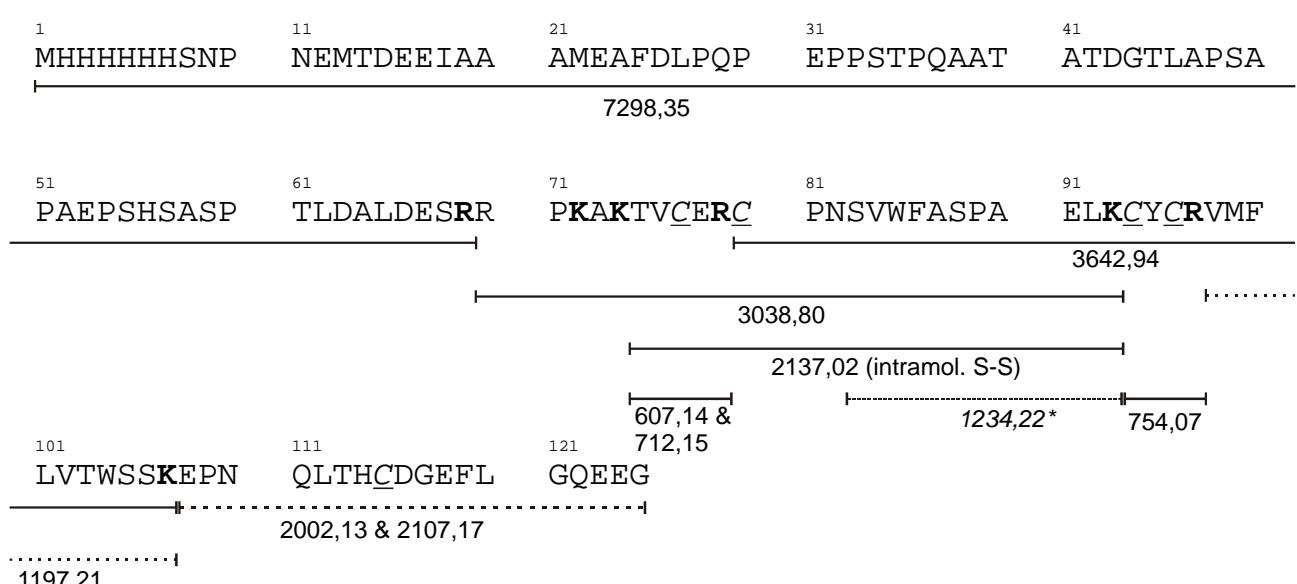


Abbildung 3-20: Kartierung der massenspektrometrisch nachgewiesenen tryptischen Peptide von *TraH*. (* durch ESI-MS/MS bestätigt).

* MAP-IT: Programm zur Berechnung proteolytischer Peptide, © 1997 Markus Kalkum

Im Spektrum sind ferner die folgenden nicht zugeordneten Signale enthalten (s. Abbildung 3-15): m/z 1750,07; 1767,08; 2606,23; 3107,26 und 1234,22. Das letztgenannte Signal kann jedoch durch ESI-MS/MS Analyse eindeutig identifiziert werden. Das doppelt geladene Ion dieses Peptids wird durch den 1. Quadrupol des ESI-MS bei m/z 617,7 isoliert. Die nach Kollision mit N₂ erhaltenen Fragmente werden mit dem 3. Quadrupol analysiert (s. Abbildung 1-3 in Abschnitt 1.1.2). Neben a- und b- Ionen werden hauptsächlich y-Ionen detektiert, aus denen sich die 8 AS lange Teilsequenz (grau hinterlegt) des Undekapeptids SVWFASPAELK ergibt (s. Abbildung 3-21 und Abbildung 3-22). Das Peptid ist dem Sequenzabschnitt AS 83-93 von MetHis₆-TraH zuzuordnen. Es entstand also durch tryptische und durch unspezifische Spaltung der C-terminalen Peptidbindung von Asn⁹² (s. Abbildung 3-20).

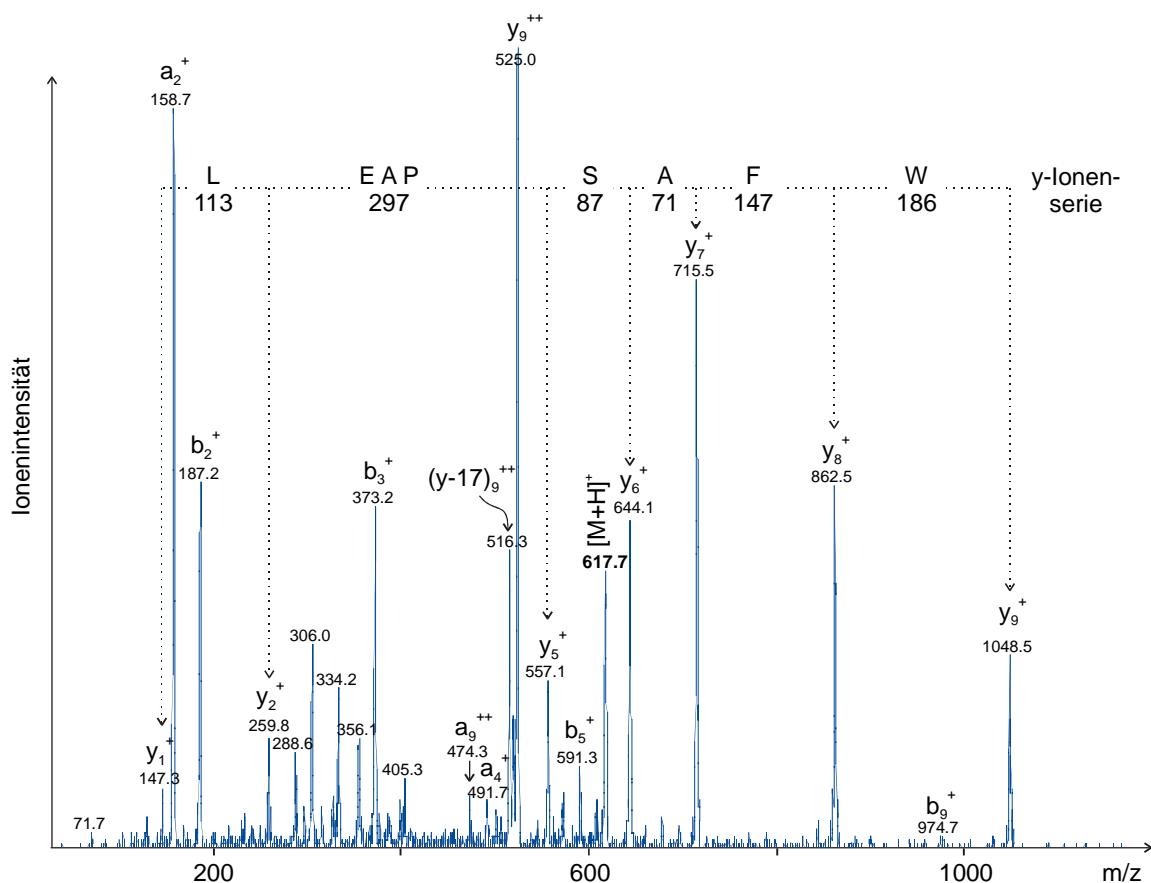


Abbildung 3-21: ESI-MS/MS Analyse des MetHis₆-TraH Peptids AS 83-93 (SVWFASPAELK). Neben Ionen der a- und b-Serie ist die für tryptische Peptide typische y-Ionenserie erkennbar. Nomenklatur der Ionen entsprechend: (Roepstorff & Fohlman, (1984) und Johnson, Martin et al., (1988), s. Abbildung 1-4 in Abschnitt 1.1.2).

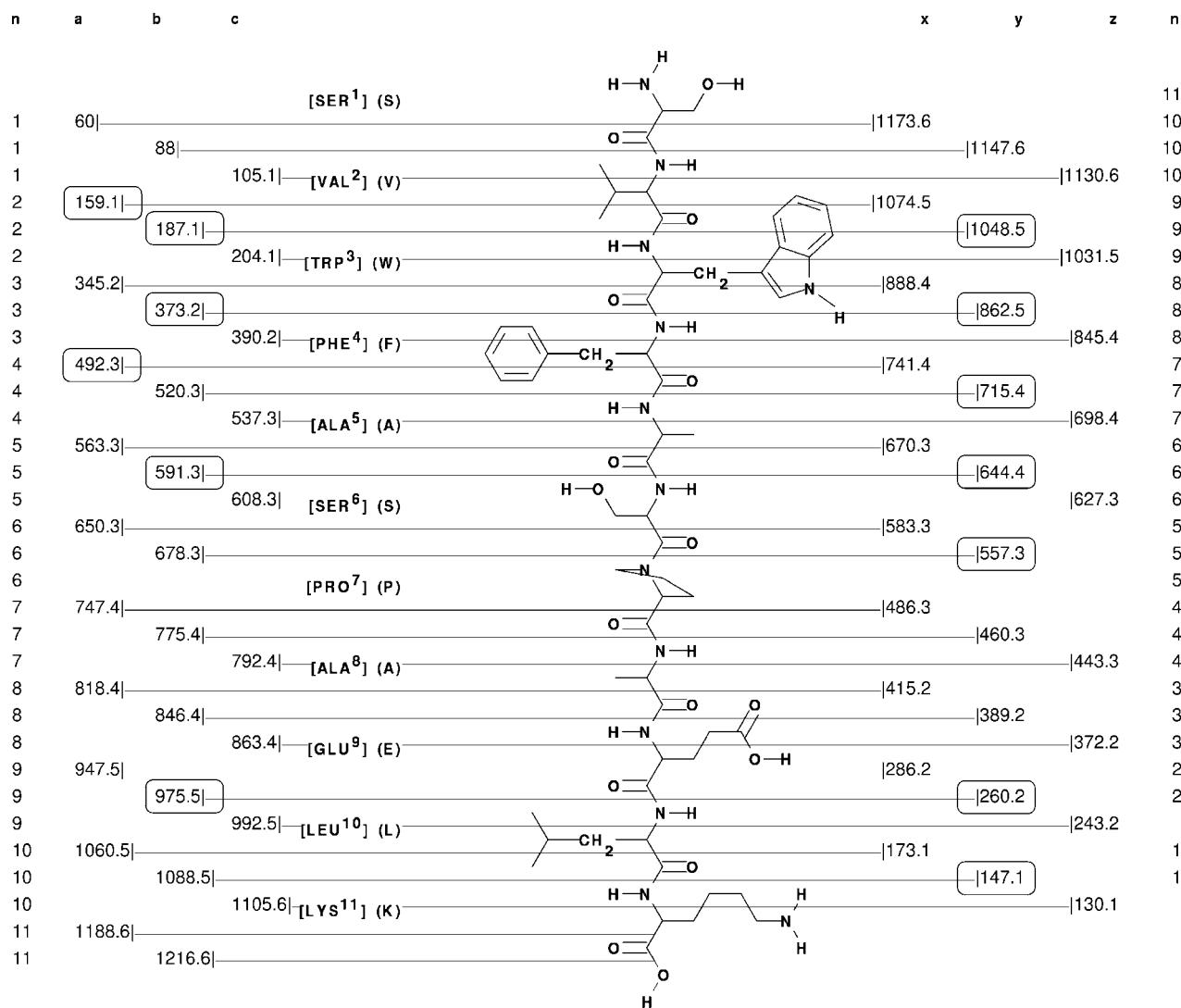


Abbildung 3-22: Berechnete MS/MS Fragmente* für das TraH-Peptid SVWFASPAELK. Die nachgewiesenen Ionen sind umrandet dargestellt (s. Spektrum in Abbildung 3-21).

3.4.2. UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen und komplexchemischer Nachweis von Eisen in TraH

Die Herkunft der braunen Farbe von TraH kann über die massenspektrometrische Peptidkartierung alleine nicht geklärt werden. Das UV/VIS Spektrum von in Wasser gelöstem TraH und MetHis₆-TraH weist eine breite Bande zwischen ~320 und ~460 nm auf deren Maximum etwa bei 400 nm liegt. Wird TraH dagegen in verdünnter Essigsäure gelöst, so nimmt die Intensität der Bande deutlich ab (s. Abbildung 3-23). Die zuvor braunen Lösungen entfärbten sich bei Säurezugabe. Diese Reaktion verläuft irreversibel, entfärbte TraH-Lösungen bleiben auch nach Basenzugabe farblos. In Gegenwart von Dinatrium-EDTA (anstelle von Säure) verschwindet die braune Farbe dagegen nicht.

Werden TraH-Lösungen mit gelben Blutlaugensalz (Kaliumhexacyanoferrat(II)) versetzt, so nehmen diese nach 10-12 h eine erkennbar blaue Farbe an. Dieselbe Färbung stellt sich etwa in der gleichen Zeit nach Zusatz von rotem Blutlaugensalz (Kaliumhexacyanoferrat(III)) ein. Bei Zusatz von Rhodaniden (Thiocyanaten) ist nach 6-8 h eine deutliche Rotfärbung erkennbar.

* berechnet mit PepSeq 3.5 von Frank Lützenkirchen (1996)

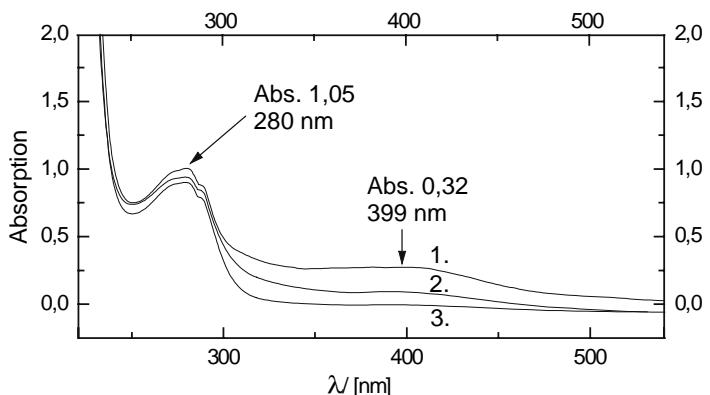


Abbildung 3-23: UV-VIS Spektren von MetHis₆-TraH ($c \sim 2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in:

- 1.) Wasser
- 2.) 0,1% Essigsäure
- 3.) 1,0% Essigsäure

Als Referenz diente das jeweilige Lösungsmittel.

$$\epsilon_{\text{TraH}, \lambda=280} = 13260 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (berechneter Wert)}$$

Das bei 120°C in einer zugeschmolzenen Glasampulle in 6M HCl gewonnene Totalhydrolysat führt (nach Neutralisation) mit Kaliumthiocyanatlösung sofort zur Farbreaktion. Demnach ist TraH ein eisenhaltiges Protein.

3.4.3. Das „entry exclusion“ vermittelnde TrbK ist ein Lipoprotein

Das Genprodukt von *trbK* vermittelt die „entry exclusion“ Funktion der IncP-Plasmide (s. Einleitung, Abschnitt 1.2 und Haase, (1996)). Es enthält eine für Lipoproteine Gram-negativer Bakterien typische Signalsequenz (Lessl, Balzer *et al.*, (1992)) und ist vorwiegend in der Zytosplasmamembran lokalisiert. MALDI-MS Analysen des von Jana Haase, (1996), isolierten, „reifen“ Proteins ergeben für das einfach protonierte Molekülion $[\text{M}+\text{H}]^+$ einen *m/z*-Wert von 6004,3 und *m/z* 3002,7 für das $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$. Diese Werte können der AS-Sequenz (1-69) von TrbK auch nach berücksichtigter Abspaltung des Signalpeptids (1-22) nicht direkt zugeordnet werden (s. Abbildung 3-24). Im ersten Zyklus wird durch Edman-Sequenzierung des „reifen“ TrbK-Polypeptids keine AS nachgewiesen. Die nachfolgenden Schritte ergeben die TrbK-Teilsequenz DNKPTD (Haase, Kalkum *et al.*, (1996)).

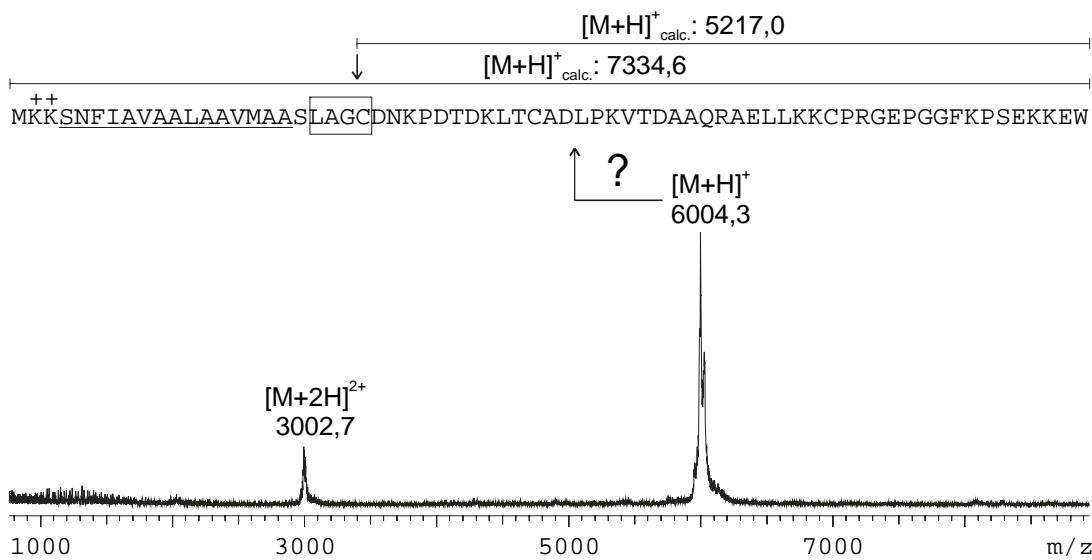


Abbildung 3-24: MALDI-Massenspektrum von prozessiertem TrbK nach Ultrafiltration mit „Microcon 10'000“-Membranfiltern. Die Kalibrierung erfolgte sowohl extern als auch intern (nicht gezeigt) mit Rinderinsulin und Apo-Myoglobin. Die aus der dargestellten TrbK-Sequenz (mit und ohne Signalpeptid) berechneten, nicht zuordnungsfähigen, *m/z*-Werte des $[\text{M}+\text{H}]^+$ gelten für die vollständig reduzierte Form (3 Thiole). Im vorhergesagten Signalpeptid ist der hydrophobe Sequenzabschnitt unterstrichen, positiv geladene Rest mit „+“-Zeichen markiert und das Motiv der potentiellen Lipidbindestelle rechteckig eingeklemmt.

Gelelektrophoretisch isoliertes, „reifes“, TrbK wurde auf eine PVDF-Membran geblottet. Eine Hälfte des Blotts diente zur serologischen Identifizierung (Haase, (1996)) der TrbK-Bande, welche dann an der entsprechenden Stelle aus der unbehandelten Membranhälfte ausgeschnitten wurde. Das in dieser Weise gereinigte TrbK wurde auf der Membran tryptisch verdaut. Die MALDI-MS-Analyse der eluierten Peptide liefert neben den m/z-Werten der meisten direkt zuordnungsfähigen Peptidionen ein Signal bei m/z 1822,3 (s. Abbildung 3-25). Dieses kann mit hoher Wahrscheinlichkeit N-terminalen Abbaopeptid zugeordnet werden. Entsprechend dem von Sankaran & Wu, (1994), vorgeschlagenem Biosyntheseweg für Lipoproteine Gram-negativer Bakterien, ist dessen N-terminales Cystein α -N-palmitoyliert und seine Thiolfunktion mit einer 2,3-Bis(palmitoyloxy)-propylgruppe S-acyliert. Da das berechnete MW des derartig modifizierten Peptids 2 Da schwerer wäre als der gemessene Wert, kann davon ausgegangen werden, daß einer der 3 Acylreste eine olefinische Bindung beinhaltet (d.h. von einer einfach ungesättigten Fettsäure herrührt). Das unmodifizierte N-terminalen Abbaopeptid müßte ansonsten bei m/z 1035,4 detektierbar sein - dieses Signal wird jedoch nicht gefunden.

Das bei m/z 1232,9 detektierte Ion entspricht den disulfidverbrückten Abbaopeptiden AS (10-17)-S-S-(31-33). Die in der Abbildung 3-25 nicht unterstrichenen TrbK-Abbaopeptide sind für die Detektion durch MALDI-MS zu klein, da sie in den Bereich des Matrix-Rauschens fallen.

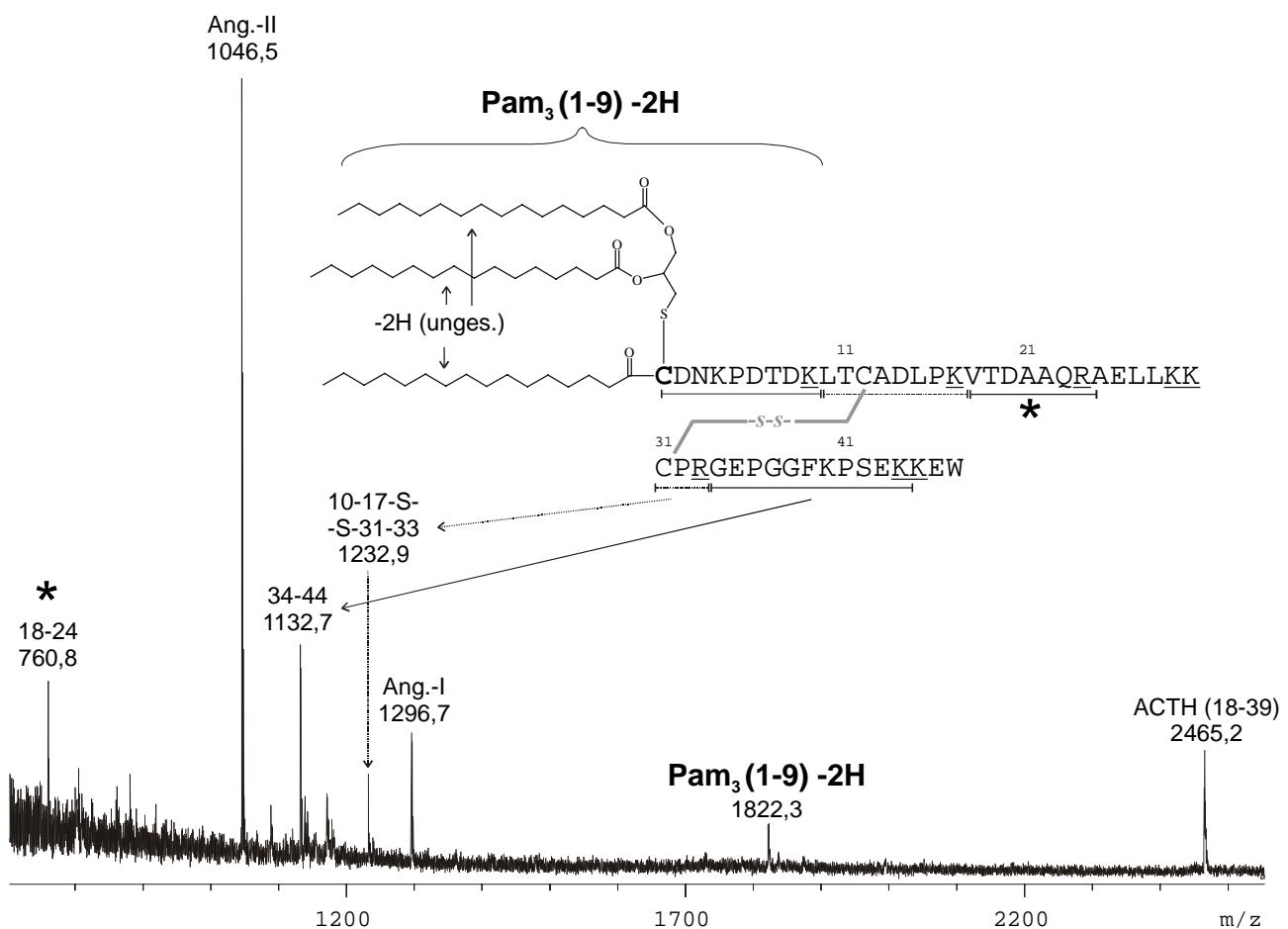


Abbildung 3-25: MALDI-MS-Peptidkartierung von PVDF-Membran-geblottetem TrbK. Das Signal bei m/z 1822,3 kann mit hoher Wahrscheinlichkeit einem 2,3-Bis(palmitoyloxy)-propyl-N-palmitoyl (= Pam₃) -cysteinyl-Peptid zugeordnet werden, welcher einen ungesättigten Fettsäurerest beinhaltet (Erläuterungen im Text). Das Spektrum wurde intern mit Angiotensin-I und II (=Ang.-I/-II) und mit dem humanen ACTH Clip (18-39) kalibriert.

Abschließend ist zu bemerken, daß das massenspektrometrisch bestimmte MW das intakten, „reifen“, TrbK-Lipoproteins (s. Spektrum in Abbildung 3-24) dem berechneten Wert entspricht, der sich unter Berücksichtigung aller genannten Modifizierungen ergibt (durchschnittliches m/z 6004,29).

3.5. MALDI-MS vollständiger Zellen und Zellüberstände zur Analyse der Hauptproteinkomponenten konjugativer Pili.

3.5.1. Massenbestimmung der IncP-Pilus Hauptkomponente mit *trans*-3-Indolylacrylsäure als MALDI-MS Matrix

Angereicherte RP4-Pili, aus einer mehrstufigen Reinigung mit abschließender CsCl Gradientenzentrifugation*, wurden als Suspension direkt mit der Matrix vermischt und einer MALDI-MS Analyse unterzogen. Sowohl im linearen, als auch im Reflektormodus werden nur die Ionensignale einer Komponente gefunden (m/z des $[M+H]^+$ bei 8119,6 und m/z des $[M+2H]^{2+}$ bei 4060,3 - s. Spektren in Abbildung 3-29). Analog zu diesem Befund zeigt die geelektrophoretische Trennung mit dieser Präparation nach Silberfärbung hauptsächlich eine Bande, allerdings bei ~6,2 kDa. (Abbildung 3-27). Bei gleichem m/z können die genannten Ionen auch dann nachgewiesen werden, wenn statt der angereicherten Pili, komplett pilusbildende Zellen mit der Matrix vermischt werden (s. Probenpräparation in Abschnitt 2.5.2). Das Signalmuster der im Reflektormodus gemessenen Piluskomponente beinhaltet auch einige weniger intensive Signale bei m/z ~8101, ~8080 und darunter, die auf Fragmentionen zurückzuführen sind (s. z.B. Spektren in Abbildung 3-28, Abbildung 3-29 und Abbildung 3-36). Im linearen Modus werden diese Fragmente, die durch metastablen Zerfall der Proteinionen in der feldfreien Driftstrecke des Flugrohres entstehen, nicht nachgewiesen. Proteinionen spalten z.B. HCOOH, CO₂ und H₂O ab. In Abhängigkeit vom Reflektorpotential werden die Fragmente auf den Detektor abgebildet. Ohne weitere Berücksichtigung dieses Potentials entsprechen die m/z Werte der detektierten Fragmente nicht ihren tatsächlichen Massen (Spengler, Kirsch *et al.*, (1991)).

Da der massenspektrometrische Nachweis dieser Piluskomponente anfänglich mit Sinapinsäure (SA) als Matrix nicht mit ausreichenden Signalintensitäten gelang, wurde die Matrixpräparation optimiert. Aus den MALDI-MS Spektren in Abbildung 3-26 wird ersichtlich, daß sich bei der Verwendung von *trans*-3-Indolylacrylsäure (IAA) als Matrix die intensivsten Signale für die Piluskomponente erzeugen lassen. 2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoësäure (HABA) wurde bereits von Welham *et al.* als Matrix für die Untersuchung von Proteinen aus Präparationen mit ganzen Zellen und Zell-Lysaten beschrieben (Welham, Domin *et al.*, (1998)). Sie lieferte jedoch deutlich geringere Signalintensitäten der Piluskomponente. Die Verwendung der gängigen Peptidmatrices HCCA, DHB sowie „super DHB“** (Tsarbopoulos, Karas *et al.*, (1994)) brachte infolge starker Fragmentierung und intensivem chemischen Rauschen keine verwertbaren Resultate***.

* Herrn Dipl.-Ing. für Biotechnologie Ralf Eisenbrandt sei herzlich für die Anreicherung der Pili gedankt. Die hierzu erforderlichen Arbeitsschritte werden in seiner Dissertation (in Vorbereitung) beschrieben.

** „super DHB“: eine 9:1 Mischung von 2,5-Dihydroxybenzoësäure (DHB) mit 2-Hydroxy-5-methoxybenzoësäure

*** Die Spektren sind nicht gezeigt, können jedoch beim Autor eingesehen werden.

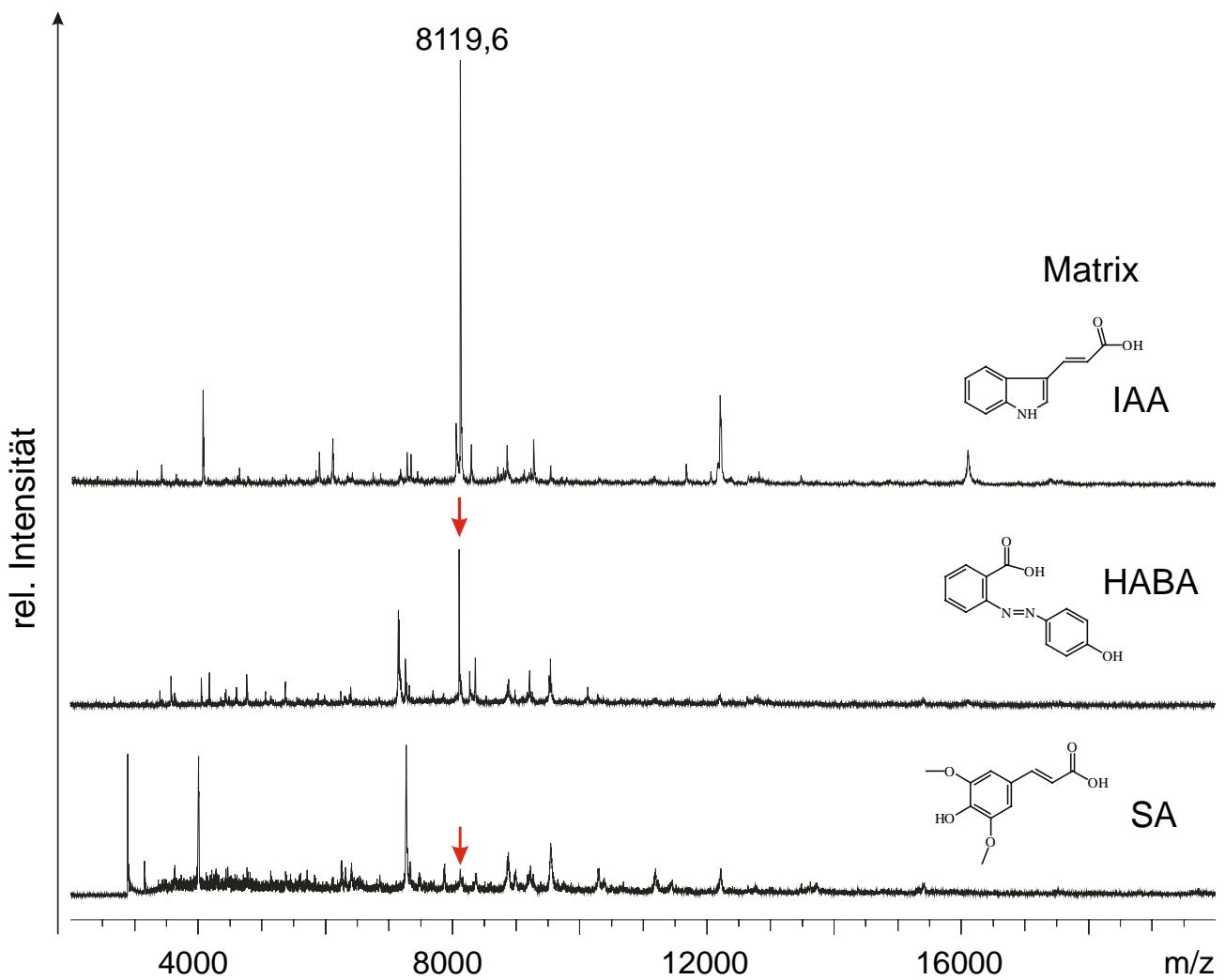


Abbildung 3-26: Vergleich der MALDI-MS Analysen kompletter Zellen des Pilus bildenden Stammes HB101(*pDB126*) unter Verwendung verschiedener Matrices. Es wurden jeweils 0,3 µl der Matrixlösung in Acetonitril/Isopropanol-Gemischen (1:1 v/v) mit 0,3 µl Zellsuspension ($A_{600} \approx 2$) auf vorgelegten Matrixdünnschichten vermischt („Sandwich“-Präp.). Neben der „Pilushauptkomponente“ bei *m/z* 8119,6 sind die Signale mehrerer *E. coli* Proteine zu sehen.

3.5.2. Der Einfluß des Lösungsmittels auf die MALDI-MS Analyse von Proteinen in Zell-Suspensionen und Überständen

Obwohl sich die in 0,1 %-iger TFA suspendierten *E. coli* Zellen als farbloses, milchiges Pellet abzentrifugieren lassen, muß angenommen werden, daß zumindest die äußere Zellmembran in diesem sauren Lösungsmittel (pH ~1) zerstört wird. Aus den TFA-haltigen Suspensionen entnommene *E. coli*-Bakterien sind nicht mehr auf Agarplatten kultivierbar, die Organismen werden abgetötet. Dagegen gelingt die Anzucht problemlos, wenn die Bakterien in zuvor 25 mM Ammoniumacetatlösung (AA) statt in TFA suspendiert werden. Die aus den AA-Lösungen abzentrifugierten Sedimente sind leicht gelblich bis beige gefärbt. Die Auf trennung von Proteinkomponenten aus zuvor mehrfach gründlich abzentrifugierten Zellüberständen mit einem SDS-Gel zeigt, daß bei Verwendung von TFA deutlich mehr niedermolekulare (< 20 kDa) Bestandteile gelöst werden als bei Verwendung von AA. In der gelelektrophoretischen Trennung des AA-Überstandes finden sich dagegen mehr Banden höhermolekularer Komponenten (> 20 kDa) und kaum niedermolekulare.

Die beiden zytoplasmatischen, ribosomalen Proteine, 50S Untereinheit L6-Protein (18,9 kDa) und die 30S Untereinheit S11-Protein (13,8 kDa) können durch massenspektrometrische Peptidkartierung nur in den entsprechenden Gelbanden des TFA Überstand nachgewiesen werden (mit je 45 % bzw. 49 % Sequenzabdeckung), s. Abbildung 3-27. Dagegen konnte im AA-Überstand bisher nur das Protein Chloramphenicolacetyltransferase (25,6 kDa) mit ausreichender Sicherheit aus einer Gelbande bei ~23 kDa identifiziert werden. Bedingt durch eine sämtliche Analysen dieses Gels dominierende Keratin-Verunreinigung konnten von diesem Protein nur 6 Peptide nachgewiesen werden, die insgesamt 15 % der Gesamtsequenz abdecken. Der verwendete Stamm JE2571 (pML123 / pWP471) besitzt tatsächlich das plasmidkodierte Gen für Chloramphenicolacetyltransferase (aus dem Klonierungsvektor pGZ119EH stammend). Das zugehörige Protein katalysiert die Acetylierung von Chloramphenicol*, wodurch die Resistenz des genannten Stammes gegenüber diesem Antibiotikum gewährleistet ist (Shaw, Packman *et al.*, (1979), Shaw, (1983)). Außerdem konnten aus einer Gelbande bei ~ 28 kDa des aufgetrennten AA-Überstands Peptidmassen bestimmt werden, die sich dem periplasmatischen Ferrichrom-Eisen-Transportprotein (*fhuD*-Genprodukt) zuordnen lassen. Aufgrund der knappen Datenmenge (2 Peptide, eines jedoch mit 4 verschiedenfach oxidierten Methioninresten ≡ 5 MALDI-MS Signale; 14 % Sequenzabdeckung), ist jedoch keine ausreichende Sicherheit für diese Identifizierung gewährleistet (Spektren nicht gezeigt). Die Bande der Pilus-Hauptkomponente ist in beiden Zellüberständen, beim TFA-Überstand jedoch intensiver, bei ~6,2 kDa zu erkennen. Aus einem *im-Gel* Verdau mit diesen Banden lassen sich jedoch keine proteolytischen Peptide gewinnen (*vide infra* Abschnitt 3.5.5).

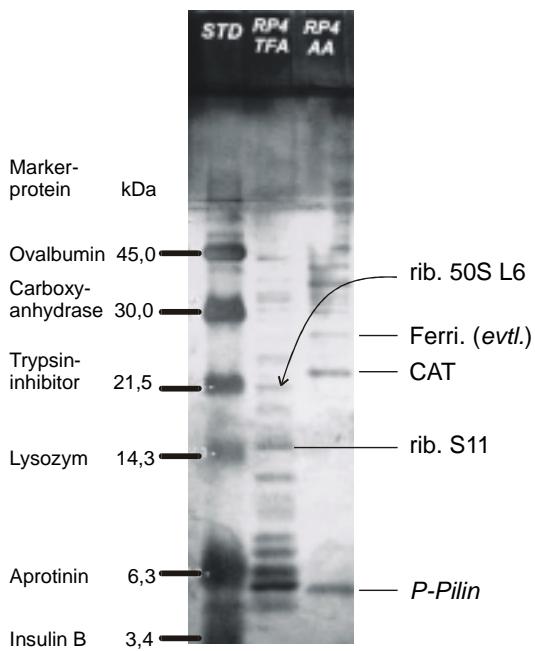


Abbildung 3-27: Silbergefärbtes SDS-PAGE Gel mehrfach abzentrifugierter Zellüberstände aus Suspensionen von JE2571(pML123 / pWP471) in 0,1 %-iger TFA (mittlere Spur) und 25 mM Ammoniumacetatlösung (rechte Spur). Die durch massenspektrometrische Peptidkartierung identifizierten Proteinbanden (ribosomale S11 Untereinheit, ribosomales 50S Protein L6, CAT = Chloramphenicolacetyltransferase und möglicher Weise Ferri. = Ferrichrom-Eisen Transportprotein {*fhuD*-Produkt}) sind gekennzeichnet. MW-Proteinstandards (STD) befinden sich in der linken Spur.

Die Pilus-Hauptkomponente wird in den MALDI-MS Analysen bei m/z 8119,6 nachgewiesen unabhängig davon, ob für die Probenpräparation Zellsuspensionen oder Überständen von JE2571(pML123 / pWP471) in 0,1 %-iger TFA und in 25 mM AA verwendet wurden (s. Spektren in Abbildung 3-28). Wie auch bei der gelelektrophoretischen Trennung der Zellüberstände, werden in den TFA-Überständen sowie in den TFA-Suspensionen mehrere niedermolekulare Komponenten (mit hoher Wahrscheinlichkeit Peptide) im m/z Bereich von 1000-14000 nachgewiesen. Suspensionen und Überstände des gleichen Pilus überexprimierenden Stammes weisen in den massenspektrometrischen Analysen dagegen hauptsächlich die Signale der Pilushauptkomponente auf. Zur Untersuchung dieser Komponente eignen sich jedoch Suspensionen ganzer Zellen in 0,1 %-iger

* Trivialname für D-(*-*)-*threo*-2-(Dichloracetylamino)-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propandiol

TFA am besten, da sie die intensivsten Signale dieser Komponente bei optimalen Signal / Rausch-Verhältnis liefern.

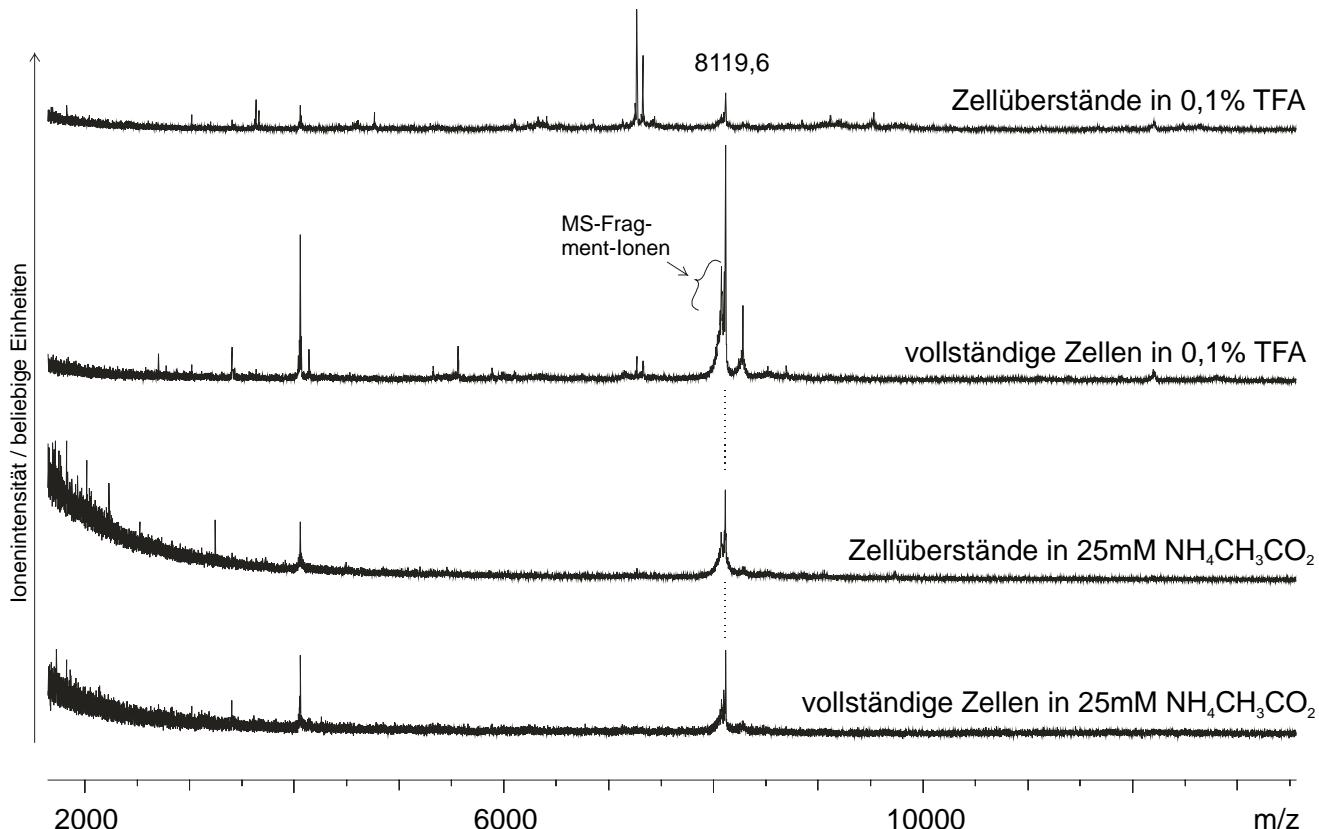


Abbildung 3-28: MALDI-MS Analysen von Zellüberständen und Suspensionen des Pilus überexprimierenden *E. coli* Stamms JE2571(pML123 / pWP471) in 0,1 %-iger TFA und in 25 mM Ammoniumacetatlösung.

3.5.3. Mehrfach prozessiertes TrbC ist die Pilus-Hauptkomponente der IncP-Plasmide

Die Signale der Pilus-Hauptkomponente (bei m/z 8119,6 und 4060,3) gewinnen relativ zu den Signalen anderer *E. coli* - Proteine mit zunehmender TrbC-Expression an Intensität. Ist das *trbC*-Gen defekt oder enthalten die Bakterien überhaupt keine Gene der IncP α -Plasmide, so lassen sich keine entsprechenden Signale nachweisen (s. Spektren in Abbildung 3-29). Das IncP-Pilin muß daher mit dem *trbC*-Gen korreliert werden.

In Abbildung 3-30 werden die Spektren der Stämme JE2571, SCS1 und HB101, die keine RP4-Gene enthalten mit den selben Stämmen verglichen, die RP4-Gene tragen (JE2571(RP4), SCS1(pJH472/pRE178), HB101(pJH472/pRE178)). Der Nachweis der Pilus-Hauptkomponente bei m/z 8119,6 gelingt dabei unabhängig vom verwendeten Stamm. Es ist anzumerken, daß in HB101(pJH472/pRE178) und in SCS1(pJH472/pRE178) nur die Gene *trbC* und *traF* plasmidkodiert werden. Dabei befindet sich das *trbC*-Gen auf pRE178 in *trans* zu *traF* auf pJH472.

Die durch Dai *et. al.* aus 0,1%-igen TFA/*E. coli*-Suspensionen identifizierten, in MALDI-Massenspektren auftretenden, „cold shock“-Proteine Csp-C, Csp-E, sowie das histonartige, DNA-bindende Protein HU- α (Dai, Li *et al.*, (1999)) lassen sich in den meisten Analysen ebenfalls bei m/z 7272,2, 7333,3 bzw. 9536,7 detektieren (s. Spektren in Abbildung 3-30, Abbildung 3-38 und in Abbildung 3-42). Diese, vom *E. coli*-Chromosom kodierten Proteine treten in allen verwendeten *E.*

coli-Stämmen (JE2571, SCS1, HB101 und DH5 α) auf. Sie lassen sich daher als interne Massenstandards zum Kalibrieren verwenden.

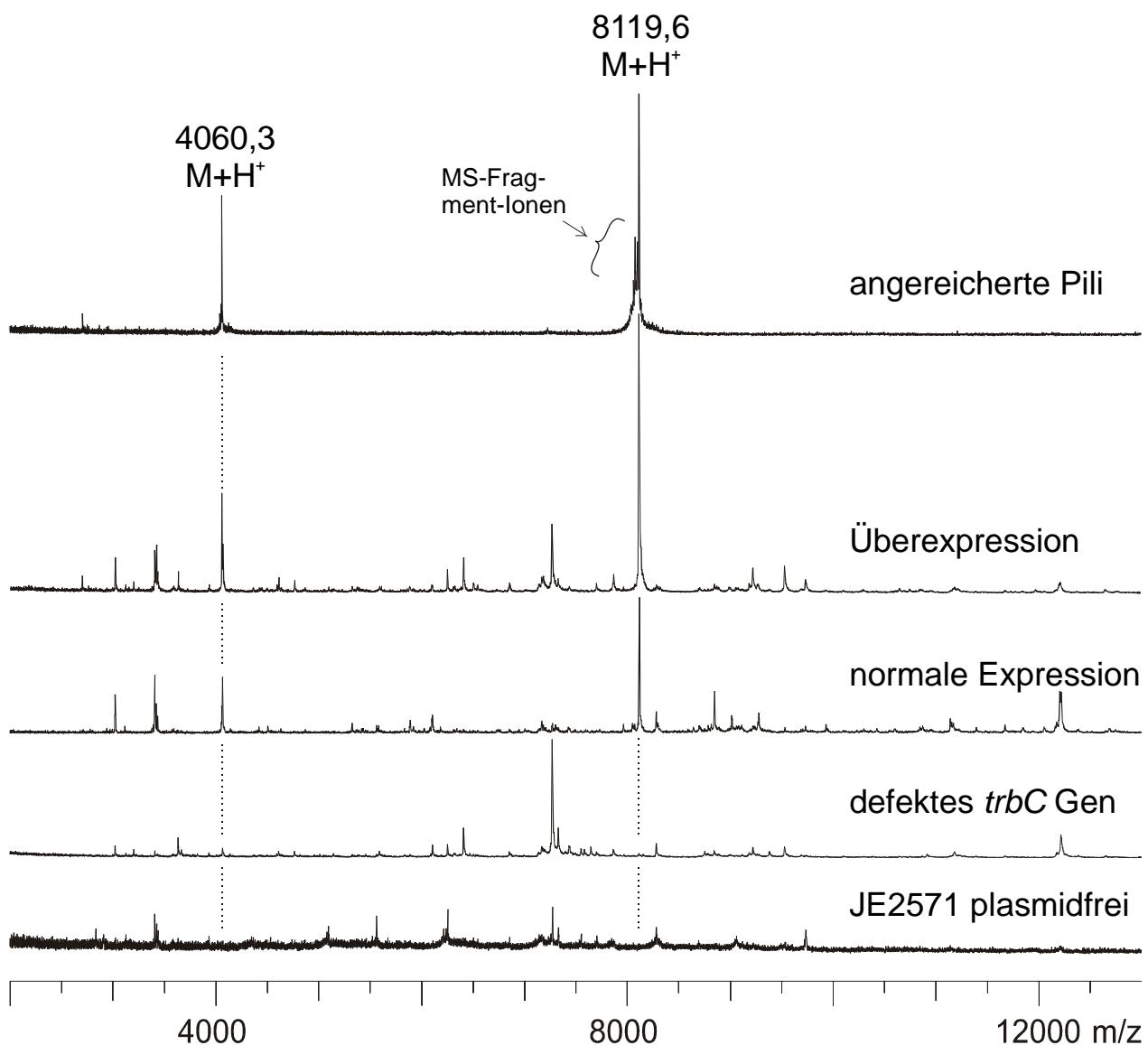


Abbildung 3-29: MALDI-MS Spektren kompletter Zellen (*E. coli* JE2571) zur Analyse der Proteinhauptkomponente des *IncP* α -Pilus. Von oben nach unten sind zu sehen: Spektrum **angereicherter Pili** aus CsCl-Gradienten Ultrazentrifugation; **TrbC** (und Pili) **Überexpression** mit pML123 / pWP471 tragendem Stamm; **normale Expression** durch RP4 in JE2571; pilusfreier Stamm durch **defektes trbC-Gen** (pML123mtrbC45/pWP471); Spektrum einer **plasmidfreien** Präparation von JE2571 Zellen (enthält keine Gene der *IncP* α -Gruppe). Matrix: IAA

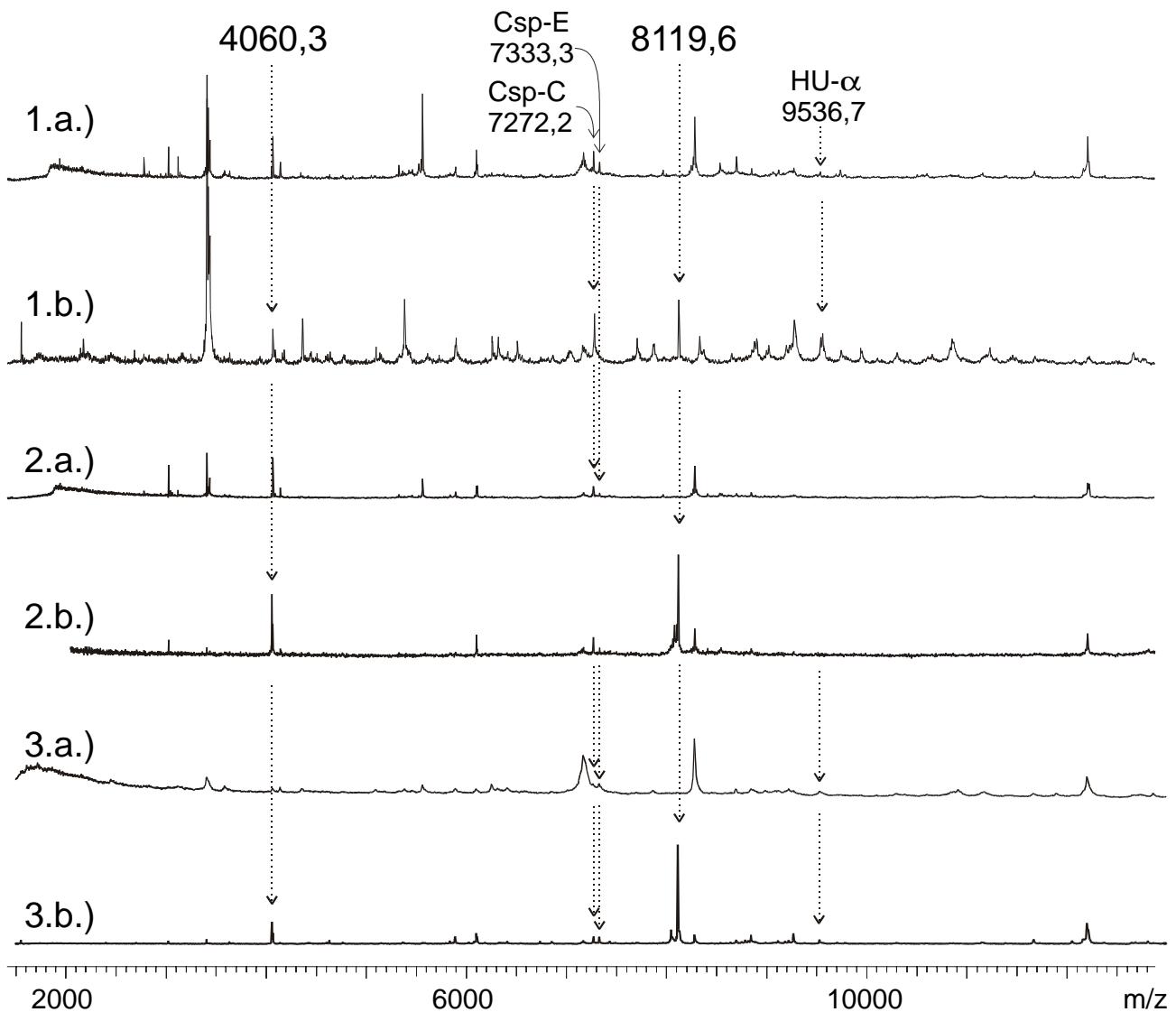


Abbildung 3-30: Nachweis der Pilushauptkomponente durch direkte MALDI-MS Analysen mit Zellsuspensionen verschiedener *E. coli*-Stämme. Es sind jeweils Massenspektren der Proteingemische abgebildet, die mit den plasmidfreien Zellen a) und die mit dem TrbC-exprimierenden Stamm b) gemessen werden.

- 1.a.) JE2571
- 1.b.) JE2571(RP4)
- 2.a.) SCS1
- 2.b.) SCS1(pJH472/pRE178)
- 3.a.) HB101
- 3.b.) HB101(pJH472/pRE178)

Die Pilushauptkomponente wird in den TrbC exprimierenden Stämmen als $[M+H]^+$ bei m/z 8119,6 und als $[M+2H]^{2+}$ bei m/z 4060,3 nachgewiesen. Beim JE2571(RP4) (in 1.b.) und beim SCS1 (pJH472 / pRE178) (in 2.b.) wird der Nachweis der 2 fach geladenen Spezies jedoch durch ein Signal bei ähnlichem m/z erschwert, welches auf ein anders Polypeptid zurückzuführen ist, welches bereits beim plasmidfreien Stamm gemessen wird. Die Signale bei m/z 7272,2, 7333,3 und 9536,7 können den *E. coli*-Proteinen Csp-C, Csp-E und HU- α zugeordnet werden (vide supra).

Haase & Lanka, (1997), berichten, daß reifes TrbC (= TrbC*) insgesamt 3 mal prozessiert wurde (s. Abbildung 3-31). Zuerst spaltet eine Signalpeptidase das N-terminale Signalpeptid des ^{PrePro}TrbC ab. Der N-Terminus des entstandenen ^{Pro}TrbC ist durch Edman-Sequenzierung als SEGTGGSL... bestätigt worden (Haase & Lanka, (1997)). In einem 2. Schritt wird ^{Pro}TrbC C-terminal zu ^{n.m.}TrbC

verkürzt (n.m. von „*non maturum*“). Die exakte Sequenz des C-Terminus war bisher unbekannt. In einem letzten Schritt wird ^{n.m.}TrbC am C-Terminus von TraF zum TrbC* prozessiert. Auf die Lokalisierung der letzten Prozessierung geben serologische Untersuchungen Hinweise. Das zu 8119,6 Da bestimmte Molekulargewicht des einfach geladenen, protonierten TrbC* lässt sich jedoch nicht seiner C-terminal verkürzten *Core*-Sequenz (dargestellt in Abbildung 3-32) zuordnen. Eine C-terminal mit R113 bzw. G114 endendes TrbC* müsste bei m/z 8080,5 bzw. 8137,6 zu messen sein und das berechnete m/z einer bei A115 endenden TrbC-*Core*-Sequenz beträgt 8208,7.

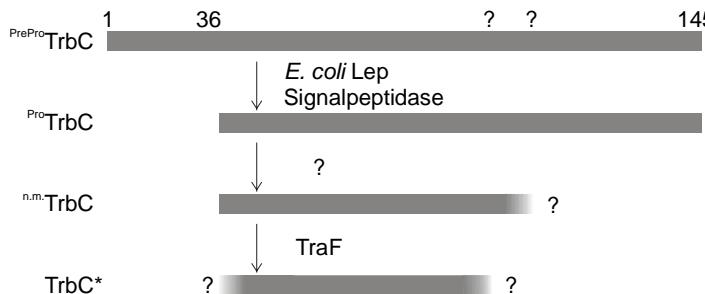


Abbildung 3-31: Die vor der hier beschriebenen MALDI-MS Untersuchung bekannten Prozessierungsschritte des TrbC. Fragezeichen symbolisieren unklare Termi-
ni, Spaltstellen, Peptidasen, und Modifika-
tionen.

Intakte pilusbildende Zellen JE2571(pRE123 / pWP471), die das zum TrbC RP4 homologe TrbC R751 exprimieren, werden direkt im MALDI-MS analysiert und mit entsprechenden Analysen angereicherter RP4-Pili verglichen. TrbC RP4 weist in der hochkonservierten *Core*-Region vier Unterschiede zum TrbC R751 auf: V76I, A85G, L93I und V106M (Abbildung 3-32). Die AS-Austausche V76I und A85G wirken sich nicht auf das Molekulargewicht aus, da formal eine Methylengruppe addiert und wieder subtrahiert wird. Der Austausch der isomeren AS Leucin-93 gegen Isoleucin-93 führt ebensowenig zu einer Molekulargewichtsänderung, nur der Übergang V106M bewirkt, daß TrbC* R751 um ein Schwefelatom ($\Delta m = 32$ Da) schwerer ist als TrbC* RP4. Dieser Massenunterschied wird experimentell bestätigt (Spektren in Abbildung 3-33), was beweist, das TrbC R751 in gleicher Weise wie TrbC RP4 prozessiert wird und die *Core*-Regionen in den selben Grenzen liegen müssen.

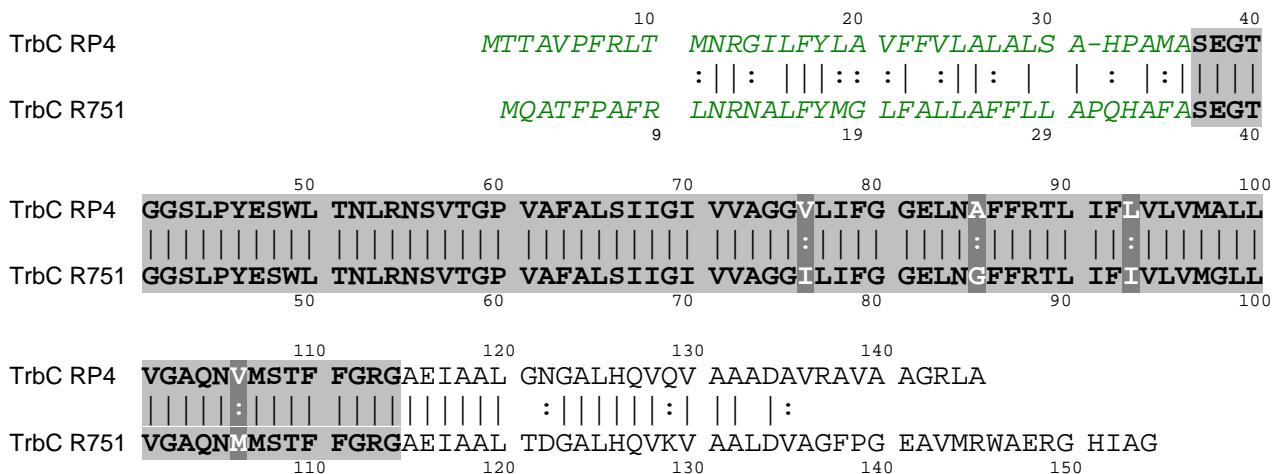


Abbildung 3-32: Vergleich der TrbC-Sequenzen von RP4 und R751 mit dem TFASTA Algorithmus nach Pearson und Lipman (Pearson & Lipman, (1988), im GCG-Programmpaket enthalten). In der grau hinterlegten Core-Sequenz (**Fettdruck**) befinden sich vier Sequenzunterschiede, die sich durch zueinander homologe Aminosäuren auszeichnen (konservativer Austausch). Es bedeuten: „|“ Identität; „:“ Homologie; **kursive Schrift** kennzeichnet die Signalpeptide

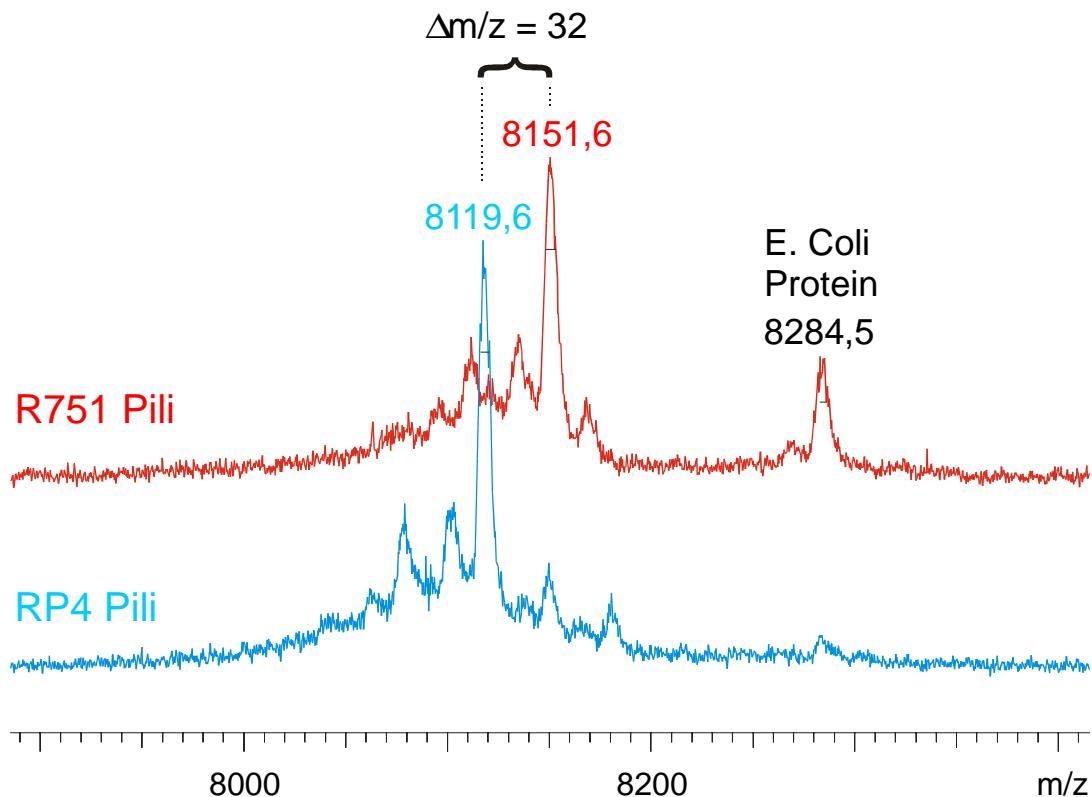


Abbildung 3-33: Pilusbildende Zellen JE2571(*pRE123 / pWP471*) *Tra2 R751⁽⁺⁾ / TraFRP4⁽⁺⁾* im MALDI-MS Vergleich mit JE2571(*pML123 / pWP471*) *Tra2 RP4⁽⁺⁾ / TraFRP4⁽⁺⁾*. Die Massendifferenz zwischen dem vom Plasmid RP4 und dem durch sein Schwesternplasmid R751 kodierten Pilins beträgt 32,0 Da.

3.5.4. Sind IncP-Pilin (TrbC*) und F-Pilin (TraA von F) in gleicher Weise posttranslational modifiziert?

Da sich der N-Terminus des 3 fach prozessierten TrbC* nicht durch Edman-Sequenzierung bestimmen lässt, wird die bekannte Hauptkomponente des Sex-Pilus des F-Plasmids, das F-Pilin, zum Vergleich massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 3-34). Das F-Pilin wurde bereits 1976 von Minkley et al. als prozessiertes TraA von F identifiziert (Minkley, Polen *et al.*, (1976)). Seine N-terminale Blockierung, welche die Edman-Sequenzierung verhindert, wird durch eine α -Amino-Acetylierung erklärt (Maneeuwannakul, Maneeuwannakul *et al.*, (1995)), (Moore, Hamilton *et al.*, (1993)). Dies bestätigt die MALDI-MS Analyse gereinigter F-Pili, da das m/z des $[M+H]^+$ bei 7228,1 und das m/z des $[M+2H]^{2+}$ bei 3614,6 mit den berechneten Werten im Rahmen der Meßgenauigkeit übereinstimmt ($m_{seq.} + m_{ac} + m_{H^+} = 7185,6 + 42,0 + 1,0 = 7228,6$). Die Molekulargewichte der TrbC* von RP4 und R751 lassen sich dagegen nicht durch N-terminale Acetylierung erklären. Ferner bestehen nur geringe Sequenzhomologien zwischen TraA von F und den TrbCs der IncP Gruppen (den IncP-Pilinen, Jones, Lai *et al.*, (1996)).

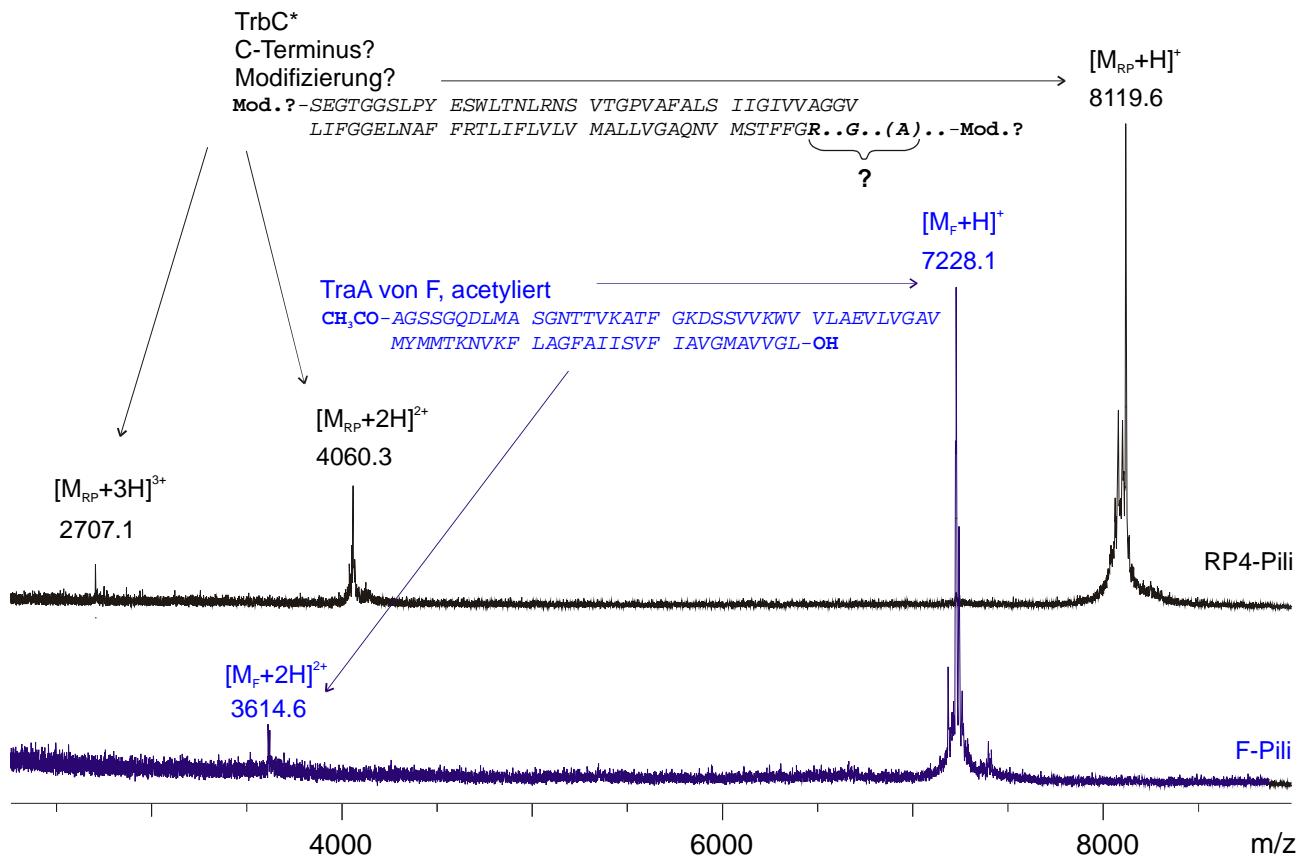


Abbildung 3-34: Massenbestimmung der Proteininhauptkomponenten der RP4 und F-Pili durch MALDI-MS Analyse gereinigter Pili aus einer Präparation durch mehrstufige Gradientenzentrifugation.

3.5.5. Permutative Peptidkartierung beweist die zyklische Primärstruktur der IncP-Piline (TrbC*).

Die Massendifferenzen zwischen den denkbaren C-Termini -R113, -G114 und -A115 und dem experimentell bestimmten MW des TrbC* betragen: $\Delta m = +39,1$ Da, $-18,0$ Da bzw. $-89,1$ Da (*vide supra*, Abschnitt 3.5.3). Einzig die Massendifferenz $\Delta m = -18,0$ Da lässt sich in chemisch sinnvoller Weise als Verlust eines Wassermoleküls deuten. Da beim TrbC* nur Zykлизierungen in Erwägung gezogen werden können, (es ist kein N-terminales Glu für Pyroglutaminbildung vorhanden,) wurde eine Peptidkartierung zur Klärung der Primärstruktur durchgeführt. Erste Abbauversuche mit den aus mehrstufigen Ultrazentrifugationen gewonnenen Pili ergaben jedoch eine Vielzahl an Signalen (*vide infra*) im Peptidmassenbereich 1000 - 3000 Da, wogegen kaum eine Abnahme des TrbC* Signals bei m/z 8119,6 ersichtlich ist. Das offenbar unreine aber einigermaßen proteaseresistente TrbC* kann somit in Gegenwart von Trypsin gereinigt werden (s. Abschnitt 2.4.7). Derartige, „tryptisch gereinigte“ Pili lassen sich elektronenmikroskopisch (s. Abbildung 1-7 in Abschnitt 1.2.1) nicht von den ungereinigten Pili aus der vorangehenden Präparation unterscheiden. Die Pilus Hauptkomponente, das TrbC*, verbleibt also unverdaut. Direkt auf dem Edelstahl-MALDI-MS-Target gelingt der Abbau des TrbC* bei relativ großen Enzym-Substratverhältnissen, ohne daß dabei die zum Teil sehr hydrophoben Abbausteine (z.B. durch Adhäsion an Gefäßwände) verloren gehen (s. Abschnitt 2.4.5). Überlappende Fragmentpeptide aus tryptischen und chymotryptischen Abbau belegen die zyklische Struktur des TrbC*. Nach 1 bis 6 stündiger Trypsineinwirkung werden

neben der linearisierten Form ($m/z \sim 8137$) des TrbC nur zwei Peptide gefunden (s. Tabelle 3-8 und Abbildung 3-35 oberes Spektrum). Das Signal bei m/z 2023,9 läßt sich dem Peptid AS 78 bis 18 zuordnen. Das Peptid umfaßt also sowohl den N-Terminus des ursprünglichen ^{Pro}TrbC bzw. des ^{n.m.}TrbC als auch die letzte Aminosäure des C-Terminus des prozessierten TrbC*, G78, die nun die erste Aminosäure dieses Abbausteins bildet. Bei m/z 6131,3 wird das Peptid AS 19 bis 77 detektiert. Dieses Peptid beinhaltet zwar mit R52 eine weitere tryptische Spaltstelle, die jedoch offensichtlich für das Trypsin unzugänglich ist (hydrophober Sequenzabschnitt). Es werden keine weiteren tryptischen Abbausteine gefunden. Wird das mit Trypsin vorgereinigte TrbC* chymotryptisch verdaut, so werden Peptide nachgewiesen, die sowohl durch tryptische Spaltung als auch durch chymotryptische Proteolyse entstanden sind (s. Tabelle 3-8 und Abbildung 3-35 unteres Spektrum). Das nach einstündigem Abbau erhaltene chymotryptische Abbausteine bei m/z 5618,5 (AS 75 bis 51) beinhaltet sowohl Teile des C-Terminus von TrbC* als auch einen Teil des ehemaligen N-Terminus des ^{n.m.}TrbC. Durch längere Chymotrypsineinwirkung werden kürzere Peptide erhalten. Nach $5\frac{1}{2}$ h ist z.B. die N/C-terminale Verknüpfungsstelle im Peptid AS 76 bis 10 enthalten, welches bei m/z 1237,5 detektiert wird.

Der erste Abbauschritt besteht in der Hydrolyse einer Peptidbindung des zyklischen TrbC*. Beim Trypsin erfolgen nachfolgende Abbauschritte deutlich langsamer, so daß sich hier die Ringöffnung als Intensitätszunahme des um 18 Da schwereren Moleküls zeitlich verfolgen läßt (s. Abbildung 3-36).

„on-target“ Proteolyse Abbauzeiten	m/z gemessen	Δ ppm	AA-Bereich von	bis	proteolysiert durch
1.0 h – 6.0 h tryptisch	2023,9	-35,6	78	18	TT
	6131,3	-21,6	19	77	TT
	8136,7	-110,4	lineares TrbC		
1.0 h chymotryptisch	2053,1	-10,5	57	75	CC
	5618,5	15,5	75	51	CC
	5770,9	-20,4	19	74	TC
	6131,3	-17,7	19	77	TT
	6770,8	-44,1	11	74	CC
	8136,7	-110,4	lineares TrbC		
5.5 h chymotryptisch	1237,5	-66,7	76	10	CC
	1384,6	-59,1	75	10	CC
	6771,1	9,4	11	74	CC

Tabelle 3-8: Zugeordnete Peptide bei verschiedenen Abbauzeiten. Es bedeuten: T = tryptische Spaltung; C = chymotryptische Spaltung; TC = vor dem N-Terminus tryptisch, am C-Terminus chymotryptisch gespalten. Die AS-Nummerierung bezieht sich auf TrbC* und beginnt beim Serin des ursprünglichen N-Terminus des ^{n.m.}TrbC (SEGTGG...)

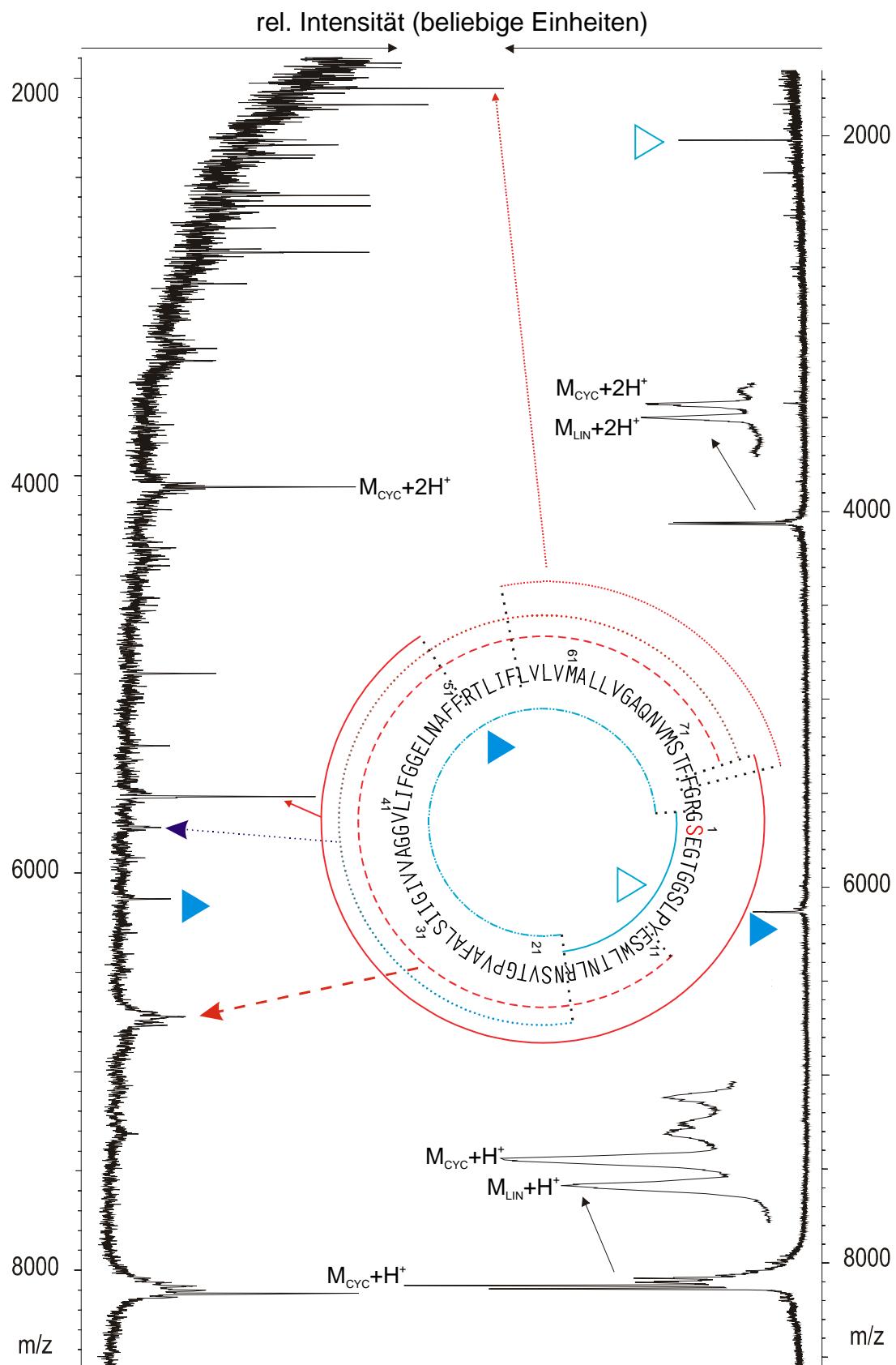


Abbildung 3-35: chymotryptische (Spektrum links) und tryptische (Spektrum rechts) MALDI-MS Peptidkartierung („peptide map“) des zyklischen TrbC.

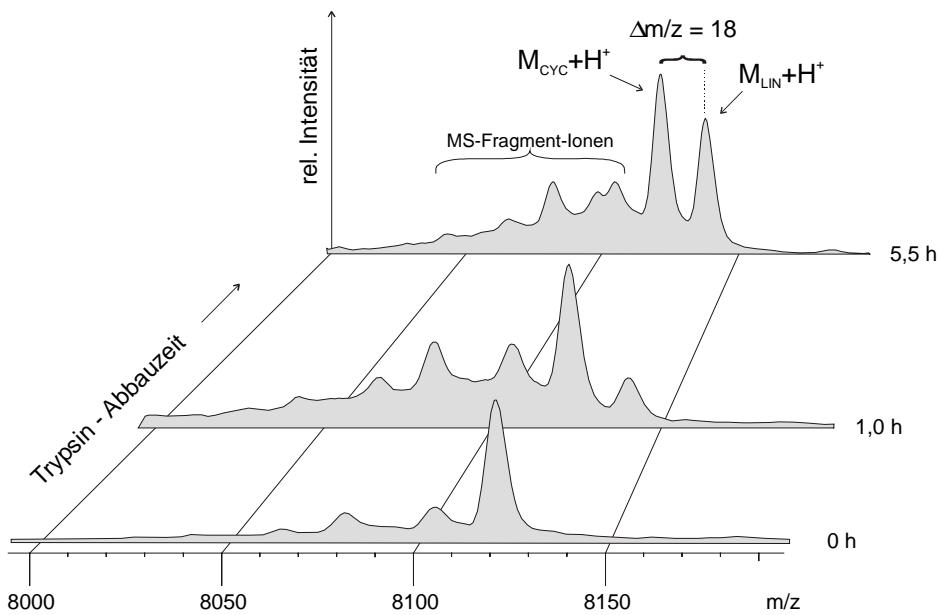
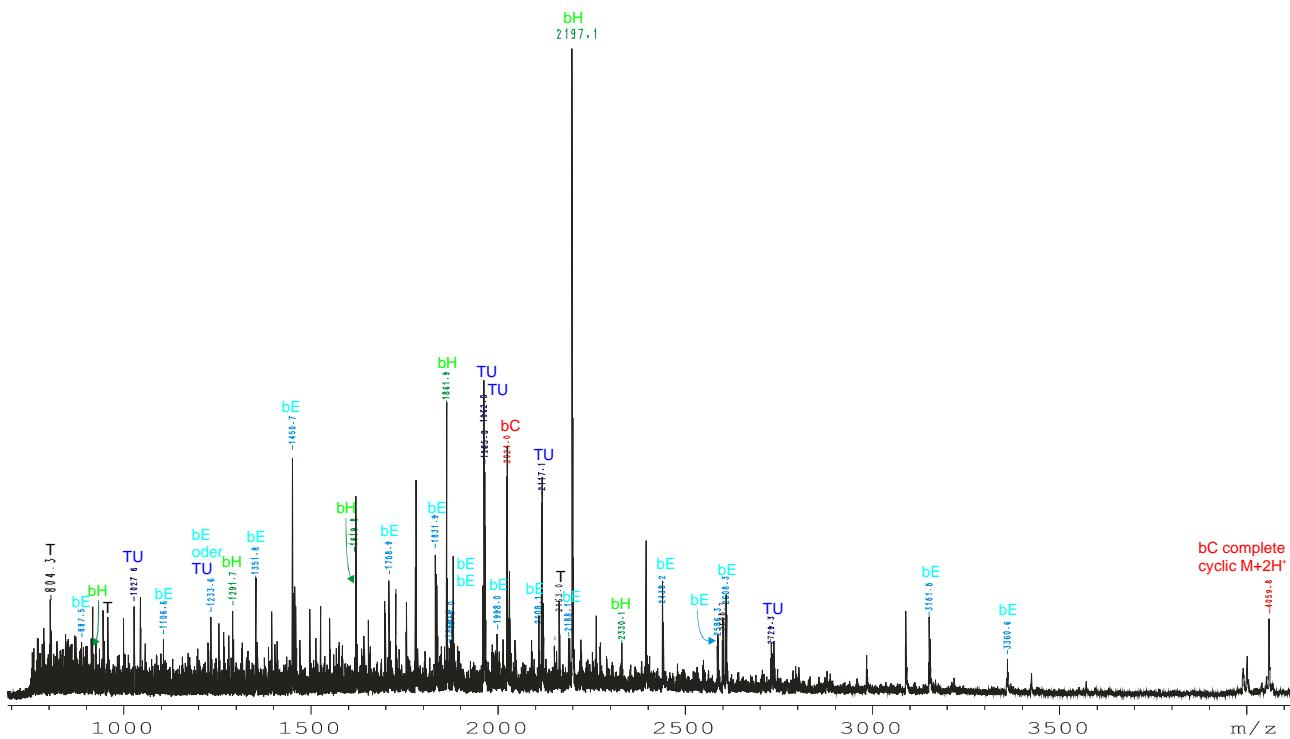


Abbildung 3-36:

Zunahme des ring-offenen, linearen TrbC^* bei m/z 8137 ($=M_{\text{LIN}}+\text{H}^+$) im Zeitverlauf des tryp-tischen Abbaus.
 $M_{\text{CYC}}+\text{H}^+$ = Molekülion des zyklischen TrbC^*

3.5.6. In den präparierten Pili werden Spuren der Tra2-Proteine TrbE & TrbH identifiziert

Werden die nicht „tryptisch gereinigten“ Pili auf dem MALDI-MS Target verdaut und analysiert, so ergibt sich wie bereits erwähnt (*vide supra*), ein Spektrum mit einer Vielzahl an Signalen im typischen Massenbereich der Abbausteine (Abbildung 3-37). Per Datenbankabgleich mit den gemessenen Peptidmassen lassen sich die Proteine TrbE, TrbH (beide von RP4) und der *E. coli* Elongationsfaktor TU (EfTu) verlässlich identifizieren (s. Tabelle 3-9). Die gefundenen Sequenz-abdeckungen betragen für TrbE 37%, für TrbH 52% und für EfTu 25%. TrbE und TrbH sind für die Pilusbildung essentiell. Auch nach „tryptischer Reinigung“ wird das TrbH-Peptid (AS 56 bis 75) als intensives Signal bei m/z 2197,1 nachgewiesen. Das gegen die nicht „tryptisch gereinigten“ Pili-Präparation gewonnene Antiserum zeigt erwartungsgemäß Kreuzreaktion mit TrbH und TrbE (Eisenbrandt, (1998)).



Spot Nr	m/z von	[M+H] ⁺	Bereich			Peptid	Modifi- zierung **
Pro- tein	gemessen	berech- net	Δ ppm	von AS	bis AS	Aminosäuresequenz*	
TrbE	887,47	887,51	-44,72	387	394 (R)TRLEAAAR(D)		
	1106,62	1106,64	-12,42	750	758 (K)IFLPNIYAR(D)		
	1233,63	1233,71	-66,13	185	194 (R)TRGLIDQFKR(D)		
	1351,82	1351,81	6,58	668	678 (K)FALPVLLYLFR(R)		
	1450,71	1450,68	22,51	829	839 (K)FGDQWVDEWLR(G)		
evtl.	1653,90	1653,85	30,26	526	541 (K)GMSMYPLAAGIRAATK(G)		1Met-ox
	1708,91	1708,88	21,44	611	625 (R)TLSEFSVTIQDEAIR(E)		
	1831,87	1831,88	-7,50	217	232 (K)IVNEDGTTVTHDDFLR(W)		
	1869,92	1869,87	27,44	166	181 (R)KFVELMFDDDATAPDR(K)		
	1869,92	1869,87	27,44	167	182 (K)FVELMFDDDATAPDRK(A)		
	1874,97	1874,96	6,92	120	136 (R)GLSAFPDRLLAAIEER(R)		
	1997,98	1997,96	8,73	166	182 (R)KFVELMFDDDATAPDRK(A)		
	2108,05	2108,11	-25,10	91	110 (R)INQALAGLGSQGWMIHDAVR(R)		
	2117,13	2117,20	-34,73	195	213 (R)DVRSIESRLSSAVSLTRLK(G)		
	2188,12	2188,15	-11,85	40	61 (K)DAGLADLLNYAAVVDDGVIVGK(N)		
evtl.	2438,25	2438,27	-7,74	409	431 (R)IESINTLDAFLGSLPGHGIVENVR(R)		
	2586,30	2586,30	-0,98	572	594 (R)AWAMEWIDTILALNGVETTPAQR(N)		
	3151,49	3151,59	-31,62	719	749 (K)ANCLVLMATQSLSDAANSQILDVIVES TATK(I)		1Met-ox
evtl.	3360,60	3360,71	-32,23	139	166 (R)HFESLGTMYEGYFVLTLWFPPPLAQR K(F)		1Met-ox
TrbH	1291,69	1291,70	-8,59	130	141 (R)LTVMVGSQSLTR(A)		
	1619,82	1619,77	29,47	117	129 (R)YVLDQFSDSNLYR(L)		
	1861,95	1861,94	3,86	142	158 (R)AYLAQNNTMVPAGAWVR(K)		
	2197,14	2197,19	-21,55	56	75 (K)LELQQATPDFGIALVTDLR(A)		
	2330,13	2330,13	-2,13	22	43 (K)YGSFVQDAPAAAYNQTIATDAVK(Q)		
Ef-TU	1027,59	1027,59	-4,20	271	280 (R)AGENVGVLLR(G)		
	1233,63	1233,62	6,73	326	334 (K)GYRPQFYFR(T)		
	1962,01	1962,02	-6,58	189	205 (K)ILELAGFLDSYIPEPER(A)		
	1965,00	1964,96	18,20	156	172 (R)ELLSQYDFPGDDTPIVR(G)		
	2117,13	2117,16	-16,04	206	224 (R)AIDKPFLPIEDVFSISGR(G)		
	2729,33	2729,34	-3,98	91	117 (K)NMITGAAQMDGAILVVAATDGPMQ TR(E)		

Tabelle 3-9: Zuordnung der massenspektrometrisch ermittelten Peptidmassen von Proteinen, die neben TrbC* in der tryptisch abgebauten Pili-Präparation gefunden werden.

* N-terminal vorangehende AS sowie C-terminal folgende AS stehen in Klammern

** Met-ox = oxidiertes Methionin (Sulfoxid)

3.5.7. MALDI-MS Analysen mutagenetisch veränderter *trbC*- und *traF*-Klone

Um die Reifung des TrbCs studieren zu können, werden verschiedene TrbC- und TraF-Mutanten als Suspensionen vollständiger Zellen in der beschriebenen Weise (s. Abschnitte 3.5.1-3.5.3) massenspektrometrisch analysiert. Tabelle 3-10 listet die Molekulargewichte des TrbC (als m/z des $[M+H]^+$) von TrbC Punktmutationen auf und ordnet sie über die berechneten Molekulargewichte seinen entsprechenden Prozessierungsformen zu. Für einige Mutanten, die neben den *trbC* und *traF*-Genen auch die übrigen Gene der Tra1- und Tra2- Region enthalten, ist ferner angegeben, ob sie als phänotypisches Merkmal Gentransfer-effizient sind (Eisenbrandt, (1998)). Von den analysierten TrbC Mutanten wirkt sich der AS-Austausch G112D eindeutig negativ auf die Zyklisierung des TrbCs aus. In diesem Fall kann MALDI-massenspektrometrisch nur das Signal des unprozessierten ^{n.m.}TrbC bei m/z 8579 beobachtet werden. Im Falle des AS-Austausches G114S wird sowohl unprozessiertes ^{n.m.}TrbC bei m/z 8553 als auch zyklisiertes TrbC* bei m/z 8150 nachgewiesen. Wie die Spektren in Abbildung 3-38 zeigen, überwiegt allerdings die Signalintensität des zyklischen TrbC*s deutlich die der unprozessierten Form.

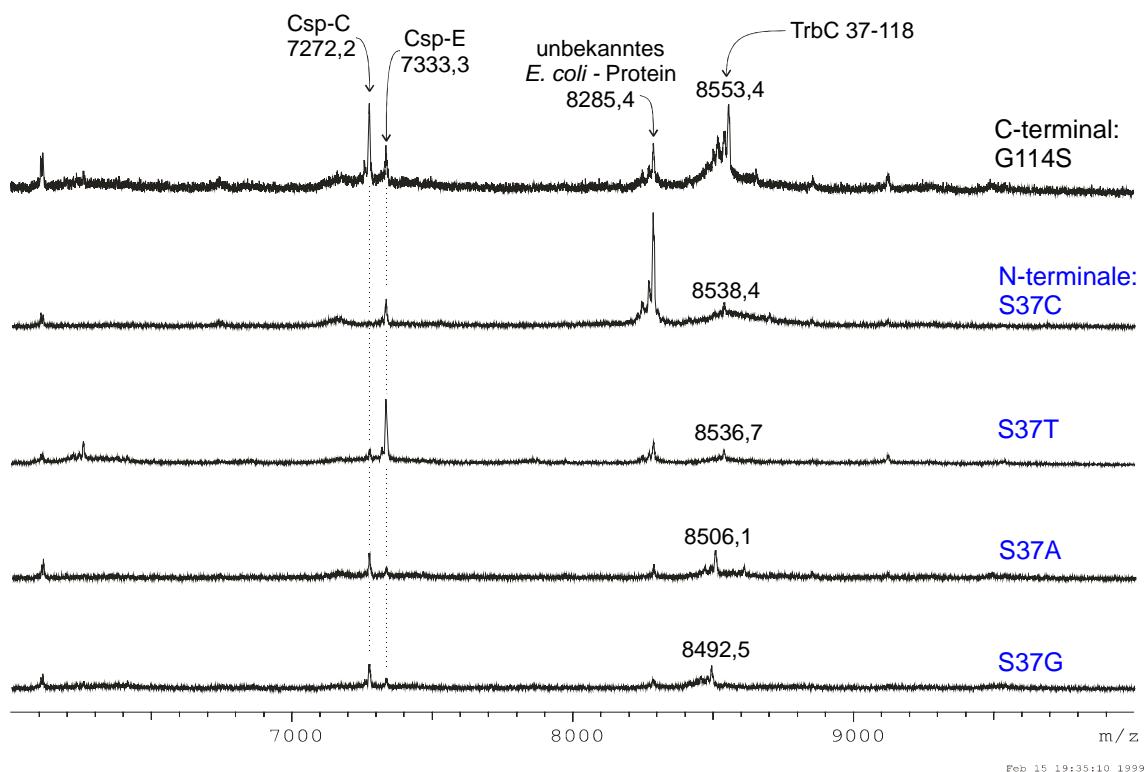
Klon	Genotyp	Beschreibung		
		MALDI-MS: TrbC bei m/z	zykliertes TrbC*	Gen-transfer ^{a)} ?
Stamm(Plasmidkombination Mutation) ^{a)}				
JE2571(pML123trbC V106M / pWP471)	Tra2: (<i>trbB</i> - <i>trbM</i>); <i>trbC</i> V106M Mutante; <i>traF</i> in <i>trans</i>	8151	ja	nein
HB101(pDB126mtrbC45 / pRE178F79Δ)	Tra1+2 Core, defektes <i>trbC</i> ; intaktes <i>trbC</i> als F79 Deletionsmutante auf pRE178 in <i>trans</i>	7972	ja	nein
HB101(pDB126mtrbC45 / pRE178G59R)	Tra1+2 Core, defektes <i>trbC</i> ; intaktes <i>trbC</i> auf pRE178 G59R Mutante in <i>trans</i>	8218	ja	nein
HB101(pDB126mtrbC45 / pRE178V96G)	Tra1+2 Core, defektes <i>trbC</i> ; intaktes <i>trbC</i> auf pRE178 V96G Mutante in <i>trans</i>	8077	ja	nein
HB101(pDB126mtrbC45 / pRE178G112D)	Tra1+2 Core, defektes <i>trbC</i> ; intaktes <i>trbC</i> auf pRE178 G112D Mutante in <i>trans</i>	8579	nein	nein
HB101(pDB126mtrbC45 / pRE178G42E)	Tra1+2 Core, defektes <i>trbC</i> ; intaktes <i>trbC</i> auf pRE178 G42E Mutante in <i>trans</i>	8191	ja	nein
HB101(pDB126mtrbC45 / pRE178I78S)	Tra1+2 Core, defektes <i>trbC</i> ; intaktes <i>trbC</i> auf pRE178 I78S Mutante in <i>trans</i>	8094	ja	nein
SCS1(pJH472 / pRE178E38Q)	<i>traF</i> ⁽⁺⁾ ; <i>trbC</i> E38Q Mutante in <i>trans</i>	8118	ja	-
SCS1(pJH472 / pRE178E47Q)	<i>traF</i> ⁽⁺⁾ ; <i>trbC</i> E47Q Mutante in <i>trans</i>	8118	ja	-
SCS1(pJH472 / pRE178E82Q)	<i>traF</i> ⁽⁺⁾ ; <i>trbC</i> E82Q Mutante in <i>trans</i>	8118	ja	-
SCS1(pJH472 / pRE178G114S)	<i>traF</i> ⁽⁺⁾ ; <i>trbC</i> G114S Mutante in <i>trans</i>	8150 & 8553	überwiegend ^{b)}	-

Tabelle 3-10: Prozessierung von TrbC Mutanten durch TraF;

„-“ bedeutet: nicht bestimmt, da die übrigen Gene des Dtr und MpF-Systems fehlen.

^{a)} Klonierung und Angaben: Ralf Eisenbrandt, ^{b)} Angabe bezieht sich auf die Signalintensität

TrbC-Mutanten ohne TraF



TrbC-Mutanten mit TraF

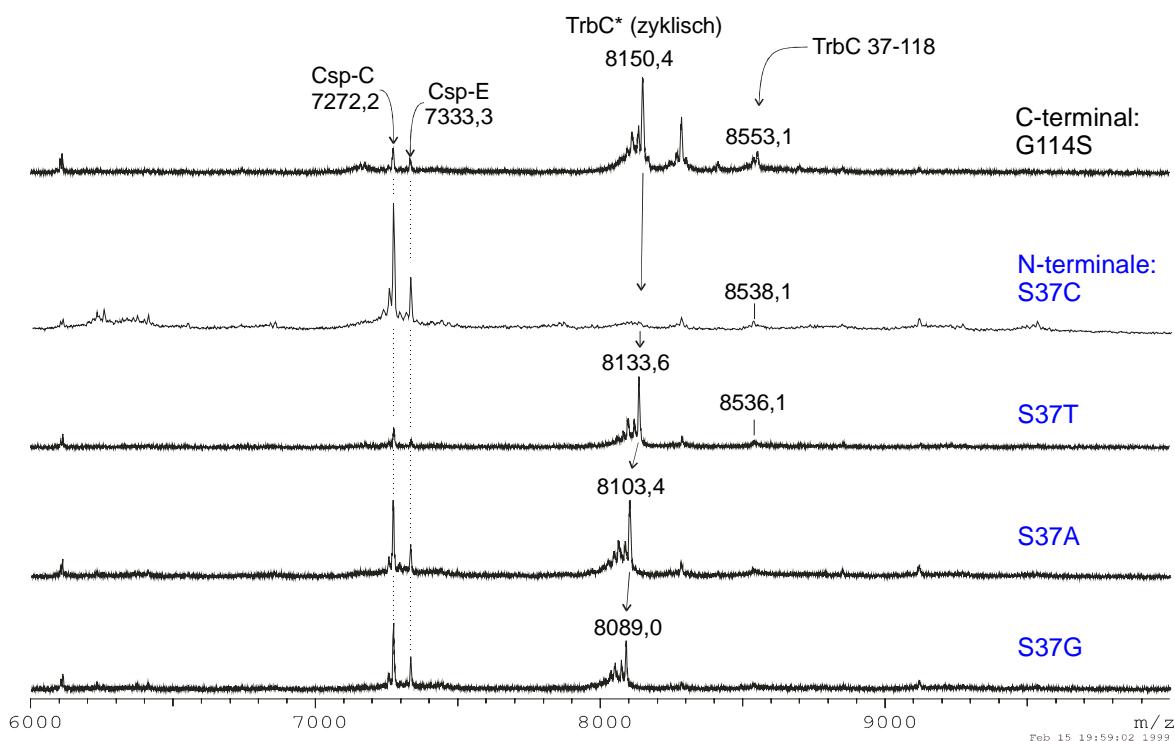


Abbildung 3-38: MALDI-MS Analyse einiger TrbC Mutanten aus Suspensionen der $TraF^{(-)}$ -Klone: $SCS1(pRE178G114S)$, $SCS1(pRE178S73C, T, A, G)$ und der $TraF^{(+)}$ -Klone $SCS1(pJH472 / pRE178G114S)$, $SCS1(pJH472 / pRE178S73C, T, A, G)$ in 0.1%-iger TFA. Die „cold shock“-Proteine Csp-C und -E werden aufgrund ihrer Identifizierung durch Dai et. al. als interne Massen-Standards verwendet (Dai, Li et al., (1999), vide supra).

Der nach Abspaltung des Signalpeptids entstandene N-Terminus des ^{Pro}TrbCs, (er entspricht dem des ^{n.m.}TrbCs), geht bei der Zyklisierung in Gegenwart von TraF die Peptidbindung mit Glycin Nr. 114 ein. Aus diesem Grund wurden verschiedene TrbC-Mutanten mit ausgetauschtem Serin Nr. 37 in Klonen mit und ohne *traF*-Gen untersucht (s. Spektren in Abbildung 3-38 und Tabelle 3-11). Die Austausche gegen Alanin und Glycin zeigen keinen Einfluß auf die Zyklisierung. Wird Serin Nr. 37 gegen Threonin ausgetauscht, so wird zyklisiertes TrbC*S37T bei m/z 8133,6 als intensives Signal neben weniger intensivem ^{n.m.}TrbCS37T bei m/z 8536,1 nachgewiesen. Nach dem Austausch gegen Cystein wird nur noch mutagenisiertes, unprozessiertes ^{n.m.}TrbCS37C bei m/z 8538,1 gemessen. Dieses Signal weist im Vergleich zu den Signalen der *E. coli*-Proteine und denen der anderen TrbC-Mutanten nur sehr geringe Intensität auf. Auch in Abwesenheit von TraF läßt sich das ^{n.m.}TrbCS37C nur mit ähnlich geringer Signalintensität detektieren. Bei allen vier Punktmutationen findet die Abspaltung des Signalpeptids sowie die C-terminale Verkürzung zum ^{n.m.}TrbC statt (s. Messungen in Abwesenheit von TraF).

Abbildung 3-39 faßt den Einfluß aller analysierten Punktmutationen und Deletionen des TrbCs auf die Zyklisierung durch TraF zusammen.

genomische Beschreibung TrbC-Mutante AS-Austausch am N-Terminus des ^{Pro} TrbCs	P h ä n o t y p			
	in Abwesenheit von TraF TrbC bei m/z (± 0,5)	1. & 2. Prozessierung	in Gegenwart von TraF TrbC bei m/z (± 0,5)	3. Prozessierung
S 37 C	8538,1*	ja	8538,1*	nein
S 37 T	8536,7	ja	8133,6 & 8536,1*	überwiegend
S 37 A	8506,1	ja	8103,4	ja
S 37 G	8492,5	ja	8089,0	ja

Tabelle 3-11: Ergebnis der MALDI-MS Analysen der Ser³⁷-Mutanten des TrbC (entspricht dem N-Terminus der ^{Pro} & ^{n.m.}TrbCs) zur Studie der TrbC-Reifung; TraF⁽⁺⁾-Klone: SCS1(pJH472 / pRE178S73C, T, A und G); TraF⁽⁻⁾-Klone: SCS1(pRE178S73C, T, A und G)

*geringe Signalintensität

Der Einfluß des C-terminalen Sequenzabschnitts ab Glycin Nr. 114 auf den 2. und 3. Prozessierungsschritt wurde anhand von Mutanten mit verkürztem *trbC*-Gen mit und ohne anschließenden Hexahistidin-„tag“ untersucht. Wie in Tabelle 3-12 gezeigt, prozessiert TraF ^{n.m.}TrbC auch dann noch, wenn statt vier nur noch drei C-terminale AS abgespalten werden können (Mutanten Δ3 bis Δ3.1 1h). Die letzte AS des derart verkürzten TrbCs, Isoleucin Nr. 117, kann dabei sogar gegen Histidin ausgetauscht werden (Mutante Δ3.1 1h). Der 2. Prozessierungsschritt wird umgangen, da das abzuspaltende Peptid AS 118-145 bereits fehlt. Wird dieses Peptid durch einen Hexahistidin-„tag“ ersetzt, so findet die 2. Prozessierung (durch die bisher unbekannte Protease) bei Mutanten mit den C-Termini: GRGAEIAHHHHHH und GRGAHHHHHH statt (Δ3h und Δ3.2h). In diesen Fällen wird jeweils der His-„tag“ abgespalten. Das verbleibende ^{n.m.}TrbC wird, wie zuvor beobachtet, in Anwesenheit von TraF zyklisiert. Erstaunlicher Weise geschieht dies bei dem mit Alanin Nr. 115 endenden ^{n.m.}TrbC welches aus dem 2. Prozessierungsschritt von TrbCΔ3.2h hervorgeht. Dagegen wird ein bis auf Alanin Nr. 115 verkürztes ^{PrePro}TrbCΔ3.2, welches die 2. Prozessierung nicht erfahren kann, nicht von TraF zyklisiert. Obwohl der 2. Prozessierungsschritt bei den Mutanten Δ3.05h und Δ3.1h nicht stattfindet, und so die C-Termini GRGAEIHHHHHH bzw. GRGAHHHHHH verbleiben, werden beide TrbC-Mutanten von TraF zu zyklischem TrbC* umgewandelt. Dazu spaltet TraF nicht mehr ein 4 AS langes Peptid sondern den aus 9 bzw. 8 AS bestehenden C-Terminus ab. Von der TrbCΔ4-Mutante wird auch in Anwesenheit von TraF nur das Signalpeptid abgespalten. Das resultierende, bei m/z 8137,6 gemessene TrbC entspricht formal einem linearen TrbC*.

genotypische Beschreibung			Phänotyp			
Bezeichnung	TrbC Mutante		in Abwesenheit von TraF TrbC bei m/z (± 0,5)	in Gegenwart von TraF		
	sequenz des C-Terminus	114 118 ↓ ↓		2. Prozessierung	TrbC bei m/z (± 0,5)	3. Gen- Prozess- ierung
wt	FFGRG AEIA ALGNGALHQV....A ¹⁴⁵		8522,0	ja*	8119,6	ja ja
Δ3	FFGRG AEIA		8522,0	-	8119,6	ja ja
Δ3.05	FFGRG AEI		8450,9	-	8119,6	ja ja
Δ3.1	FFGRG AEH		8474,0	-	8119,6	ja ja
1h						
Δ3.1	FFGRG AE		8338,0	-	8338,0	nein nein
Δ3.2	FFGRG A		?	-	8209,0	nein -
Δ4	FFGRG		8137,6	nein	8138,0	nein -
Δ3h	FFGRG AEIA HHHHHH		8522,0	ja**	8119,6	ja -
Δ3.05h	FFGRG AEIHHHHH		9273,0	nein	8119,6	ja -
Δ3.1h	FFGRG AEHHHHH		9161,6	nein	8119,6	ja -
Δ3.2h	FFGRG AHCCCCHH		8208,5	ja***	8119,6	ja -

Tabelle 3-12: C-terminale MALDI-MS / Mutagenesestudie am TrbC;

TraF⁽⁻⁾-Klone: SCS1(pRE178Δ3, Δ3.05, Δ3.1, Δ3.2, Δ4, Δ3h, Δ3.05h, Δ3.1h, Δ3.1 1h und Δ3.2h)

TraF⁽⁺⁾-Klone: HB101(pDB126mtrbC45 / pRE178Δ3, Δ3.05, Δ3.1 1h und Δ3.1),

SCS1(pJH472/pRE178Δ3.2, Δ4, Δ3h, Δ3.05h, Δ3.1h und Δ3.2h);

es bedeuten:

* FFGRGAEIA ✗ ALGN... „normale“ Prozessierung, d.h. Verkürzung nach Ala¹¹⁸

** FFGRGAEIA ✗ HHHHHH

*** FFGRGA ✗ HHHHHH der C-terminale Hexahistidin-„tag“ wird jeweils proteolytisch abgespalten

„-“ nicht zu beobachten, da C-terminales Peptid bereits fehlt bzw. nicht bestimmt, da die übrigen Gene des Dtr und MpF-Systems fehlen

,?“ kein TrbC Signal gefunden

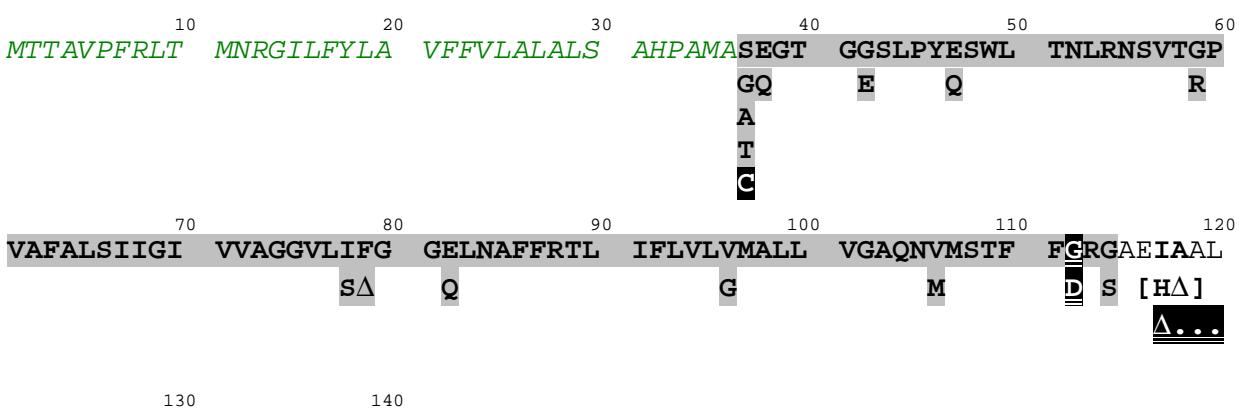


Abbildung 3-39: Ergebnis der Mutagenese / MALDI-MS Studien am TrbC.

kursiv: Signalpeptid; **hellgrau** hervorgehoben: Core-Sequenz des TrbC;

untenstehende, schwarze Buchstaben symbolisieren Mutationen und Deletionen, die keinen Einfluß auf die Prozessierung durch TraF haben. Die **invertiert** dargestellte Mutationen S37C, G112D, sowie die Verkürzung zum TrbC AS 1-116, verhindern die Prozessierung durch TraF.

Da TraF große Ähnlichkeiten zu einigen Serinproteasen aufweist (*vide infra*, Abschnitt 4.3.3 und Abbildung 4-8), wurden von Jana Haase bereits TraF-Punktmutanten (TraFS37A und TraFK89Q), die das angenommene aktive Zentrum dieses Enzyms betreffen, hergestellt. Gegenüber Stämmen mit dem *traF*-Wildtyp Gen weisen diese Mutanten eine um 2-3 Größenordnungen reduzierte Transferrate auf (Haase & Lanka, (1997)). Die mit der beschriebenen MALDI-MS Methode zur Untersuchung von Zellsuspensionen analysierten Klone (*vide supra*) zeigen, daß TrbC von mutagenisiertem TraFS37A und TraFK89Q nicht mehr prozessiert wird (s. Tabelle 3-13). Da die zwei vorausgehenden Prozessierungsschritte hiervon nicht beeinträchtigt sind, werden nur Signale des ^{n.m.}TrbC bei m/z 8522,0 gemessen.

Klon Stamm(Plasmid(e))	Genotyp	Beschreibung	
		MALDI-MS-Detektion des TrbC bei m/z	Phänotyp prozessiertes TrbC ?
HB101(pRE178)	pMS119EH; <i>trbC</i> ⁽⁺⁾ ; AS 1-145	8522,0	^{n.m.} TrbC (linear)
HB101(pJH472)	<i>traF</i> ⁽⁺⁾	-	-
HB101(pJH472 / pRE178)	<i>traF</i> ⁽⁺⁾ , <i>trbC</i> ⁽⁺⁾ (in <i>trans</i>)	8119,6	TrbC* (zyklisch)
HB101(pJH471S37A / pRE178)	<i>traF</i> ⁽⁺⁾ Mutante S37A, <i>trbC</i> ⁽⁺⁾ (in <i>trans</i>)	8522,0	^{n.m.} TrbC (linear)
HB101(pJH471K89Q / pRE178)	<i>traF</i> ⁽⁺⁾ Mutante K89Q, <i>trbC</i> ⁽⁺⁾ (in <i>trans</i>)	8522,0	^{n.m.} TrbC (linear)

Tabelle 3-13: Prozessierung von TrbC in Gegenwart von TraF und mutagenisiertem TraF
“-“ bedeutet: nicht zu beobachten, da kein *trbC*-Gen vorhanden.

3.5.8. Zyklische Pilin in anderen Organismen

In Anwesenheit der virulenten, Ti-(Tumor induzierenden) Plasmide bildet das *Agrobacterium tumefaciens* sog. T-Pili, wenn Wachstumsbedingungen bei niedrigen Temperaturen (~19°C) vorliegen und Acetosyringon zugegen ist (Fullner, Lara *et al.*, (1996), s. Einleitung, Abschnitt 1.2). Das *virB2*-Genprodukt, sowie die TrbCs aus den Tra-Regionen der Ti-Plasmide weisen deutliche Homologie zum TrbC aus RP4 auf (Abbildung 4-6). Stämme, die das *virB2*-Gen plasmidkodiert tragen, wurden in der beschriebenen Art und Weise massenspektrometrisch mit den *virB2*-freien Kontrollstämmen verglichen. In Analysen von *Agrobacterium tumefaciens* Suspensionen werden die VirB2 Proteinsignale im Falle der Plasmide pTi15955 und pTiA6 bei m/z 7214,5 (s. Spektren in Abbildung 3-40), und in Gegenwart des Plasmids pTiC58 bei m/z 7184,5 gefunden (s. Spektren in Abbildung 3-41 und Abbildung 3-42). Das jeweils bestimmte MW ist also wiederum um 18 Da leichter als das der entsprechenden „core“-Sequenz. Wie nachfolgend durch chymotryptische Peptidkartierung mit VirB2 aus gereinigten T-Pili bestätigt wird (nicht gezeigt), liegen tatsächlich zyklisierte Formen der VirB2-Proteine vor. Im Gegensatz zum TrbC/TraF-System lässt sich das zyklische VirB2 in *Agrobacterium* Suspensionen auch dann nachweisen, wenn keine weiteren Gene des Ti-Plasmids zugegen sind (s. Spektrum von NT1REB(pUCD4813) in Abbildung 3-41). Wird das *virB2*-Gen allerdings in *E. coli* kloniert (z.B. DH5α(pUCD4805) *virB2*⁽⁺⁾), so kann nur die unzyklisierte VirB2-Form bei m/z 7202,5 gemessen werden, von der ebenso, wie nach der Expression im *Agrobacterium*, das Signalpeptid abgespalten wurde (s. Spektren in Abbildung 3-42).

Das TrbC der Tra-Region der Ti-Plasmide wird wie bei den RP4 Analogen durch TraF (von Ti) prozessiert. Dies verdeutlichen Messungen mit dem *E. coli*-Klon SCS1(pPL178 / pPPLTraF) der die Gene *trbCTiC58* und *traFTiC58* enthält (s. Abbildung 3-43). Bisher konnten beim *Agrobacterium tumefaciens* allerdings noch keine Pili nachgewiesen werden, die das TrbC von Ti als Hauptkomponente enthalten. Zu bemerken ist, daß das TraF von Ti nicht das TrbC von RP4 zyklisiert (s. Abbildung 3-43). Ebensowenig lassen sich die TrbC homologen VirB2 Proteine in *E. coli* durch TraF von RP4 zyklisieren (Spektren nicht gezeigt).

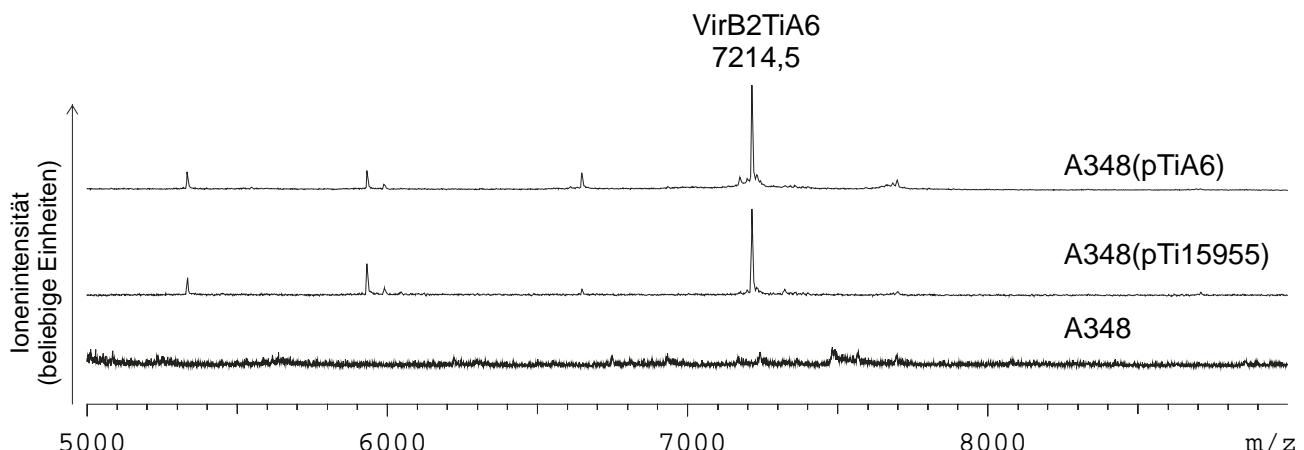


Abbildung 3-40: MALDI-MS Detektion des VirB2 Proteins von *pTiA6* und *pTi15955* in Zellsuspensionen. Der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm A348 wird als Kontrolle verwendet.

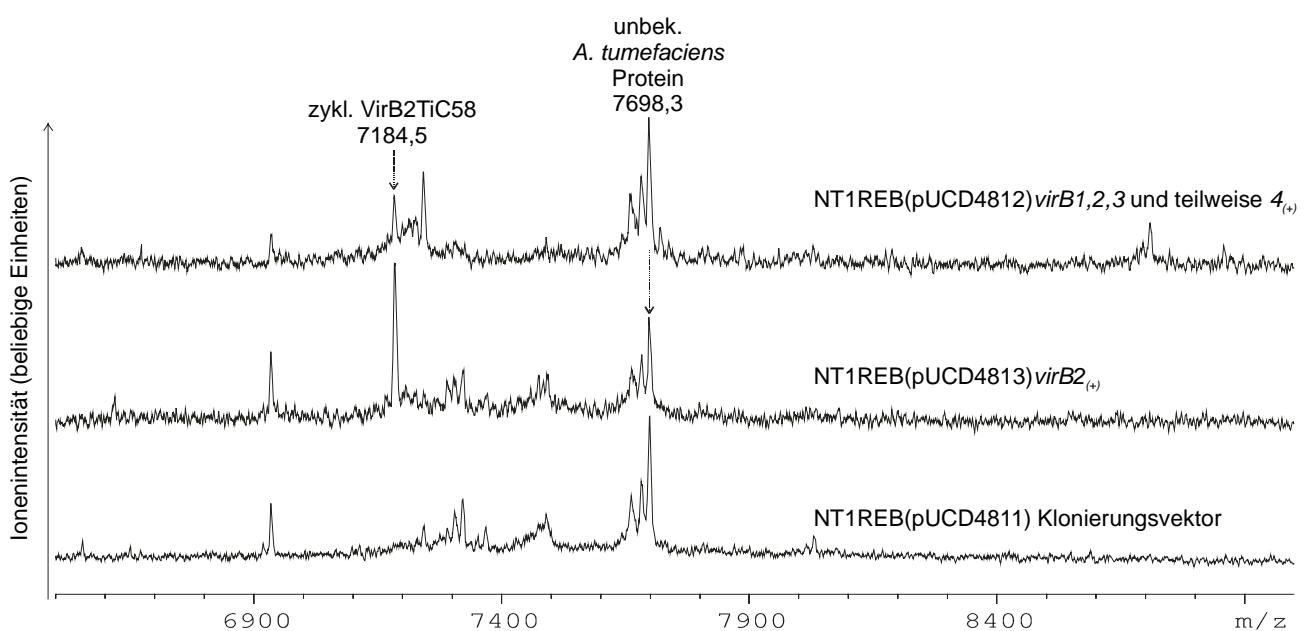


Abbildung 3-41: VirB2 von *TiC58* in MALDI-MS Analysen von Suspensionen des *Agrobacterium tumefaciens* Stamms NT1REB mit verschiedenen Genen des Ti-Plasmids (*virB1* bis *virB4*). Für die Zyklisierung von VirB2 sind außer *virB2* keine weiteren Gene des Ti Plasmids erforderlich. Zur Kontrolle wurde das Spektrum des Bakteriums mit dem Klonierungsvektor (NT1REB(pUCD4811)) gemessen.

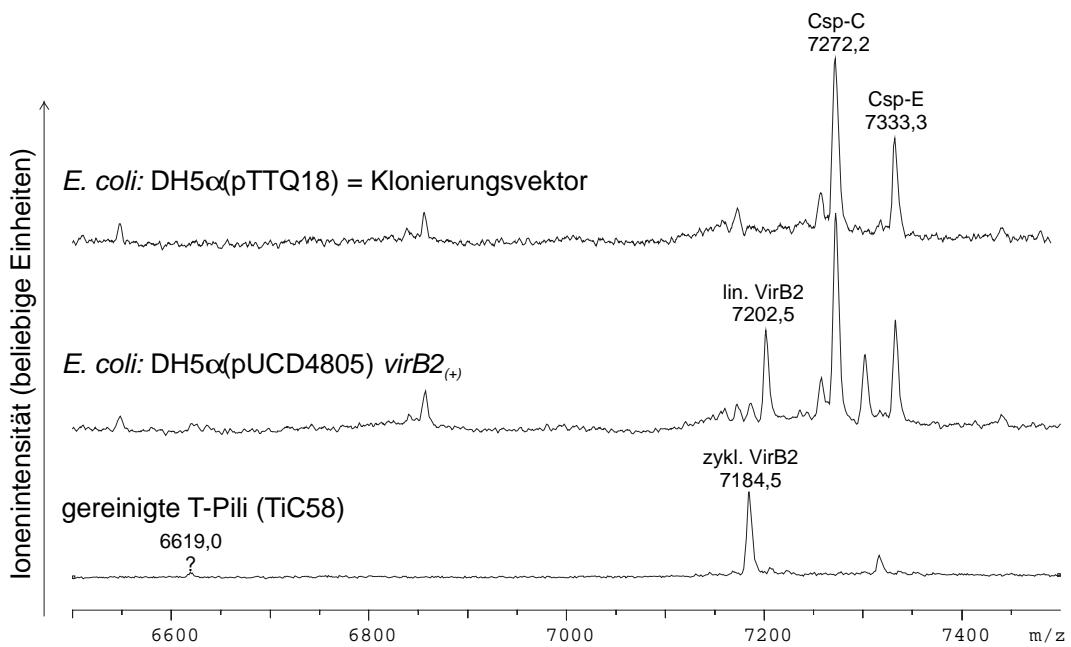


Abbildung 3-42: MALDI-massenspektrometrische Analyse der VirB2-Expression in *E. coli*. Im Gegensatz zum zyklischen VirB2 aus gereinigten T-Pili von *Agrobacterium tumefaciens* (TiC58) wird VirB2 in *E. coli* DH5 α nicht zyklisiert. Die „cold shock“ Proteine Csp-C und Csp-E werden auch in den TFA Suspensionen von DH5 α nachgewiesen.

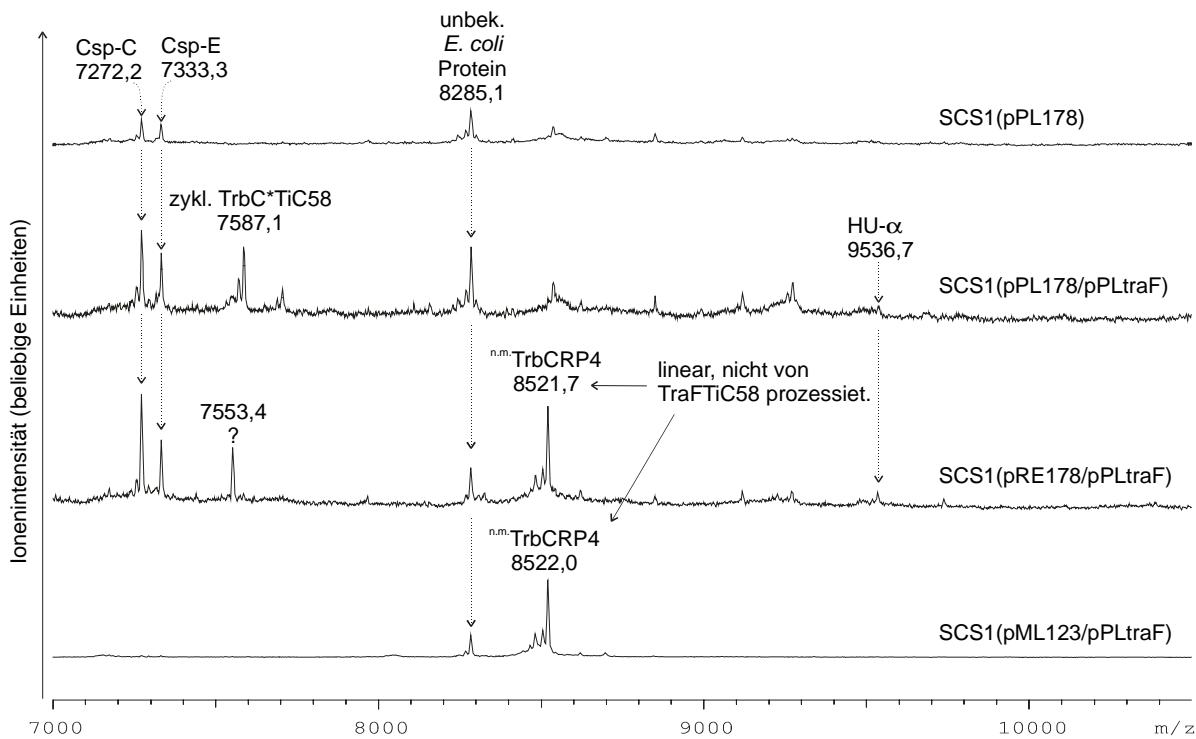


Abbildung 3-43: MALDI-MS Analyse der Zykлизierung von TrbC durch TraF in *E. coli*. Die Plasmide pPL178 und pPLtraF kodieren trbC und traF von TiC58. pRE178 trägt dagegen das trbC-Gen aus RP4, pML123 die komplette Tra2 Region von RP4. Im *E. coli* Stamm SCS1(pPL178 / pPLtraF) wird TrbC von TiC58 in Gegenwart von TraFTiC58 zyklisiert (Signal bei m/z 7587,1). In den Spektren der Stämme SCS1(pRE178/pPLtraF) und SCS1(pML123/pPLtraF) wird dagegen nur n.m. TrbC von RP4 bei m/z 8522 nachgewiesen, welches demnach von TrbCTiC58 nicht zyklisiert wurde. Die Ursache des Signals bei m/z 7553,4 im Spektrum von SCS1(pRE178 / pPLtraF) bleibt noch zu klären. Hierfür kommen entweder *E. coli* Proteine in Frage, die in den anderen Messungen supprimiert werden, oder eine bisher unbekannte Prozessierungsform von TrbCRP4 durch TraFTiC58.