

Massenspektrometrische Methoden für
die biochemische Proteomforschung:

Identität, Primärstruktur und Prozessierung
funktioneller Proteine der bakteriellen Konjugation.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Markus Kalkum aus Bonn

Berlin 1999

für Fabi

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach

2. Gutachter: Prof. Dr. Walter Messer

Diese Arbeit wurde im September 1995 am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in der Abteilung von Prof. Dr. Hans Lehrach begonnen und im April 1999 abgeschlossen.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Hans Lehrach, der mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte, sie in großzügiger Weise unterstützte und begutachtete. Prof. Dr. Walter Messer sei ebenfalls für seine Begutachtung gedankt.

Besonders möchte ich mich auch bei Dr. Erich Lanka bedanken, der mir durch seine offene und uneingeschränkte Bereitschaft zur Kooperation, den Zugang zu einem faszinierenden, hochaktuellen, molekularbiologischen Forschungsgebiet eröffnete und mich dabei tatkräftig unterstützte.

Ebenso herzlich danke ich Dr. Richard Reinhardt, Dr. Holger Eickhoff, Dr. Elmar Maier und Dr. Christine Gauss für ihre umfangreiche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima. Dr. Christine Gauss sei zudem für die hervorragende Verpflegung gedankt.

Ganz besonders danke ich:

Herrn Dipl.-Ing. für Biotechnologie Ralf Eisenbrandt für die genetischen Arbeiten und die Zuverfügungstellung von Zell- und Pilus-Material,

Dr. Günter Ziegelin, für die Isolation und Bereitstellung des TraHs,

Prof. Dr. Joachim Klose, für die Anfertigung der Proteinextrakte und der 2-DE-Trennung,

Martin Müller, für sein umfangreiches elektronisches „*Know How*“ welches dem Aufbau des Nano-Dispensier-Roboters sehr zugute kam,

Dr. Jana Haase, für die Bereitstellung gereinigten und geblotteten TrbKs,

Dr. Eckhard Nordhoff, für umfangreiche Unterstützung, sowie lehrreiche Diskussionen und konstruktive Kritik,

Herrn Dipl.-Ing. Holger Rauth für die magnetischen Partikel

Dr. Christoph Heller, Dr. Klaus-Dieter-Klöppel, Christine Lübbert, Martin Kunz, Roman Pawlik, Martin Horn, Thomas Przewieslik und Markus Kietzmann für nette Laboratmosphäre und ihre Hilfestellungen,

Dr. Karl-Otto Kräuter von der Fa. Bruker-Franzen, für die Anpassung der AutoXecute Skripten und der geduldigen Software-Unterstützung bei den automatischen MALDI-MS Messungen,

Familie Neumann von der Fa. Luigs & Neumann für ihre unbürokratische Hilfe und Expertise bei der Entwicklung des Mikromanipulator gesteuerten MALDI-MS Probenstisches,

den Mitarbeitern der MPI-Werkstätten für die technische Unterstützung,

meiner lieben Ehefrau Fabiana Kalkum, die mich fortwährend aufmunterte und mir stets beistand, meinen Eltern Engelbert G. und Eva M. Kalkum, die mir das Studium ermöglichten.

Finanziell wurde diese Arbeit von der „Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.“ und dem „Bundesministerium für Bildung und Forschung (bmb+f)“ im Rahmen des Projektes „Automatisierung der Genomanalyse“ (Förder.-Nr. 0311018) unterstützt.

Verzeichnis der Abkürzungen

2-DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
ABC	A mmonium b icarbonat (= Ammoniumhydrogencarbonat)
APS	A mmonium p eroxodisulfat
AS	A minosäure(n)
Bis	N,N'-Methylen bis acrylamid
CID	Kollisions-induzierter Zerfall (<i>collision induced decomposition / decay</i>)
Cys-aa	A cetamid modifiziertes Cystein (in Peptid)
Cys-am	A crylamid modifiziertes Cystein (in Peptid)
Da	D alton
DHB	2,4- D ihydroxybenzoesäure
Dtr	D N A Transfer und R eplikation bei bakterieller Konjugation
DTT	D ithio t hreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
ESI	Elektrosprayionisation (<i>electrospray ionization</i>)
EtOH	Ethanol
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (2-(4- h ydroxyphenyl azo)- b enzoic acid)
HCCA	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (4- h ydroxy- α - c yano c innamic acid)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IAA	trans-3-Inolylacrylsäure (<i>trans-3-indole acrylic acid</i>)
IP	I sotopen- P eak
kb	K ilobasen
kDa	K ilodalton
LSM	L ösungsmittel
m	M asse
MALDI	Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation (<i>matrix assisted laser desorption / ionization</i>)
MCP	Mikrokanalplatten-Detektor (<i>micro channel plate</i>)
MeOH	Methanol
β -ME	β - M ercaptoethanol
$[M+nH]^{n+}$	n -fach protoniertes, n -fach geladenes Molekülion
Mpf	Zell/Zell-Kontakt bei bakterieller Konjugation (<i>mating pair formation</i>)
MS	M assenspektrometrie, massenspektrometrisch
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
m/z	dimensionsloses Verhältnis aus Zahl der M asseneinheiten zur Ladungszahl
NC	N itrocellulose

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam ₃ Cys-	S-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]- α N-palmitoyl-(R)-cysteinyl-
PSD	Metastabiler Zerfall (bei MALDI-MS; <i>post source decomposition / decay</i>)
PVDF	Poly(vinyldifluorid)
RT	Raumtemperatur (~24°C)
SA	Sinapinsäure (<i>sinapinic acid</i>) \equiv 3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl)-acrylsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TCEP	Tris-(carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluor acetic acid</i>)
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tricin	N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
z	Ladungszahl

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	K	Lys	Lysin
R	Arg	Arginin	M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin	F	Phe	Phenylalanin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
C	Cys	Cystein	pE	pGlu	Pyroglutamin
Q	Gln	Glutamin	S	Ser	Serin
E	Glu	Glutaminsäure	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	W	Trp	Tryptophan
H	His	Histidin	Y	Tyr	Tyrosin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
L	Leu	Leucin			

Inhalt

1. EINLEITUNG	1
1.1. DIE MASSENSPEKTROMETRIE IN DER PROTEOMFORSCHUNG	1
1.1.1. MATRIX-ASSISTIERTER LASER DESORPTIONS/IONISATIONSMASSENSPEKTROMETRIE (MALDI-MS)	2
1.1.2. ELEKTROSPRAY IONISATIONSMASSENSPEKTROMETRIE (ESI-MS)	4
1.1.3. NOTWENDIGKEIT UND MÖGLICHKEITEN DER AUTOMATISIERUNG	6
1.2. HORIZONTALER GENTRANSFER DURCH BAKTERIELLE KONJUGATION	7
1.2.1. DIE GRUNDLAGE FÜR EIN „KLEINES“ PROTEOMPROJEKT: DER AUF ~27 GENEN BASIERENDE DNA-TRANSFERAPPARAT DER INCP-PLASMIDE.	9
1.2.2. AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	12
2. MATERIALIEN UND METHODEN	13
2.1. VERWENDETE MATERIALIEN UND DEREN BEZUGSQUELLEN	13
2.1.1. SUBSTANZEN	13
2.1.2. BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	14
2.2. MIKRODISPENSIERTECHNIK ZUR AUTOMATISCHEN MALDI-MS PROBENPRÄPARATION	15
2.2.1. HERSTELLUNG VON PIEZOJET-MIKRODISPENSERN	15
2.2.2. EINSTELLUNG UND OPTIMIERUNG DER PIEZOELEKTRONISCHEN PARAMETER	18
2.2.3. VORBEHANDLUNG DER ZU DISPENSIERENDEN FLÜSSIGKEITEN	18
2.3. ELEKTROAKUSTISCHES VERFAHREN ZUR EXAKTEN POSITIONIERUNG VON MEHRFACH-MIKRODISPENSEREINHEITEN (HARP)	18
2.3.1. AUFBAU DES HARP-SENSORS	19
2.3.2. DER MEBABLAUF	19
2.3.3. ELEKTRONISCHE SCHALTUNG ZUR AUSWERTUNG DES SENSORSIGNALS	21
2.3.4. BERECHNUNG DER ABWEICHUNGEN DER TROPFENAUFTRIFFPOSITIONEN	23
2.3.5. AUFBAU EINER SEMIAUTOMATISCHEN NANODISPENSIERSTATION ZUR HERSTELLUNG RASTERFÖRMIG ANGEORDNETER MINIATURISierter MALDI-MS PROBEN	24
2.4. BIOANALYTISCHE METHODEN	25
2.4.1. POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE)	25
2.4.2. COOMASSIEFÄRBUNG VON GELEN FÜR DIE MASSENSPEKTROMETRISCHE PEPTIDKARTIERUNG	25
2.4.3. SILBERFÄRBUNG VON GELEN FÜR DIE MASSENSPEKTROMETRISCHE PEPTIDKARTIERUNG	26
2.4.4. „IN-GEL“ PROZESSIERUNG UND PROTEOLYSE VON PROTEINEN	26
2.4.5. „ON-MEMBRANE“ PROTEOLYSE VON PROTEINEN	27
2.4.6. „ON-TARGET“ PROTEOLYSE VON PROTEINEN	27
2.4.7. „TRYPTISCHE“ PILUS-REINIGUNG	27
2.4.8. ZELLÜBERSTÄNDE UND ZELLSUSPENSIONEN FÜR DIE MALDI-MS ANALYSE	27
2.4.9. AUFZUCHT VON RP4-HALTIGEN <i>E. COLI</i> ZELLEN ZUR PROTEINEXTRAKTION UND 2-DE	27
2.4.10. MIKROSÄULENAUFREINIGUNG VON PEPTIDEN	28
2.4.11. AUFREINIGUNG VON PEPTIDEN MIT MAGNETISCHEN PARTIKELN	28
2.5. MASSENSPEKTROMETRIE	28

2.5.1.	AUTOMATISCHE UND MANUELLE MALDI-TOF-MS ANALYSEN	28
2.5.2.	PROBENPRÄPARATION FÜR DIE MALDI-MS ANALYSE	30
2.5.3.	ESI-MS / MS	30
2.6.	PROGRAMMIERUNG UND SOFTWARE	31
3. ERGEBNISSE		32
<hr/>		
3.1.	MINIATURISIERUNG UND AUTOMATISIERUNG DER PROBENPRÄPARATION FÜR DIE MATRIX-ASSISTIERTER LASER DESORPTIONS / IONISATIONS MASSENSPEKTROMETRIE (MALDI-MS)	32
3.1.1.	FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN DER PIEZOJET-MIKRODISPENSER	32
3.1.2.	MALDI-MS-ANALYSEN MIKRODISPENSIRTER PEPTIDE	34
3.1.3.	REPRODUZIERBARKEIT DER DISPENSIERTEN VOLUMINA	36
3.1.4.	REPRODUZIERBARKEIT DER MALDI-MS ANALYSE AUTOMATISCH ERZEUGTER SUBSTANZRASTER	36
3.1.5.	VERGLEICH VON DÜNNESCHICHT UND „SANDWICH“-MIKROPRÄPARATION	37
3.1.6.	REGELN FÜR ZUVERLÄSSIGES ARBEITEN MIT PIEZOJET-MIKRODISPENSERN	38
3.1.7.	VERBESSERTE POSITIONIERBARKEIT DER KLEINSTVOLUMINA MIT DEM HARP-SYSTEM	39
3.1.8.	REINIGUNG UND ANREICHERUNG VON PEPTIDEN MIT MAGNETISCHEN PARTIKELN	41
3.2.	IDENTIFIZIERUNG RP4-KODIERTER PROTEINE AUS VERGLEICHENDER ZWEIDIMENSIONALER GELELEKTROPHORETISCHER TRENNUNG	43
3.2.1.	IDENTIFIZIERUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN PROTEINSPOTS DURCH MANUELLE UND AUTOMATISIERTE MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE	45
3.2.2.	VERFEINERTE MANUELLE AUSWERTUNG DER MASSENSPEKTROMETRISCHEN DATEN DURCH BERÜCKSICHTIGUNG MÖGLICHER SIGNALPEPTIDE	49
3.3.	DER WEG ZUR AUTOMATISCHEN MALDI-MS AUSWERTUNG	52
3.3.1.	IDENTIFIZIERUNG MONOISOTOPISCHER UND UNAUFGELÖSTER MALDI-MS-SIGNALE	52
3.3.2.	DIE ISOTOPENVERTEILUNG NATÜRLICHER PEPTIDE ALS HILFSMITTEL ZUR ANALYSE MASSENSPEKTROMETRISCHER SIGNALE.	53
3.4.	DIE POSTTRANSLATIONALEN MODIFIZIERUNGEN DER GENPRODUKTE VON <i>TRAH</i> UND <i>TRBK</i>	56
3.4.1.	AUTOMATISIERTE MALDI-MS PEPTIDKARTIERUNG UND MANUELLE ESI-MS UNTERSUCHUNG VON <i>TRAH</i>	56
3.4.2.	UV/VIS-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN UND KOMPLEXCHEMISCHER NACHWEIS VON EISEN IN <i>TRAH</i>	59
3.4.3.	DAS „ <i>ENTRY EXCLUSION</i> “ VERMITTELNDE <i>TRBK</i> IST EIN LIPOPROTEIN	60
3.5.	MALDI-MS VOLLSTÄNDIGER ZELLEN UND ZELLÜBERSTÄNDE ZUR ANALYSE DER HAUPTPROTEINKOMPONENTEN KONJUGATIVER PILI.	62
3.5.1.	MASSENBESTIMMUNG DER INCP-PILUS HAUPTKOMPONENTE MIT <i>TRANS</i> -3-INDOLYL-ACRYLSÄURE ALS MALDI-MS MATRIX	62
3.5.2.	DER EINFLUSS DES LÖSUNGSMITTELS AUF DIE MALDI-MS ANALYSE VON PROTEINEN IN ZELL- SUSPENSIONEN UND ÜBERSTÄNDEN	63
3.5.3.	MEHRFACH PROZESSIERTES <i>TRBC</i> IST DIE PILUS-HAUPTKOMPONENTE DER INCP-PLASMIDE	65
3.5.4.	SIND INCP-PILIN (<i>TRBC</i> *) UND F-PILIN (<i>TRAA</i> VON F) IN GLEICHER WEISE POSTTRANSLATIONAL MODIFIZIERT?	69
3.5.5.	PERMUTATIVE PEPTIDKARTIERUNG BEWEIST DIE ZYKLISCHE PRIMÄRSTRUKTUR DER INCP-PILINE (<i>TRBC</i> *).	70

3.5.6.	IN DEN PRÄPARIERTEN PILI WERDEN SPUREN DER TRA2-PROTEINE TRBE & TRBH IDENTIFIZIERT	73
3.5.7.	MALDI-MS ANALYSEN MUTAGENETISCH VERÄNDERTER <i>TRBC</i> - UND <i>TRAF</i> -KLONE	75
3.5.8.	ZYKLISCHE PILINE IN ANDEREN ORGANISMEN	79
4. DISKUSSION		82
4.1.	AUTOMATISIERUNG PIEZOELEKTRISCHER MIKRODISPENSIERTECHNIKEN	82
4.1.1.	VOR- UND NACHTEILE	82
4.1.2.	DIE LÖSUNG DES POSITIONIERPROBLEMS BEI MEHRFACH-MIKRODISPENSERN DURCH DAS HARP-SYSTEM	83
4.2.	NICHTINDUZIERTER EXPRESSION VON TRA2 UND TRA1 PROTEINEN	84
4.2.1.	BEWERTUNG DER GELELEKTROPHORETISCHEN UND MASSENSPEKTROMETRISCHEN BEFUNDE	84
4.2.2.	MASSENSPEKTROMETRISCHER VERGLEICH AUTOMATISCHER UND MANUELLER PROBENPRÄPARATION	86
4.2.3.	AUTOMATISCHE MALDI-MS AUSWERTUNG	86
4.2.4.	EISENBINDENDEN TRAH	87
4.2.5.	DIE PAM ₃ -CYS-LIPIDMODIFIZIERUNG VON TRBK	88
4.2.6.	MALDI-MS ANALYSEN KOMPLEXER PROTEINGEMISCHE AUS ZELLSUSPENSIONEN	88
4.3.	DIE BESTIMMUNG DER PROTEINHAUPTKOMPONENTEN KONJUGATIVER PILI VON RP4, R751 UND TI	89
4.3.1.	DIE PROZESSIERUNG DES INCP-PILINS (TRBC) IM PERIPLASMATISCHEN SPALT	89
4.3.2.	ENZYMATISCHE PROTEOLYSE DES „PROTEASERESISTENTEN“ INCP-PILINS	90
4.3.3.	DIE TRBC-ZYKLISIERUNGSREAKTION - VORSCHLAG FÜR EINEN REAKTIONSMCHANISMUS	92
4.3.4.	WELCHE BEDEUTUNG KÖNNTE EINEM ZYKLISCHEN PILIN ZUGESCHRIEBEN WERDEN?	96
5. ZUSAMMENFASSUNG		97
6. SUMMARY		98
7. BIBLIOGRAPHISCHER NACHWEIS		99