

4. Diskussion

4.1. Automatisierung piezoelektrischer Mikrodispensiertechniken

4.1.1. Vor- und Nachteile

Der kontaktlose Probenauftrag, wie er durch die genannten Piezjets ermöglicht wird, bringt mehrere Vorteile mit sich:

- 1.) Die zu dispensierende Probe wird nicht mit den vorgelegten Substanzen kontaminiert.
- 2.) Adhäsionskräfte, die das Ablösen einer kleinen Flüssigkeitsmenge von der Pipettenspitze verhindern werden aktiv überwunden. Dadurch lassen sich Volumen und Spotdurchmesser der aufzutragenden Probe genau kontrollieren. Das übertragene Flüssigkeitsvolumen läßt sich so um Größenordnungen kleiner halten ($\geq 100\text{pl}$) als dies bei der Verwendung herkömmlicher Pipettenspitzen möglich ist.
- 3.) Vorbehandelte Oberflächen werden nicht mechanisch beansprucht. Abgesehen vom Anlösen der Matrixkristallflächen an deren Oberfläche verbleiben diese intakt und werden einheitlich von der Probenlösung bedeckt. Löcher und Kratzer in der Matrixschicht, wie sie versehentlich beim manuellen Beladen entstehen können bleiben aus.
- 4.) Ebenfalls entfällt der *Horse Shoe*-Effekt (auch *Donut*-Effekt), der durch ungleichmäßige Flüssigkeitsverdrängung aus der Probenmitte bei der Verwendung solider Stifte (sog. *Pin Tools*) als Übertragungswerkzeug auftritt (s. Abbildung 4-1). Proben mit *Horse Shoe*-Effekt lassen sich aufgrund ihrer uneinheitlichen Substanzverteilung nur schwer mit einem automatisiertem MALDI-Massenspektrometer analysieren.

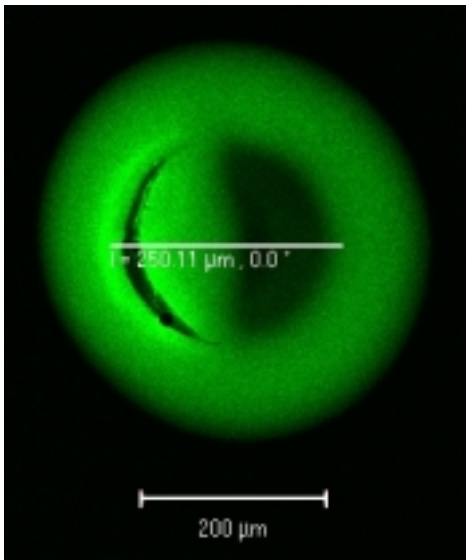


Abbildung 4-1:

Horse Shoe Effekt eines Spots Fluorescein markierter DNA welcher mit einem 250 µm „Gadget Pin-Tool“ auf Polyacrylamid gedruckt wurde.*

Deutlich erkennbar ist die Verdrängung der Substanz aus dem Innern der Probe sowie das Einreißen des Trägermaterials.

* Foto: freundlicher Weise von Herrn Dr. Holger Eickhoff zur Verfügung gestellt; Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin

4.1.2. Die Lösung des Positionierproblems bei Mehrfach-Mikrodispensern durch das HARP-System

Da die Tropfen die Austrittsdüse in einem stumpfen Winkel mit der Ebene des abgeflachten Kapillarendes verlassen, ist es erforderlich, die einzelnen Auftreffpositionen der Mikrotropfen aus einem aus einzelnen Piezjets aufgebauten Mehrfachdispensers zu kennen. Insbesondere zur automatischen Erstellung unverzerrter, dichter Substanzraster sowie zur vorteilhaften Mikropräparation von MALDI-MS Proben nach der „Sandwich“-Methode (s. Abschnitt 3.1.5) müssen die Abstände der einzelnen Tropfenauftrittspositionen als „Offset“-Werte beim Verfahren des Achsensystems berücksichtigt werden. Für die „Sandwich“-Probenpräparation ist es essentiell, daß die Matrixlösung exakt in die stehenden Tropfen der Analytlösung treffen. Andernfalls kann die Probe verlaufen und infolge der Kreuzkontaminationen unbrauchbar werden.

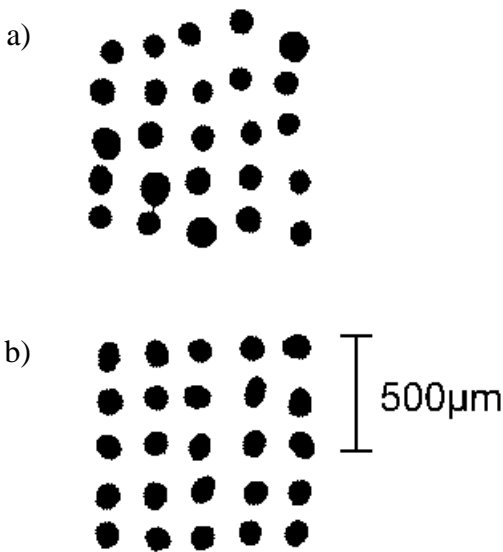


Abbildung 4-2: mit 1200 dpi gescannte, vergrößerte Aufnahme mikrodispensierter Farbstoffraster. Beide 5x5 Raster wurden mit einem 16-fach Piezjet-Mikrodispenser erzeugt. Im Raster a) wurden die Düsen mit der Videokamera, im Raster b) mit dem HARP-System ausgerichtet.

Pro Spot wurden 5 Tropfen 0,05%-iger Sulforhodamin-B-Lösung auf Zeichenpapier dispensiert. Die Piezjets wurden einzeln verfahren und der Reihe nach abgefeuert.

Die Anwendung der elektroakustischen Tropfendetektion zur Achsausrichtung bringt gegenüber der bekannten optischen Kontrolle folgende Vorteile mit sich: Die Anordnung ist leicht automatisierbar. Eine aufwendige Bilderkennungs- und Verarbeitungs- Software ist unnötig, stattdessen müssen vom Computer (bzw. vom Achssystem) lediglich 3 digitale Pegel ausgewertet werden. Das Achsensteuersystem benötigt einen schnellen Triggereingang, der die Positionsnotierung gestattet. Die erhaltenen „Offset“-Werte für die Ausrichtung der einzelnen Mikrodispenser sind genauer als die durch optische Ausrichtung mit nur einer Kamera erhaltenen Werte, da die Breite des Fokusbereiches keine genaue Positionierung längs der Blickrichtung ermöglicht (s. Abbildung 4-2). Das HARP-Verfahren arbeitet außerordentlich schnell. Die Tropfendetektion erfolgt während der Fahrt des Dispensierkopfes. Das gesamte automatisch ablaufende Ausrichtungsverfahren ist bei einem 16-fach Mikrodispenser in der Regel nach ca. 85 Sekunden abgeschlossen. Neben der hohen Empfindlichkeit bei der Einzeltropfendetektion (s. Abschnitt 3.1.7) liegen weitere Vorteile der Erfindung in der Störfestigkeit und in der vergleichsweise geringen Kostenintensität des Sensors begründet. Letztendlich wird die optische Tropfenkontrolle nur noch zur Einstellung der piezoelektrischen Parameter und Tropfenvolumina verwendet.

4.2. Nichtinduzierte Expression von Tra2 und Tra1 Proteinen

4.2.1. Bewertung der gelelektrophoretischen und massenspektrometrischen Befunde

Durch die vergleichende 2-DE Trennung und die massenspektrometrische Analyse einzelner Proteinspots werden fünf Proteine identifiziert (s. Abschnitt 3.2.), die das Plasmid pDB126 kodiert (s. Abbildung 4-3). Insgesamt beinhaltet pDB123 jedoch 23 Gene für Proteine aus den *Core*-Regionen von Tra1 und Tra2 aus RP4. Die fünf in intensiven Spots gefundenen Proteine LacI, TrbG, TraL, TrbJ und TrbM werden offensichtlich auch im nichtinduzierten Zustand am stärksten exprimiert, bzw. sind mit den angewendeten Methoden nachweisbar. Da keine vollständige Repression des LacI gesteuerten P_{tac} -Promotors (P_{tac}) erfolgt (*leaky mediation*), werden nachweisbar Tra-Proteine exprimiert (Balzer, Pansegrau *et al.*, (1994)), die in einem Operon vom P_{tac} -Promotor reguliert werden (s. Plasmidkarte in Abbildung 4-3).

In Tabelle 4-1 sind sämtliche, von pDB126 kodierten Proteine mit den derzeit bekannten Informationen über Funktion und Eigenschaften zusammengefaßt. Es fällt auf, daß von den 4 am stärksten exprimierten Proteinen der Tra-Regionen nur die Genprodukte von *trbG* und *trbJ* für den DNA-Transfer essentiell sind. In *E. coli* findet der konjugative DNA-Transfer auch ohne *traL* und *trbM* statt. Es ist denkbar, daß andere chromosomal kodierte Proteine von *E. coli* mögliche Funktionen der zuletzt genannten Genprodukte ersetzen.

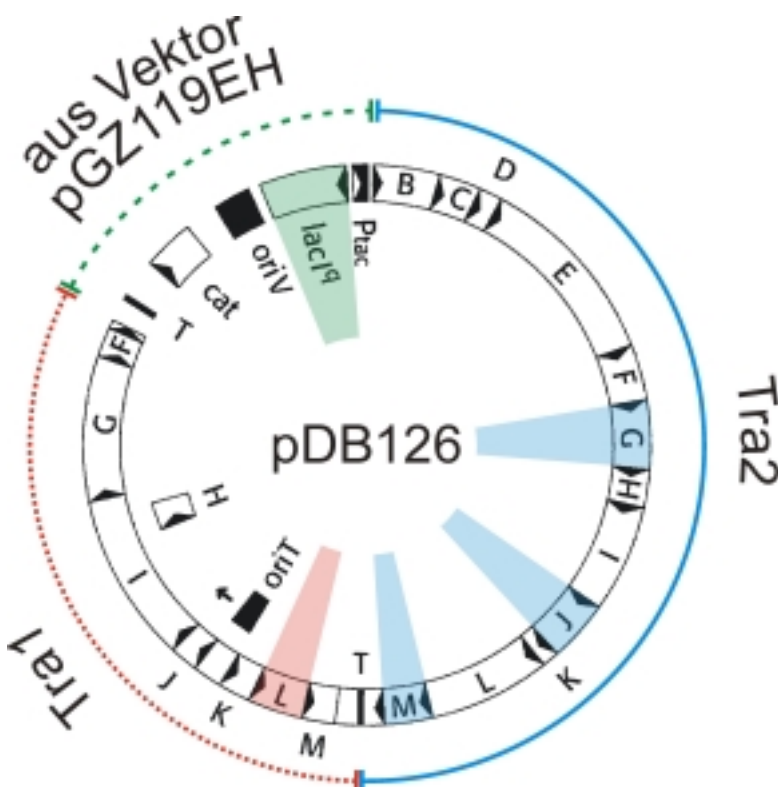


Abbildung 4-3: Genetische Karte des Plasmids pDB126, welches den Vektor pGH119EH sowie die komplette Tra1- und Tra2-core-Region enthält (Größe insgesamt: 22'666 Basenpaare).

Die Produkte der grau hinterlegten Gene werden durch vergleichende 2-DE als die im nichtinduzierten Zustand am stärksten exprimierten Proteine erkannt und per MALDI-MS identifiziert. Die Pfeile markieren die Genstarts.

Tra1: tra-Gene; Tra2: trb-Gene;

- T = Terminator Sequenzen;
- oriT = Transferursprung;
- cat = Chloramphenicolacetyltransferasegen;
- oriV = Ursprung der vegetativen ColD Replikation;
- P_{tac} = tac-Promotor;
- lacI^q = lac-Repressorgen

Protein	MW / [kDa]	pI	Kommentar
CAT	25,7	5,91	nicht im 2-DE-Gel, jedoch in Zellüberständen gefunden, s. Abschnitt 3.5.2 und Gel in Abbildung 3-27
Lac-Repress.	38,6	6,43	Regulation der Genexpression in pDB126
TraF	18,9	10,14	in der Zytoplasmamembran lokalisiert, unlöslich (Haase & Lanka, (1997)), prozessiert ^{n.m.} TrbC, s. Abschnitte 3.5.3 ff. und Diskussion in ausführlich Kapitel 4.3
TraG	69,9	9,45	vermutlich Bindeglied zwischen Dtr- und Mpf- System (Balzer, Pansegrau <i>et al.</i> , (1994))
TraH	12,9	4,21	läuft im Gel bei 22 kDa (pI ~4,5), Bestandteil des Relaxosoms, Fe-bindendes Protein, s. Abschnitt 4.2.4
TraI	81,6	10,78	Bestandteil des Relaxosoms, Relaxase, s. Einleitung, Abschnitt 1.2.1
TraJ	13,5	8,40	Bestandteil des Relaxosoms, DNA-Chaperon, s. Einleitung, Abschnitt 1.2.1
TraK	14,7	10,65	bindet am <i>oriT</i> , DNA-Chaperon, s. Einleitung, Abschnitt 1.2.1
TraL	26,6	5,40	Für den konjugativen Transfer in <i>E. coli</i> nicht essentiell, Motiv einer Bindestelle für ATP / GTP (Ziegelin, Pansegrau <i>et al.</i> , (1991))
TraM	15,6	5,78	Funktion unbekannt
TraX	1,2	8,43	reguliert die Expression der Tra-Gene (Cole & Guiney, (1995))
TrbB	35,0	6,69	Mpf-System, bildet Hexamere (Sabine Krause (1999), unveröffentlichte Ergebnisse)
TrbC	15,0	10,83	Mpf-System, Pilushauptkomponente, wird 3 mal prozessiert [M+H] ⁺ : 8119,5 Da; ausführlich diskutiert in Kapitel 4.3
TrbD	12,1	11,77	Mpf-System, Pilusaufbau, (Haase, Lurz <i>et al.</i> , (1995))
TrbE	94,4	6,53	Mpf-System, Pilusaufbau, (Haase, Lurz <i>et al.</i> , (1995)), wurde in der Pilusfraktionen gefunden, s. Abschnitt 3.5.6 und Diskussion in Abschnitt 4.3.2
TrbF	27,4	10,23	Mpf-System, Pilusaufbau, (Haase, Lurz <i>et al.</i> , (1995))
TrbG	32,6	6,94	Mpf-System, Pilusaufbau, (Haase, Lurz <i>et al.</i> , (1995)), Export-Signalpeptid wird prozessiert, s. Abschnitt 3.2.2
TrbH	16,9	10,00	Mpf-System, Pilusaufbau, (Haase, Lurz <i>et al.</i> , (1995)) in äußerer Zellmembran lokalisiert, typische Signalsequenz von Lipoproteinen, (Lessl, Balzer <i>et al.</i> , (1992)), wurde in der Pilusfraktionen gefunden, s. Abschnitt 3.5.6 und Diskussion in Abschnitt 4.3.2
TrbI	48,9	9,43	Mpf-System, Pilusaufbau, (Haase, Lurz <i>et al.</i> , (1995))
TrbJ	28,1	9,77	Mpf-System, Export-Signalpeptid wird prozessiert, s. Abschnitt 3.2.2
TrbK	7,3	8,79	„entry exclusion“-Funktion, in Zytoplasmamembran lokalisiert, N-terminaler Pam ₃ -Cys-Rest, s. Abschnitt 3.4.3
TrbL	52,2	4,91	Mpf-System, Pilusaufbau, (Haase, Lurz <i>et al.</i> , (1995))
TrbM	22,2	8,21	unbekannte Funktion, Export-Signalpeptid wird prozessiert, s. Abschnitt 3.2.2

Tabelle 4-1: Berechnete MW-, pI-Werte und Zusatzinformationen der von pDB126 kodierten Genprodukte. **Grau hinterlegt** sind die 2-DE separierten, massenspektrometrisch identifizierten, am stärksten exprimierten Proteine.

4.2.2. Massenspektrometrischer Vergleich automatischer und manueller Probenpräparation

In Abbildung 3-12 werden beispielhaft die Spektren der manuell präparierten MALDI-MS Probe des TrbG, TrbJ und TrbM mit dem Spektrum der mikrodispensierten Proben verglichen. Für die mikrodispensierte Probe wurde etwa 50 bis 100 mal weniger Analyt benötigt. Ihr Spektrum weist ein stärkeres Rauschen besonders im niedermolekularen Bereich auf, welches auf Ionen von Multimeren und Fragmenten der Matrix zurückzuführen ist. Das intensive Auftreten von Matrixsignalen bei geringem Analytanteil stimmt mit der gegenteiligen Beobachtung von Knochenmuss, Dubois *et al.*, (1996), überein, nach der die Bildung von Matrixionen in Gegenwart nennenswerter Peptidmengen ($\geq 0,5$ pmol) unterdrückt wird.

Abgesehen von wenigen Signalen, die auch nach manueller Präparation nur von geringer Intensität sind, werden in den Spektren der mikrodispensierten Probe die Signale der gleichen Peptide beobachtet. Da sich die Matrixsignale durch Kontrollmessungen aus den *Peak*-Listen herausfiltern lassen (s. Abschnitt 2.6), wird klar, dass der analytische Informationsgehalt beider Meßmethoden als gleichwertig anzusehen ist. Anhand der massenspektrometrischen Daten aus mikrodispensierten Proben werden bei wesentlich geringerem Probenbedarf dieselben Proteine identifiziert wie mit den Daten der manuell hergestellten Proben. Die elektrophoretische Auflösung eines 2-D-Gels nimmt mit zunehmender Proteinmenge ab. Um die geringen Proteinmengen kleiner Gelspots überhaupt handhaben zu können, ist eine weitere Miniaturisierung der Probenaufbereitung unumgänglich. Da die aus den prozessierten Gelspots gewonnenen Lösungen der Abbaupeptide in der Regel Salze und andere niedermolekulare Verunreinigungen enthalten, muß auch die Peptid-Reinigung an kleine Volumina angepaßt werden. Für weiteren Empfindlichkeitsgewinn ist außerdem eine Aufkonzentrierung erforderlich. Dies kann z.B. durch miniaturisierte *reversed phase* C18-Säulen oder durch magnetische Partikel mit peptidbindenden Oberflächen geschehen (s. Abschnitte 2.4.11 und 3.1.8). Die Reinigung und Anreicherung von Peptiden mit magnetischen Partikeln ist absehbarer Zeit mit geringerem technischen Aufwand automatisierbar als ein entsprechendes säulenchromatographisches Verfahren. Die Verwendung besonders kleiner magnetischer Partikel ermöglicht es sogar, diese direkt in Mikrodispensern einzusetzen (Kalkum, Müller *et al.*, (1998)). Die komplette Probenaufbereitung könnte daher zukünftig in Submikroliter Volumen erfolgen.

In der Miniaturisierung von MALDI-MS-Proben muß daher ein großes Potential für *Proteom*- und *Screening*-Projekte gesehen werden (Kalkum & Gauss, (1997), Schober, Günther *et al.*, (1993); Shalon, (1995), Allmaier, (1997)).

4.2.3. Automatische MALDI-MS Auswertung

Die in Abschnitt 3.3.1 beschriebene Methode zur automatischen Bestimmung monoisotopischer und mittlerer *m/z* Werte von Signalen im MALDI-Massenspektrum ermöglicht prinzipiell die selbstständige, automatische Auswertung von MALDI-MS Spektren. In Kombination mit Filterroutinen für *Peak*-Listen, mit denen Matrix-, Autoproteolyse- und Keratinsignale entfernbar sind, können automatisch Eingaben für Proteinverdau-Datenbanken wie „*MS-fit*“ generiert werden.

Die Interpolation der MS-Signale von Peptiden durch ein Gaußkurvenmultiplett sollte unbedingt mit einem Intensitätenmustervergleich ergänzt werden, der den massenabhängigen Intensitätsverlauf der Isotopen-*Peaks* reflektiert (s. Abschnitt 3.4). Auf diese Weise können Irrtümer, die auf falscher Zuordnung des monoisotopischen Signals beruhen, vermieden werden. Der Erfolg dieser Methode wird nur noch durch den seltenen Fall zweier überlappender Isotopenverteilungen begrenzt, deren gesamtes Intensitätsmuster einer natürlichen Verteilung gleicht. Derartige Signale werden allerdings auch durch manuelle Auswertung falsch interpretiert.

Da die statistische Verteilung der Ionenintensitäten von der Zahl der gemessenen Ionen abhängt, ist die Auswertung der Isotopenverteilung nur für intensive Signale sinnvoll. Wie in Abschnitt 3.4 gezeigt, können durch MALDI-TOF-MS Messungen derzeit nicht die berechneten Feinstrukturen im Intensitätsmuster von Peptiden mit und ohne Schwefel gemessen werden. Es muß angenommen werden, daß die gemessene Isotopenverteilung durch instrumentelle Parameter wie z.B. Nachhall-effekte durch elektrische Kapazitäten im Detektor oder die Totzeit und Anzahl der Kanäle eines „Multi-channel-plate-Detektors“ partiell verfälscht werden.

4.2.4. Eisenbindendes TraH

Das aus 118 AS bestehende, gut lösliche TraH weist keine Signalsequenz oder größere zusammenhängende hydrophobe Breiche auf. Sein berechneter pI liegt bei ~4,2. Aus den MALDI- und ESI-MS Analysen von TraH (bzw. MetHis₆-TraH) können keine Rückschlüsse auf bekannte Modifikationen oder Chromophore geschlossen werden. Die UV/VIS spektroskopischen Ergebnisse und komplexchemische Reaktionen mit Rhodaniden und Hexacyanoferraten belegen jedoch, daß TraH Eisenionen bindet (s. Abschnitt 3.4.2). Seine cysteinreiche Teilsequenz AS 70-108* weist Ähnlichkeiten zu Zinkfinger Motiven (Coleman, (1992), s. Abbildung 4-4 und Abbildung 3-20). Das *traR*-Genprodukt des F-Faktors weist ebenfalls eine Zinkfinger-Domäne auf, die als C4-Finger bezeichnet wird (Doran, Loh *et al.*, (1994)). In dieser Domäne besitzt TraR von F eine Homologie zum TraH von RP4 (s. Abbildung 4-4).

In mehreren Proteinen mit Zinkfingermotiven kann Zink durch Eisen ersetzt werden. So führt z.B. die Expression des Rubedoxingens von *Clostridium pasteurianum* in *E. coli* zu Zink und Eisenhaltigen Rubedoxin, deren Tertiärstrukturen nahezu identisch sind (Dauter, Wilson *et al.*, (1996)). Auch beim Östrogenrezeptor können Eisenionen das im Zinkfinger gebundene Zink *in vivo* und *in vitro* austauschen. Dies berichten Conte, Narindrasorasak *et al.*, (1996), über Studien mit dem in *E. coli* exprimierten Rezeptorgen. Der Zn/Fe Austausch bewirkt hier allerdings die Bildung freier Radikale, und dies führt zur Beschädigung der DNA. Möglicherweise ist das säurelabil gebundene Eisen in TraH in ähnlicher Weise über die 4 Cysteinschwefelatome in Form einer Koordinationsverbindung komplexiert.

Wie von Lanka und Pansegrau gezeigt wurde, stabilisiert TraH das Relaxosom, indem es mit TraI und TraJ Komplexe bildet (Pansegrau, Balzer *et al.*, (1990), Pansegrau, (1991)). TraH ist für den horizontalen Gentransfer zwar nicht essentiell, seine Anwesenheit in den Donorzellen führt allerdings zu einer Erhöhung der Transferrate (Cole, Lanka *et al.*, (1993)). Es ist denkbar, daß die biologische Funktion des TraHs bereits durch andere chromosomal kodierte *E. coli* Proteine erfüllt wird. TraR von F wird als ein für die Konjugation nicht essentielles Genprodukt beschrieben, welches wie TraH im Zytoplasma lokalisiert ist (Maneewannakul & Ippen-Ihler, (1993), Firth, Ippen-Ihler *et al.*, (1996)).

```

TraH/RP4 68 TVCERC P NSVWFASPAELK . . . CY.C RVMFLVTWSSKEPNQLTHC DGEFLGQEEG 118
           : || | | | : |           | | | :
TraR/F    35 YLCEACGNPIPEARRKIFPGVTL CVECQAYQERQRKHYA 73

```

Abbildung 4-4: Homologievergleich des cysteinreichen Sequenzabschnittes von TraH / RP4 mit der Zinkfinger-Domäne von TraR / F. Grau hinterlegt: Teilsequenzen mit AS die als Liganden für die Komplexierung von Metallkationen in Fragen kommen. Es bedeuten: „|“ Identität; „:“ Homologie.

* Nummerierung entsprechend dem TraH (118 AS lang)

Eisen ist für das Wachstum von *E. coli* und anderen Mikroorganismen essentiell. So nimmt Eisen in Häm-haltigen Proteinen (Cytochromen) am Elektronentransport teil. In Katalase und Peroxidase führt es zur Reduktion von H₂O₂. Eisenschwefelverbindungen spielen u.a. bei der Aminosäure- und Pyrimidin- Biosynthese, sowie bei der DNA-Synthese eine Rolle (Earhart, (1996)). In Eisenmangel-nährmedien sekretieren Bakterien und Pilze kleine Eisen-chelatisierende Verbindungen wie Phenolate, Hydroxamate, Oxazoline und α -Hydroxycarboxylate, die Siderophore genannt werden (von giech. σίδηρος = Eisen und φέρειν = tragen). Siderophor- gebundenes Eisen(III) wird von *E. coli* durch spezielle Transportsysteme, wie das Fhu-System aufgenommen. Insgesamt sind 5 verschiedene Transportsysteme bekannt, mit denen *E. coli* im aeroben Milieu Eisen(III)komplexe aufnehmen kann. Diese werden nach den beteiligten Siderophoren benannt: Enterochelin-, Aerobactin-, Ziträt-Fe³⁺-, Ferrichrom- und das Ferrioxamin B Hydroxamat- System. Allen 5 Systemen ist die Abhängigkeit von den in der Zytoplasmamembran lokalisierten Proteinen TonB, ExbB und ExbD, gemeinsam (Braun, (1995)). Ein weiteres System (*feoAB*) ermöglicht die Aufnahme von Fe(II) unter anaeroben Bedingungen, unter denen das Fe²⁺-Ion stabiler ist (Silver, (1996)).

Das Ferrichrom-Eisen-Transportprotein (*fhuD*-Genprodukt), welches in der äußeren Membran verankert ist, wurde in dieser Arbeit in den Zellüberständen von JE2571(pML123 / pWP471) nachgewiesen (s. Abschnitt 3.5.2).

4.2.5. Die Pam₃-Cys-Lipidmodifizierung von TrbK

Wie in Abschnitt 3.4.3 gezeigt, ist der N-Terminus des „*entry exclusion*“ vermittelnden TrbK höchstwahrscheinlich α -N-palmitoyliert und die Thiolfunktion des Cystein Nr. 1. mit einer 2,3-Bis-(palmitoyloxy)-propylgruppe S-acyliert (= Pam₃-Cys). Obwohl eine MS/MS-Analyse des N-terminalen Abbaupeptids aufgrund der, für Lipopeptide typischen, vergleichsweise schlechten Desorptions- und Ionisations- Eigenschaften nicht möglich war, wird der Befund durch das Ergebnis der Edman-Sequenzierung (keine AS-Identifizierung im 1. Zyklus) und das zu 6004,3 Da bestimmte Gesamtmolekulargewicht des [M+H]⁺ von TrbK untermauert. Nach Sankaran & Wu, (1994), wird zunächst die Thiolgruppe des Cystein innerhalb des konservierten Motivs -LAGC- der Lipoprotein-Signalpeptidase-Spaltstelle mit einem Diacylglycerolrest modifiziert. Anschließend erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids und daraufhin findet die Acylierung der freigesetzten α -Aminogruppe statt.

Vermutlich wird TrbK über die 3 hydrophoben Fettsäurereste in der Zytoplasmamembran verankert. Für die „*entry exclusion*“-Funktion scheint jedoch nur der innerhalb der IncP-Gruppe konservierte C-Terminus von TrbK und nicht die Lipidmodifizierung essentiell zu sein (Haase, Kalkum *et al.*, (1996), Haase, (1996)).

4.2.6. MALDI-MS Analysen komplexer Proteingemische aus Zellsuspensionen

Die in Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Messungen von MALDI-MS-Proben suspendierter Zellen, lassen den Schluß zu, das 0,1%-ige TFA die Zellhüllen weitgehend zerstört oder zumindest deren Permeabilität drastisch erhöht. Dagegen bleiben die Zellen in 25 mM Ammoniumacetatlösung weitgehend intakt. Das in den TFA Suspensionen enthaltene Gemisch aus Proteinen und anderen Substanzen ist komplex. Wie in Lubmans Arbeitsgruppe mit kombinierter HPLC-Fraktionierung und MALDI-MS- Analysen gezeigt wurde, sind in den MALDI-MS Spektren weniger Signale enthalten, als Komponenten im Gemisch vorhanden sind (Liang, Zheng *et al.*, (1996)). Es muß also zwingend gefolgert werden, daß sich zahlreiche Komponenten aufgrund von Suppressionseffekten der MALDI-MS Analyse entziehen. Wie in dieser Arbeit demonstriert wird, läßt sich jedoch die

Desorption und Ionisation einiger Komponenten erleichtern, wenn eine geeignete Matrix verwendet wird. Warum sich das IncP Pilin besonders gut mit der Matrix IAA desorbieren und ionisieren läßt, kann derzeit nur vermutet werden. IAA wurde von Danis & Karr, (1993), (1996), erstmals als brauchbare Matrix zur Analyse synthetischer Polymere von Methylmethacrylat, Styrol, Butadien und Isopren eingesetzt. Unabhängig von der hier vorgestellten Arbeit haben Green-Church & Limbach, (1998), erkannt, daß sich IAA besonders gut als Matrix für hydrophobe und kleinere zyklische Peptide eignet. Im Gegensatz zur MALDI-MS Analyse von Polymeren und den erwähnten hydrophoben Peptiden müssen zur Messung des Pilins keine Metallkationen wie Ag^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ zugesetzt werden. Austauschexperimente mit diesen Kationen haben gezeigt, daß Pilin bereits ausreichend protoniert wird und als $[\text{M}+\text{H}]^+$ nachweisbar ist*. Zudem scheint IAA die Denaturierung der aus Pilinaggregaten bestehenden Pili zu bewirken. Anders läßt sich nicht erklären, warum überhaupt einzelne Untereinheiten der kompakten Pilusstruktur desorbiert und ionisiert werden können.

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur MALDI-MS Analyse von Proben mit kompletten Zellen stellt eine Ergänzung zu Analysen dar, die auf massenspektrometrischen Peptidkartierungen beruhen. Mit automatischen Messroutinen wie „AutoXecute“ können die Proben der Zellsuspensionen in gleicher Weise abgearbeitet werden wie Peptidpräparationen. Lediglich die erwähnten „Fuzzy logic“ Parameter für die Peakauflösung sind dazu anzupassen (s. Abschnitt 2.5.1). Eine Notwendigkeit zur Miniaturisierung ist derzeit nicht erkennbar, da die Zellaufzucht in beliebigen Umfang möglich ist und kein (komplexes) Trennproblem besteht (*vide supra*, Abschnitt 4.2.2).

Auch die Probenaufbereitung gestaltet sich einfacher da, die Probe nicht auf Mikrosäulen gereinigt und aufkonzentriert werden muß. Niedermolekulare Verunreinigungen und Salze werden durch Waschen der Zellen und anschließend durch kurzzeitiges Spülen der kristallisierten Matrix entfernt. In Kombination mit Mutageneseexperimenten, können so auch proteaseresistente Proteine direkt identifiziert werden, aus denen sich keine Abbaupeptide („*peptide fingerprints*“ s. Einleitung, Abschnitt 1.1) gewinnen lassen. Anhand der ermittelten absoluten Molekulargewichte lassen sich zudem Aussagen über posttranslationale Prozessierung und Modifikationen der untersuchten Proteine treffen.

4.3. Die Bestimmung der Proteinhauptkomponenten konjugativer Pili von RP4, R751 und Ti

4.3.1. Die Prozessierung des IncP-Pilins (TrbC) im periplasmatischen Spalt

Mit dem „PHDhtm“- Programm des „Predict Protein“ Paketes am EMBL (Rost, Casadio *et al.*, (1995), Rost, Fariselli *et al.*, (1996)) werden zwei transmembranale Helices (TMH) in der „Core“- Sequenz von TrbC vorhergesagt. Die massenspektrometrisch bestätigte Abspaltung des Signalpeptids und die C-terminale Prozessierung (s. Abschnitt 3.5.3) führen dazu, daß die nun im Periplasma befindliche N-terminale α -Aminogruppe von TrbC ~ 24 AS-Reste vom Anfang des transmembranalen Bereichs entfernt ist. Die massenspektrometrisch charakterisierte C-terminale TraF-Prozessierungsstelle von TrbC (Carbonlygruppe von G114, s. Abschnitt 3.5.5 und 3.5.7) wäre nur ~ 11 AS Reste von der TMH entfernt. Wird also angenommen, daß TrbC tatsächlich über diese Helices in die Zytoplasmamembran eingebaut wird, so ist davon auszugehen, daß sich N- und C-Terminus nach den ersten zwei Prozessierungsschritten sterisch annähern können.

* Die spektrometrischen Daten der Austauschexperimente sind aus Platzgründen nicht gezeigt, können jedoch auf Anfrage beim Autor eingesehen werden.

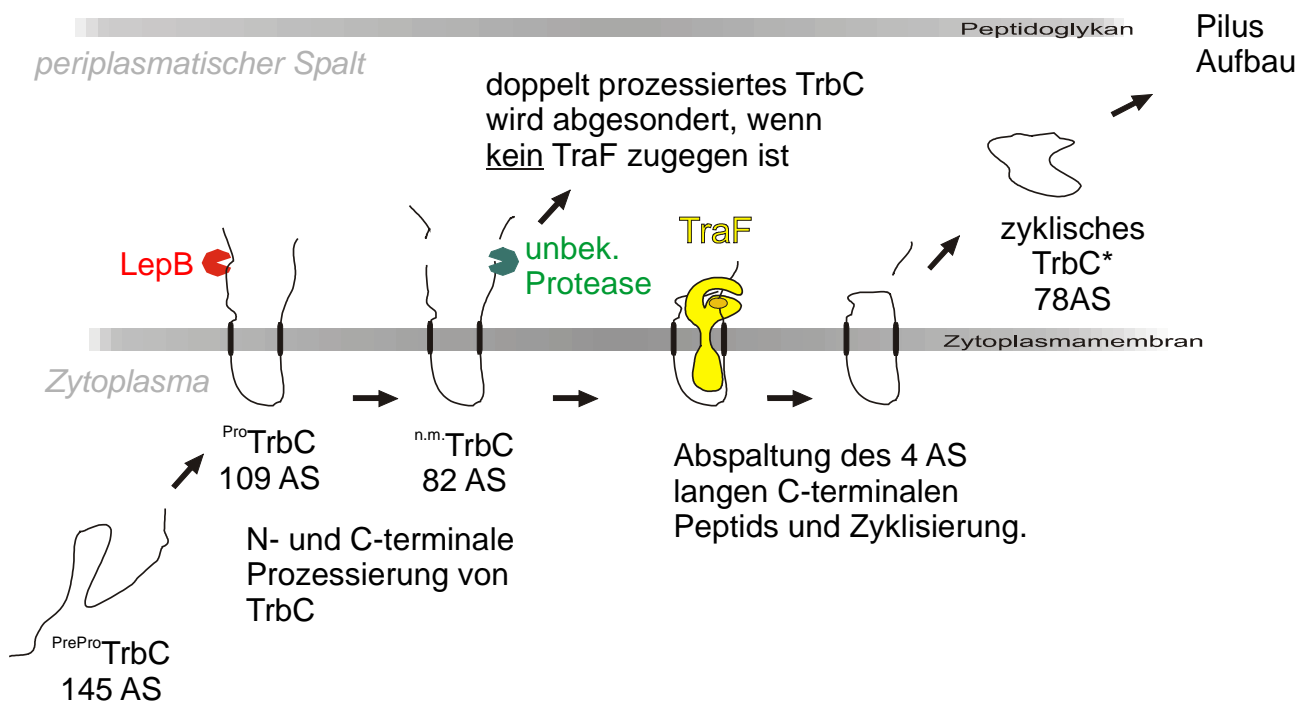


Abbildung 4-5: Die Reifung von TrbC im periplasmatischen Spalt.

Analog zu diesen Betrachtungen wäre das postulierte aktive Zentrum von TraF, S37 (Haase & Lanka, (1997)), ~9 AS-Reste von der TMH des TraFs entfernt (s. Abschnitt 4.3.3). Die Vorhersagewahrscheinlichkeit der diskreten TMH Segmente wird mit 95%-iger Genauigkeit angegeben (Rost, Casadio *et al.*, (1995)). Daher sind die angegebenen Entfernungen in den Primärstrukturen nicht als absolute Werte zu verstehen. Da sich die C-terminale Prozessierungsstelle von TrbC ähnlich weit von der TMH entfernt befindet wie das aktive Zentrum von TraF, kann davon ausgegangen werden, daß die beiden Proteine während der Zyklisierungsreaktion zuerst mit diesen Stellen in Kontakt treten (*vide infra*, Abschnitt 4.3.3). Zusammenfassend ist die Reifung von TrbC in der Abbildung 4-5 dargestellt.

4.3.2. Enzymatische Proteolyse des „proteaseresistenten“ IncP-Pilins

Trotz der Aggregation der Pili, die mutmaßlich auf der ausgeprägten Hydrophobizität des Pilins beruht, können proteolytische Abbaupeptide nach der „*on-target digest*“ Methode in Gegenwart hoher Dosen an Abbauenzymen wie Trypsin und Chymotrypsin gewonnen werden (*vide supra* Abschnitte 3.5.5 und 3.5.6). Dies deutet darauf hin, daß sich ein kleiner Teil des Pilins in einer für die Protease zugänglichen Konformation befindet. Das bei m/z 6131,3 detektierte tryptische Abbaupeptid AS 19-77 beinhaltet eine weitere tryptische Spaltstelle (R52), an der Trypsin jedoch nicht spaltet (s. Abschnitt 3.5.5). Die potentielle Spaltstelle befindet sich mitten im hydrophoben Bereich der 2. TMH. Für die inhibierende Wirkung natürlich vorkommender Peptid-Inhibitoren sowie Trypsin inhibierender Substanzen wie *p*-Aminobenzamidin und Benzamidin werden positiv geladene Reste in hydrophober Umgebung verantwortlich gemacht. Hier können sich starke hydrophobe Bindungen zwischen dem Substrat (Inhibitor) und dem Enzym ausbilden (Keil, (1971)).

In den Abbaugemischen aus nicht „tryptisch gereinigten“ Pili werden neben TrbC die Peptide der Proteine TrbE, TrbH und des Elongationsfaktor TU (EfTu) nachgewiesen (s. Abschnitt 3.5.6). Das an der ribosomalen Peptidsynthese beteiligte EfTu kommt als häufiges Protein mit bis zu 5% des Gesamtproteingehalts im Zytoplasma vor. Nach Furano kommen auf ein Ribosom ~14 EfTu-Moleküle (Furano, (1975)). Bei ~32000 Ribosomen pro Zelle (Kjeldgaard & Gausing, (1974); Skjold, Juarez *et al.*, (1973)) entspricht dies einem EfTu-Äquivalent von ~448000 Molekülen. Dagegen wurden von Jana Haase pro Tra2 haltige SCS1(pML123) Zelle ~50000 TrbE- und ~18000

spalten wird. Möglicherweise ist also der zum ^{n.m.}TrbC führende C-terminale Prozessierungsschritt für die korrekte Lokalisierung des TrbCs in der Zytoplasmamembran verantwortlich.

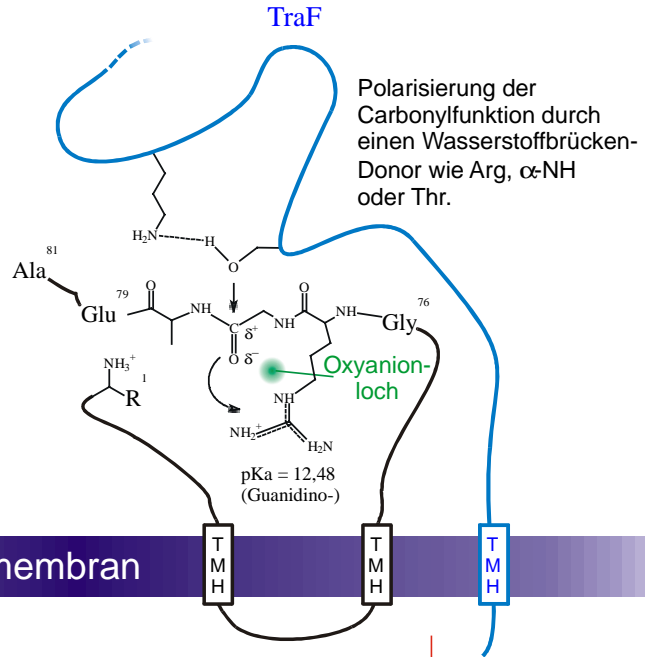
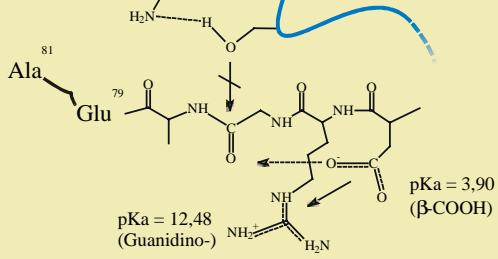
4.3.3. Die TrbC-Zyklisierungsreaktion - Vorschlag für einen Reaktionsmechanismus

Anders als VirB2 wird TrbC unter Abspaltung eines 4 AS langen, C-terminalen Peptids zyklisiert. Für die TrbC Zyklisierung wurde die obligatorische Anwesenheit von TraF nachgewiesen, dagegen wurde für das VirB2 gezeigt, daß seine Zyklisierung durch eine (oder mehrere) Komponenten des *Agrobacterium tumefaciens* bewirkt wird, die offensichtlich nicht vom Ti-Plasmid kodiert werden (*vide supra*, Abschnitt 3.5.8). Die molekulare Mechanismen dieser Zyklisierungsreaktionen dürften sich also deutlich unterscheiden.

Aufgrund der Homologie zwischen TraF und den Signalpeptidasen von *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Phormidium laminosum* (s. Abbildung 4-8, Haase & Lanka, (1997)) sowie aufgrund des MALDI-MS-Nachweises der unprozessierten ^{n.m.}TrbC-Form in Gegenwart von TraFS37A und TraFK89Q, darf angenommen werden, daß TraF höchstwahrscheinlich eine Serinprotease ist. Anders als die klassischen Serinproteasen (z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin), besitzt diese im katalytischem Zentrum keinen Histidin / Aspartat- Protonenakzeptor sondern ein Lysin (K89). Die proteolytische Aktivität des TraF wäre somit mechanistisch eher im Sinne einer katalytischen Dyade als einer katalytischen Triade zu charakterisieren (Paetzel & Dalbey, (1997)). Neben den erwähnten Signalpeptidasen ist der durch das Protein RecA aktivierte, selbstspaltende LexA-Repressor als typisches Beispiel für eine auf einer katalytischen Dyade basierenden Serinprotease zu nennen (Slilaty & Little, (1987)). Es ist vorstellbar, daß Serin Nr. 37 des TraFs durch den potentiellen Protonenakzeptor Lysin Nr. 89 aktiviert wird, und so das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Glycins Nr. 78 des ^{n.m.}TrbCs (entspricht G114 des ^{PrePro}TrbCs) nucleophil angreift (Abbildung 4-9). Dazu müßte sich das Akzeptor-Lysin allerdings im unprotonierten, ungeladenen Zustand befinden. Westheimer zeigte bereits in seinen Studien an Acetoacetatdecarboxylase, daß ein dem Lysin benachbartes Arginin den pKa des aktiven Lysins ($pK_{a\{\epsilon-NH_2\}}=10,54$) um bis zu 5 pKa „Einheiten“ absenken kann (Westheimer, (1995)). Hierfür macht der Autor elektrostatische Effekte bzw. Polarisierung verantwortlich. Im TraF von RP4 und R751, sowie in den meisten genannten Signalpeptidasen befindet sich das aktive Lysin tatsächlich in direkter Nachbarschaft zu einem Arginin (s. PILEUP Sequenzvergleich in Abbildung 4-8). Eine hydrophobe Mikroumgebung, wie sie (zumindest in der Primärstruktur) um Lysin/Arginin Nr. 89/90 beim TraF vorliegt, ist für die Absenkung des Lysin $pK_{a\{\epsilon-NH_2\}}$ ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Der nucleophile Angriff des Serin Hydroxyl-Sauerstoffatoms würde durch eine Polarisierung der Carbonylfunktion am Glycin Nr. 78 des TrbCs erleichtert. Dies könnte sogar durch die direkte Nachbarschaft zum Arginin Nr. 77 ermöglicht werden. Dessen Guanidinfunktion ($pK_a = 12,48$) ist bei physiologischen pH-Werten positiv geladen. Ein weiterer, negativ geladener Rest wie er im ^{n.m.}TrbCG76D enthalten ist, müßte die Polarisierung stören (s. oben links in Abbildung 4-9). Tatsächlich wird TrbCG76D nicht mehr von TraF zyklisiert (s. Abschnitt 3.5.7, Mutante ^{PrePro}TrbCG112D). Ohne weitere Daten könnte dies allerdings auch durch sterische Behinderung der Enzym/Substratkomplex-Bildung erklärt werden. In diesem Zusammenhang fällt auf, daß die ^{n.m.}TrbCs von RP4 und R751 jeweils einen Glutamatrest an Position 2 tragen. An derselben Stelle besitzt auch die „Abgangsgruppe“ (AEIA) ein Glutamat. Dies ist beim TrbC von TiC58 nicht der Fall. Hier weisen N-Terminus und „Abgangsgruppe“ (ASIG) an Position 2 jeweils ein Serin auf. Dafür wird jedoch das katalytisch wirksame Serin-36 des TraFs von TiC58 von einem Glutamat benachbart, wogegen TraF von RP4/R751 dort ein Isoleucin aufweist. Die TrbC RP4/R751 Arginine Nr. 77 sind bei TrbC C58 durch Threonine ersetzt (s. Abbildung 4-7). Offensichtlich kompensieren sich positive und negative Reste von Enzym und Substrat gegenseitig zugunsten einer hohen Substratspezifität und zugunsten eines ungeladenen, katalytisch wirksamen Lysins Nr. 89 (bzw. 90) im TraF. Dies, und die unterschiedlichen sterischen Ansprüche der genannten Reste

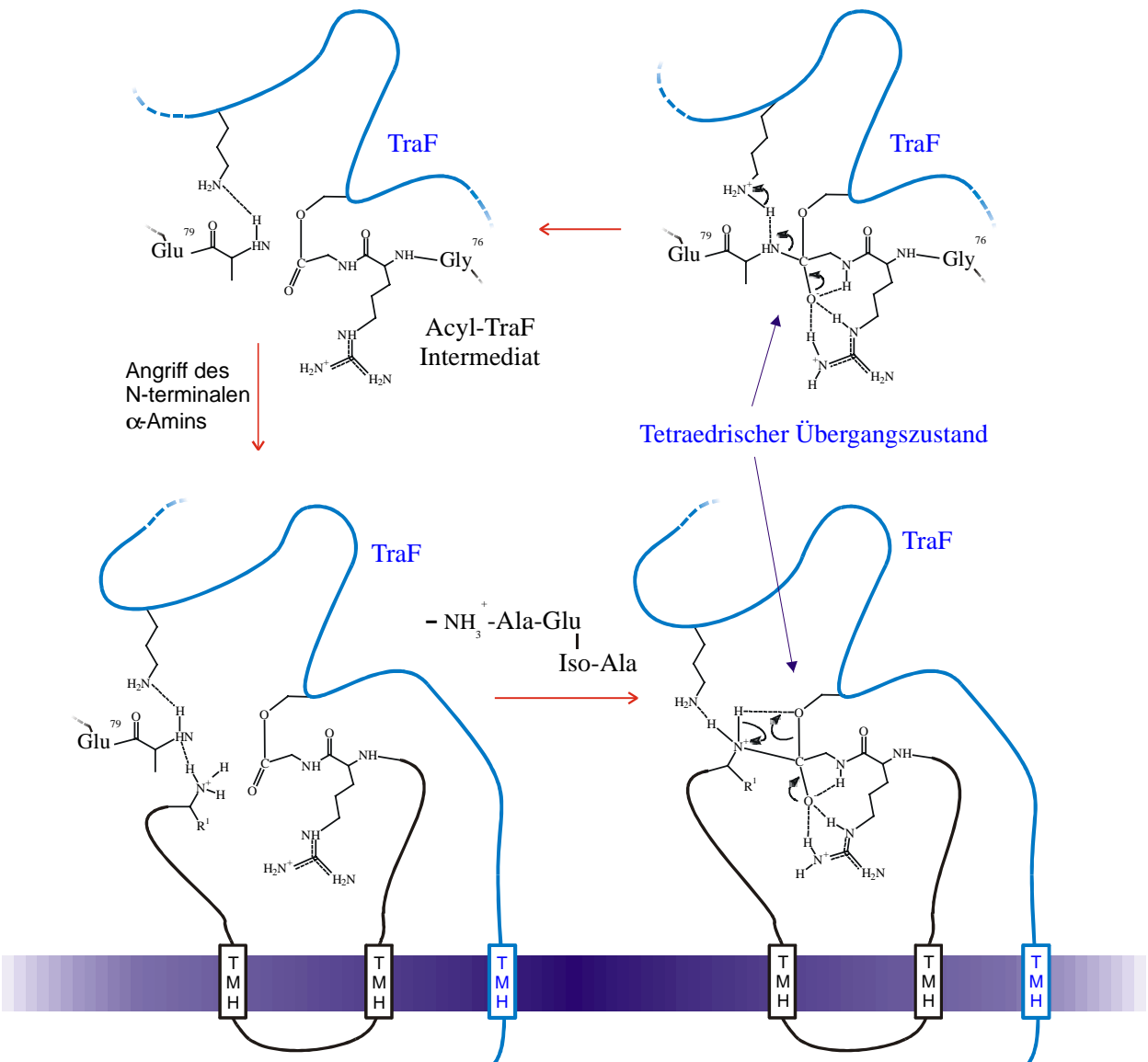
Keine Zyklisierung der TrbC Gly76Asp-Mutante: wird der nucleophile Angriff elektrostatisch verhindert?



Periplasma

Zytoplasmamembran

Zytoplasma



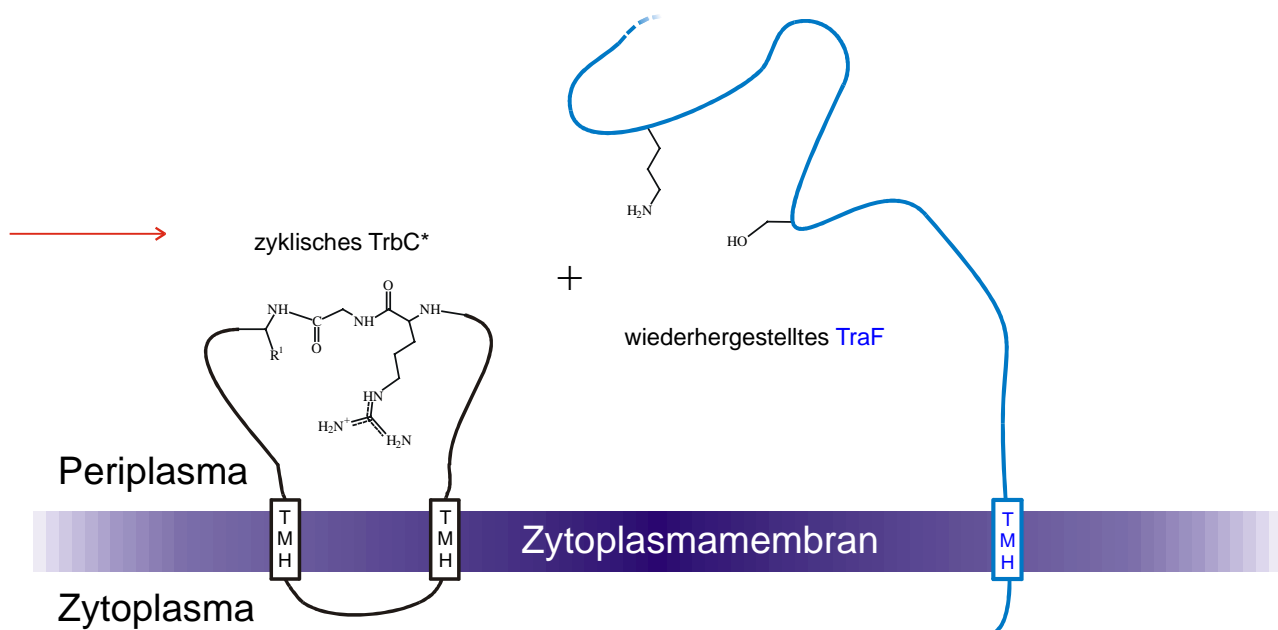


Abbildung 4-9: Postulierter Mechanismus der Zyklisierung des ^{n.m.}TrbCs durch TraF. Die einzelnen Schritte werden im Text anhand der massenspektrometrischen Analysen der TrbC und TraF-Mutanten sowie der Homologiestudien begründet; TMH = transmembranale Helix

Wird die Carbonylgruppe des RP4 TrbC Glycins Nr. 78 nucleophil vom Hydroxylsauerstoffatom des aktivierten TraF Serins angegriffen, so ändert sich die Konformation der trigonal-planaren CO-Gruppe in eine tetraedrische Halbacetalform. Der Carbonylsauerstoff muß sich also lokal verschieben können, und einen zuvor nicht beanspruchten Platz belegen. Langjährige Untersuchungen an Serinprotease ergaben, daß dies durch das sog. „Oxyanionloch“ realisiert wird. Hierin wird der nun acetalische Carbonylsauerstoff, der gleichsam einen Protonenakzeptor darstellt, durch Wasserstoffbrückenbindungen zu NH-Gruppen aus dem Peptidrückgrat fixiert (Robertus, Kraut *et al.*, (1972)). Wie im vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus in Abbildung 4-9 gezeigt, ist eine derartige Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustands auch für TraF denkbar. Im resultierenden TraF-Acylintermediat würde die bei der Auflösung der Peptidbindung G78-A79 frei werdende Bindungsenergie gespeichert. Ein Hinweis auf diese mögliche Energieerhaltung liefert die Messung des bei G114 endenden mutagenisierten TrbCs, welches nicht zyklisiert wird ($\Delta 4$ Mutante in Tabelle 3-12). Bei bekannten Serinproteasen, wie z.B. Trypsin, Chymotrypsin oder den genannten Signalpeptidasen (*vide supra*), wird das Acyl-Enzym unter Wassereinwirkung hydrolysiert. Arbeiten von Rose, Stöcklin *et al.*, (1991), und von Gaertner, Watanabe *et al.*, (1991), belegen, daß Acyl-Enzymintermediate von Serinproteasen in wasserarmer Umgebung auch mit anderen Nucleophilen reagieren können. Als industrielles Verfahren wurde z.B. die Aminolyse eines Schweineinsulin-Acyl-Trypsins in organischen Lösungsmittel zu semisynthetischen Humaninsulin eingesetzt (Markussen, (1987)). Höchstwahrscheinlich findet eine derartige Reaktion auch beim TrbC-acyl-TraF statt.

Die Frage, ob das Serin Nr. 1 des ^{n.m.}TrbC-acyl-TraFs nun mit der Hydroxyl- oder über die α -Aminogruppe mit der Acylfunktion reagiert konnte durch die MALDI-MS Analysen der TrbCS37-Mutanten eindeutig geklärt werden (s. Abschnitt 3.5.7., Abbildung 3-38 und Tabelle 3-11). Der pKa Wert der α -Aminogruppe eines Serins liegt bei 9,21. Somit muß der N-Terminus bei physiologischem pH fast ausschließlich in protonierter Form vorliegen. Daher wäre es denkbar, daß die Serinhydroxylgruppe wie beim Mechanismus des Proteinsplicings eine Esterbindung mit dem C-Terminus eingeht, die dann erst nachträglich durch Acyl-Umlagerung gegen eine Peptidbindung ersetzt wird (Perler, (1998)). Dies ist jedoch nicht der Fall. Die S37A und S37G Mutanten des TrbCs werden offensichtlich vollständig zu zyklischem TrbC* umgewandelt, ohne daß diese eine Hydroxylfunktion am N-Terminus tragen. Wie im vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus in Abbildung 4-9 dargestellt, könnte der protonierte N-Terminus sein Proton auf das

abgespaltene Tetrapeptid AEIA übertragen und konzertiert die Acylfunktion unter Bildung eines wiederum tetraedrischen Intermediates nucleophil angreifen. Letztendlich würde auf diese Weise zyklisiertes TrbC und wiederhergestelltes TraF freigesetzt werden. Diese Reaktion scheint durch sterische Effekte behindert zu werden, da bei den sterisch anspruchsvolleren TrbC Mutanten S37T und S37C die Reaktion zum zyklischen TrbC* unvollständig bzw. gar nicht abläuft (s. Abschnitt 3.5.7.). Da beim TrbCS37C auch in Abwesenheit von TraF nur schwache Singale des ^{n.m.}TrbCS37C gefunden wurden, kann nicht sichergestellt werden, ob ggf. dieses Protein ein schlechteres Substrat für die Signalpeptidase LepB darstellt. Daher bleibt in diesem Fall der Grad der Reaktionshinderung unklar. Auch die C-terminale G114S Mutante behindert die Zyklisierungsreaktion. Auffallend ist, daß bisher keine Mutante entdeckt wurde, die zu einem Hydrolyseprodukt der Masse 8137 Da führt. Entweder sind also die Zwischenprodukte besonders hydrolyseresistent oder die Reaktion verläuft sehr schnell und in einem konzertierten Modus ab, dessen Darstellung ohne weitere Strukturinformationen offen bleibt.

4.3.4. Welche Bedeutung könnte einem zyklischen Pilin zugeschrieben werden?

In vivo wird die Lebensdauer eines zytoplasmatischen Proteins teilweise durch die Art der N-terminalen Aminosäure bestimmt (Bachmair, Finley *et al.*, (1986)). Ein zyklisches Polypeptid (bzw. Protein) ist für Exoproteinasen überhaupt nicht angreifbar. Wie bereits erwähnt, läßt sich zyklisches TrbC auch mit den Endoproteinasen Trypsin und Chymotrypsin nur bei großen Enzym/Substratverhältnissen abbauen (s. Abschnitt 3.5.5). Ein aus zyklischen Pilin aufgebauter bakterieller Pilus wäre also (auch außerhalb der Zelle) besonders geschützt.

Das aus 70 AS bestehende Peptid AS-48, welches von *Enterococcus faecalis* produziert wird, besitzt ebenfalls eine zyklische Struktur die eine Peptidbindung zwischen C- und N-Terminus beinhaltet (Samyn, Martínez-Bueno *et al.*, (1994), Martínez-Bueno, Valdivia *et al.*, (1998)). Es zeigt eine breite mikrobielle Wirkung sowohl auf Gram-positive als auch auf Gram-negative Bakterien. Seine antibiotische Wirkung wird durch die Perforierung von Zellmembranen erklärt. Anhand von elektrischen Permeabilitätsmessungen wird sogar angenommen, daß AS-48 Kanäle in Lipiddoppelschichten bilden kann (Gálvez, Maqueda *et al.*, (1991)). Das wesentlich kleinere, zyklische Decapeptid Gramicidin S (10AS) wirkt nur gegen Gram-positive Bakterien antibiotisch. Im Gegensatz zu dem aus natürlichen AS bestehenden AS-48 ist Gramicidin S aus L- und D-Aminosäuren aufgebaut und enthält außerdem die nicht-Protein-bildende AS Ornithin (Orn = 2,5-Diaminopentansäure). Die Wirkung der Gramicidine (auch der nichtzyklischen) beruht auf der Zerstörung von Protonen-Gradienten (z.B. bei der oxidativen Phosphorylierung), indem sich aus Gramicidindimeren helikale, kanalartige Strukturen der Zellmembran ausbilden. Inonophoretisch werden hierdurch spezifische Kationen (Na⁺ und K⁺) hindurchgeschleust (Woolley & Wallace, (1992), Wallace, (1990) und (1992)).

Die Biosynthese von Gramicidin S verläuft nicht ribosomal, sondern vielmehr über einen multi-enzymatischen Mechanismus, der als „Thiotemplat Mechanismus“ bezeichnet wird (Saito & Otani, (1970)). Vergleichbar verlaufen die nicht ribosomalen Biosynthesen weiterer zyklischer Peptidantibiotika wie die Actinomycine, Polymyxine, Tyrocidine und Etamycin (Kleinkauf & von, (1990)). Wie auch die stark giftigen, peptidartigen, zyklischen Amanitine und Phallotoxine des grünen Knollenblätterpilzes, und die als Immunsuppressiva bedeutsamen Cyclosporine, enthalten diese teilweise alternierende D- und L-AS-Abfolgen und so seltene AS wie z.B. γ,δ -Dihydroxyisoleucin oder Methylaminooctansäure (Römpp, (1995)).

Elektrochemische Messungen von Daugelavičius, Bamford *et al.*, (1997) belegen, daß der IncP plasmidkodierte Mpf-Komplex, zu dem auch die *trbC*- und *traF*-Gene gehören, die Permeabilität bakterieller Zellhüllen für lipophile Verbindungen und ATP erhöht. Es wäre denkbar, daß sich diese erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembranen auf das zyklische TrbC* zurückführen läßt.