

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden erstmals systematische Untersuchungen zur geordneten Übertragung von Substanzen auf MALDI-MS Probenträger mit einem, aus mehreren piezoelektrischen Mikrodispensern bestehenden, Robotersystem vorgestellt. Die Herstellung, Optimierung und sichere Anwendung von Piezojet-Mikrodispensern, mit denen sich Flüssigkeiten in Subnanoliter-Volumina portionieren lassen, ebenso wie ein patentiertes elektroakustisches Verfahren zur präzisen, vollautomatischen Positionierung dieser Kleinstsubstanzenmengen wird detailliert beschrieben. Es zeigt sich, daß die Anwendung dieses Mikrodispensierverfahrens auf die Probenherstellung für die MALDI-MS Analyse einen großen Vorteil für die Proteinidentifizierung bewirkt: Es müssen nur noch Femtomole an Abbaupeptiden in das Massenspektrometer überführt werden, um ein qualitativ ebenbürtiges Ergebnis zu erzielen. Dies sind ~ 1 % der bisher benötigten Menge. Auf diese Weise lassen sich MALDI-MS-Probenträger mit sehr hoher Probendichte herstellen, die dann vollautomatisch gemessen werden.

Algorithmen zur automatischen Auswertung von MALDI-MS Spektren, welche die Daten monoisotopischer und nicht aufgelöster Signale zusammen mit Qualitätsfaktoren wie Auflösung und Signal- / Rauschverhältnis extrahieren und für Datenbanksuchen bereitstellen, wurden erstellt und angewendet. Eine fünffache Gausskurvenanpassung, sowie die Berücksichtigung der natürlichen Isotopenverteilung von Peptiden wird zur Separation überlappender massenspektrometrischer Signale genutzt.

Die Identität funktioneller Proteine des DNA-Transferapparates der bakteriellen Konjugation wurde nach ein- und zweidimensionaler gelelektrophoretischer Trennung, sowie nach Immobilisierung auf Membranen, durch massenspektrometrische Bestimmung der Abbaupeptide belegt. Primärstruktur- und komplexchemische Analysen beweisen u.a. daß der Relaxosomenbestandteil, TraH, ein eisenkomplexierendes und das „entry exclusion“ vermittelnde TrbK ein Lipo- Protein ist. Außerdem wurde die Abspaltung des bisher nur postulierten Signalpeptids von TrbM bestätigt. Im nichtinduzierten Zustand werden in *E. coli* Lac-I, TrbG, TraL, TrbJ und TrbM als die am stärksten exprimierten, plasmidkodierte Proteine nachgewiesen.

Die routinemäßige Berücksichtigung vorhergesagter Signalpeptide für die Proteinidentifizierung anhand von Datenbanksuchen mit Abbaupeptidmassen bewirkt eine erhebliche Steigerung der Sequenzabdeckung und stellt ein charakteristisches Merkmal dar, welches von derzeit verfügbaren MS-Identifizierungsprogrammen noch nicht benutzt wird. MALDI-MS Analysen mit Proben ganzer Zellen wurden zur Identifizierung der Hauptkomponente des extrazellulären Pilus optimiert. Mit der üblicher Weise für synthetische Polymere genutzten MALDI-MS Matrix *trans*-3-Indolylacrylsäure läßt sich das Genprodukt von *trbC* als Pilushauptkomponente in bisher unerreichter Empfindlichkeit detektieren. „On-Target“-Proteolyse der „proteaseresistenten“ Pili wurden zur Entschlüsselung der Primärstruktur der IncP-Piline genutzt. Das von RP4 kodierte, in *Escherichia coli* ribosomal synthetisierte, Pilin wird nach mehrfacher Prozessierung von TraF zu einem 78 Aminosäuren großen zyklischen Molekül umgewandelt. Die ehemaligen N- und C-Termini werden dabei über eine Peptidbindung miteinander verknüpft. Das resultierende Zyklusprotein stellt das derzeit weltweit größte bekannte zyklische Polypeptid dar. Das vom Schwesterplasmid R751 kodierte TrbC, sowie das *virB2*-Genprodukt von *Agrobacterium tumefaciens* hat eine analoge zyklische Primärstruktur. Eine Kombination aus Mutageneseexperimenten und der MALDI-MS Analyse kompletter Zellpräparationen erweitert die Vorstellung über einen möglichen molekularen Zyklisierungsmechanismus: Im periplasmatischen Raum spaltet die Serinprotease TraF ein 4 Aminosäure langes Peptid vom C-Terminus des TrbCs ab. Es wird postuliert, daß sich das resultierende Acyl-Enzym durch Aminolyse mit der  $\alpha$ -Aminogruppe von TrbC in zyklisches TrbC\* und in wiederhergestelltes TraF aufspaltet.