

# **Die Transferproteine TraG und TrbB des konjugativen Plasmides RP4: Strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zu analogen Komponenten anderer Transportsysteme**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
des Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Sabine Krause**  
(Dipl.-Ing. für Biotechnologie)  
aus Berlin

*Tag der mündlichen Prüfung:* 02.12.1999

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Udo Heinemann

Begutachter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Messer  
Prof. Dr. rer. nat. Udo Heinemann

Berlin 1999

# INHALT

<b>1. <u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1 Bakterielle Konjugation</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Das promiskuitive IncP<math>\alpha</math>-Plasmid RP4</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Der konjugative DNA-Transfer des Plasmides RP4</b>	<b>4</b>
1.3.1 Die Rolle von TraG-ähnlichen Proteinen in der Konjugation	7
1.3.2 TrbB ist Mitglied der PULe-Superfamilie	9
<b>1.4 Aufgabenstellung</b>	<b>13</b>
<b>2. <u>MATERIALIEN</u></b>	<b>15</b>
<b>2.1 Plasmide</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Bakterienstämme</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Bakteriophagen</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Medien</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Chemikalien, Proteine und Nukleinsäuren</b>	<b>18</b>
<b>2.6 Puffer</b>	<b>19</b>
<b>2.7 Sonstige Materialien</b>	<b>20</b>
<b>3. <u>METHODEN</u></b>	<b>21</b>
<b>3.1 DNA-Techniken</b>	<b>21</b>
3.1.1 Isolierung von DNA	21
3.1.2 Allgemeine <i>in vitro</i> -Rekombinationstechniken	21
3.1.3 Herstellung einer <i>trbB-in frame</i> -Deletionsmutante	22
3.1.4 Erzeugung von <i>trbB</i> -Punktmutationen	23
3.1.5 DNA-Sequenzierung	23
3.1.6 Herstellung von <sup>32</sup> P-markierten ds-DNA-Fragmenten	23
<b>3.2 Konjugation</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Elektrophoresetechniken</b>	<b>24</b>
3.3.1 Elektrophoresetechniken zur Auftrennung von DNA	24
3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	25
<b>3.4 Proteinanalyse</b>	<b>25</b>
3.4.1 Proteinüberproduktion durch induzierte Genexpression	25
3.4.2 Denaturierender analytischer Zellaufschluß	26
3.4.3 Nativer analytischer Zellaufschluß	26
3.4.4 Proteinreinigung	26
3.4.5 Quantitative Proteinbestimmung	27
3.4.6 Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran	27
3.4.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen (SOPHIA)	27
3.4.8 Protein-Sequenzierung	28
<b>3.5 Elektronenmikroskopie</b>	<b>28</b>
<b>3.6 Glyceringradientenzentrifugation</b>	<b>28</b>
<b>3.7 Bestimmung der NTPase-Aktivität</b>	<b>29</b>
<b>3.8 Fragmentretentionstest zur Analyse von DNA-Protein-Komplexen</b>	<b>29</b>
<b>3.9 Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen</b>	<b>30</b>

## **4. ERGEBNISSE** **31**

---

### **Teil1 Die TraG-ähnlichen Proteine interagieren mit Komponenten des Relaxosoms**

<b>4.1 Ein Sequenzvergleich der TraG-ähnlichen Proteine legt die Unter-teilung in zwei Unterfamilien nahe</b>	31
<b>4.2 RP4 TraG und F TraD ließen sich nach Modifizierung reinigen</b>	33
4.2.1 Die N-terminale Modifizierung von RP4 TraG und F TraD beeinträchtigte nicht die Transferfunktion der Proteine	33
4.2.2 Affinitätschromatographie mit Ni-NTA ergab gereinigtes His <sub>6</sub> -TraG und His <sub>6</sub> -TraD	35
<b>4.3 His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD besitzen keine ATPase-Aktivität</b>	38
<b>4.4 His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD binden nicht-sequenzspezifisch an dsDNA und ssDNA</b>	40
<b>4.5 His<sub>6</sub>-TraG bindet an die Relaxase von RP4 und His<sub>6</sub>-TraD an R1 TraM</b>	43

### **Teil 2 RP4 TrbB, R388 TrwD und *cag* HP0525 von *Helicobacter pylori* besitzen**

#### **strukturelle und enzymatische Gemeinsamkeiten**

<b>4.6 TrbB ist eine für die Konjugation von RP4 essentielle, enzymatische Komponente des Mpf-Komplexes</b>	47
4.6.1 Die Gene <i>trbB</i> und <i>trbC</i> sind translational gekoppelt	48
<b>4.7 Die Reinigung von RP4 TrbB, R388 TrwD und <i>cag</i> HP0525 erfolgte unter nativen Bedingungen</b>	49
4.7.1 Die Überexpression von RP4 <i>trbB</i> , R388 <i>trwD</i> und <i>cag</i> HP0525 in <i>E. coli</i> führte zur Überproduktion von löslichem Protein, das <i>in vivo</i> aktiv war	49
4.7.2 Eine dreistufige Reinigung führte zu nahezu homogenen RP4 TrbB, R388 TrwD und <i>cag</i> HP0525	51
<b>4.8 RP4 TrbB, R388 TrwD und <i>cag</i> HP0525 sind NTP-Hydrolasen</b>	53
4.8.1 dATP, GTP und ATP sind Substrate für RP4 TrbB	53
4.8.2 Die NTPase-Aktivität von RP4 TrbB besitzt zwei pH-Maxima	54
4.8.3 Das Substratspektrum der NTPase-Aktivität von RP4 TrbB und R388 TrwD unterscheidet sich vom <i>cag</i> HP0525-Substratpektrum	54
<b>4.9 RP4 TrbB, R388 TrwD und <i>cag</i> HP0525 besitzen eine ähnliche hexamere Ringstruktur</b>	55
4.9.1 Physikalische Eigenschaften von RP4 TrbB und <i>cag</i> HP0525	55
4.9.2 RP4 TrbB und <i>cag</i> HP0525 bilden Hexamere	57
4.9.3 Die oligomeren Strukturen von RP4 TrbB, R388 TrwD und <i>cag</i> HP0525 sind ringförmig	57
4.9.4 Die Hexamere von RP4 TrbB und <i>cag</i> HP0525 bestehen aus unregelmäßig trigonalen Untereinheiten	59
<b>4.10 <i>trbB</i>-Mutationsanalyse von innerhalb der PulE-Superfamilie konservierten Bereichen</b>	60
4.10.1 Die intakte Typ A-NBS in TrbB ist für den konjugativen Transfer von RP4 essentiell	61
4.10.2 Eigenschaften der TrbB-Mutantenproteine	61

## **5. DISKUSSION** **65**

---

<b>5.1 Die TraG-ähnlichen Proteine bilden eine neue Proteinklasse, deren Funktion auf die Konjugation beschränkt zu sein scheint</b>	65
<b>5.2 Die Rolle der Proteine der PulE-Superfamilie innerhalb der Assemblierung des Membrankomplexes</b>	70

## **6. ZUSAMMENFASSUNG** **75**

---

## **7. SUMMARY** **77**

---

## **8. LITERATURVERZEICHNIS** **79**

---

## **9. ANHANG** **87**

---

## ZUSAMMENFASSUNG

An der bakteriellen Konjugation sind zwei Multiproteinkomplexe beteiligt: (i) Das Mpf-System assembliert den Sex-Pilus und etabliert den Zell-Zell-Kontakt zum Rezipienten. (ii) Das Relaxosom katalysiert den DNA-Einzelstrangbruch an der *nic-site* des *oriT*. Die TraG-ähnlichen Proteine sind für die Konjugation essentiell, können bisher jedoch weder dem Mpf-System noch dem Relaxosom zugeordnet werden. TraG-ähnliche Proteine bilden eine neuartige Proteinklasse, deren Funktion auf die Konjugation beschränkt zu sein scheint. Die modifizierten Vertreter RP4 His<sub>6</sub>-TraG und F His<sub>6</sub>-TraD banden nicht-sequenzspezifisch an dsDNA und ssDNA, wobei ssDNA das bevorzugte Substrat war. His<sub>6</sub>-TraD bildete einen Komplex mit R1 TraM, einem möglichen Bestandteil des Relaxosoms. His<sub>6</sub>-TraG interagierte ebenso wie His<sub>6</sub>-TraD mit der Relaxase von RP4. Dies zeigt, daß die TraG-ähnlichen Proteine mit Komponenten des Relaxosoms wechselwirken. Da His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD keine NTPase-Aktivität besaßen, scheinen sie keinen energieverbrauchenden Prozeß zu katalysieren. Deshalb lassen sich für die TraG-ähnlichen Proteine zwei mögliche Funktionen innerhalb der Konjugation ableiten. Entweder initiieren sie das Ablösen des zu transferierenden DNA-Einzelstranges von der Plasmid-DNA oder führen ihn der Transportpore zu. Eine direkte Beteiligung am DNA-Transport ist denkbar, wenn eine Kopplung an ein NTP-spaltendes Enzym vorliegt. Im RP4-System könnte dies TrbB oder TrbE sein. Ein His<sub>6</sub>-TraG-TrbB-Komplex konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Vertreter der Pule-Superfamilie sind eine essentielle Komponente eines membrandurchspannenden Multiproteinkomplexes (wie z.B. des Mpf-Komplexes), der an so unterschiedlichen Vorgängen wie der Ausscheidung von Proteinen (z.B. Toxinen), der Pilus-assemblierung, dem *twitching motility* und der Aufnahme von DNA mittels natürlicher Transformation beteiligt ist. Die gereinigten Pule-ähnlichen Proteine RP4 TrbB und *cag* HP0525 von *Helicobacter pylori* bildeten eine hexamere Ringstruktur aus, die zwei chemisch unterscheidbare Seiten besaß. Lokalisierungsstudien lassen vermuten, daß die eine Seite mit der inneren Membran assoziiert ist und die andere in das Cytoplasma ragt. Die strukturellen Eigenschaften von TrbB wurden auch für Chaperone der Hsp100-Familie beschrieben. Das gereinigte Pule-ähnliche Protein R388 TrwD bildete ebenfalls Ringstrukturen aus, deren nähere Architektur aber noch nicht geklärt wurde. Zusätzlich wurden bei TrwD stäbchen-förmige Strukturen beobachtet. Nukleotide stabilisierten die Ringe von TrbB und TrwD. TrbB, TrwD und HP0525 besaßen NTPase-Aktivität, die in der gleichen Größenordnung wie die der Chaperone lag. Mutationsstudien mit TrbB zeigten, daß diese Aktivität von TrbB für die Konjugation notwendig ist. Die strukturellen und enzymatischen Gemeinsamkeiten von TrbB, TrwD, HP0525 und Chaperonen, lassen vermuten, daß Pule-ähnliche Proteine durch Fixierung von Komponenten des Membrankomplexes in einer bestimmten Konformation die Assemblierung des Komplexes unterstützen. Dies könnte den Transport der Komponenten über die innere Membran und/oder das Binden an einen weiteren (Mpf)-Bestandteil ermöglichen.

## SUMMARY

Two protein complexes are involved in bacterial conjugation: (i) The Mpf system is required for the assembly of the sex-pilus and establishes the physical contact between the donor and recipient cell. (ii) The relaxosome is responsible for the specific cleavage at the origin of transfer. TraG-like proteins are essential for conjugation. However, they are belonging neither to the Mpf-system nor to the relaxosome. TraG-like proteins form a novel protein class probably specific to conjugation. The modified representatives His<sub>6</sub>-TraG and His<sub>6</sub>-TraD were shown to bind DNA non-specifically with ssDNA as the apparently preferred substrate. His<sub>6</sub>-TraD formed a complex with R1 TraM which is thought to be a component of the relaxosome. His<sub>6</sub>-TraG and His<sub>6</sub>-TraD were shown to interact with the relaxase of RP4. All these results indicate that the TraG-like proteins interact with components of the relaxosome. Neither His<sub>6</sub>-TraG nor His<sub>6</sub>-TraD possessed a NTPase activity, suggesting that they are apparently not involved in an energy consuming process. Thus two possible functions for TraG-like proteins can be suggested. Either they might initiate the generation of the single plasmid strand destined to be transferred or they connect it to the pore through which the DNA is transferred. A direct involvement of the TraG-like proteins in the DNA transfer is possible when they are coupled to a NTPase like TrbB or TrbE of the RP4 system. However, a His<sub>6</sub>-TraG-TrbB complex was not formed.

Representatives of the PulE-superfamily are an essential part of a membrane-spanning complex (like the Mpf system) involved in a wide variety of processes such as protein secretion, pilus assembly, twitching motility and DNA uptake via natural transformation. The purified PulE-like proteins RP4 TrbB and *cag* HP0525 of *Helicobacter pylori* formed hexameric ring-shaped complexes. The defined handedness of the TrbB<sub>6</sub> and HP0525<sub>6</sub> images demonstrated that the hexameric rings have two sides with different chemical properties. Due to localisation experiments it may be assumed that these hexameric proteins face the hydrophilic cytoplasm on one and the hydrophobic membrane on the other side. Structural features of TrbB were also reported for chaperones of the Hsp 100 family. Purified R388 TrwD, which is another representative of the PulE-superfamily, also formed ring-shaped structures which appeared to be similar to TrbB<sub>6</sub> and HP0525<sub>6</sub>. Additionally TrwD tended to form tube-like aggregates. Nucleotides were shown to stabilise the ring-structure of TrbB and TrwD. TrbB, TrwD and HP0525 possess a NTPase-activity in an order of magnitude similar to chaperons. Analyses of TrbB mutants showed that the NTPase activity is essential for its function in vivo. According to structural and enzymatic similarities of TrbB, TrwD, HP0525, and chaperons, PulE-like proteins might aid the assembly of the membrane-spanning complex by binding to its components. Thus these components might be translocated across the inner membrane and/or able to bind to further components to form the entire membrane-spanning complex.

## DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand in der Zeit von September 1996 bis September 1999 im Labor von Dr. Erich Lanka am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Themenbereitstellung, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine vielfältigen Anregungen und Hinweise. Sein Wissen und seine Erfahrung haben mir in schwierigen Situationen sehr geholfen.

Für die gute Arbeitsatmosphäre, tatkräftige Unterstützung und manch guten Rat möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen, Marianne Schlicht, Jana Haase, Günter Ziegelin, Tobias Reick und Ralf Eisenbrandt sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik bedanken. Besonderen Dank richte ich an Rudi Lurz und Gerhild Lüder für die Hilfe und Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie und an Eberhard Scherzinger für seine praktischen Hinweise.

Renate Kühn und Florian Sack, die unter meiner Anleitung ihre Diplom- bzw. Studienarbeit angefertigt haben, danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihren Enthusiasmus.

Für die gelungene Kooperation danke ich Monserrat Bárcena, die das *Image Processing* an RP4 TrbB und *cag* HP0525 durchgeführt hat, Ellen Zechner, die die Funktion der modifizierten TraD-Derivate *in vivo* testete, Werner Pansegrau, der gereinigtes *cag* HP0525 zur Verfügung stellte und dessen NTPase-Aktivität analysierte und Fernando de la Cruz, der die *in vivo*-Aktivität der R388 TrwD-Derivate bestimmte.

Gedankt sei Prof. Walter Messer und Prof. Udo Heinemann für ihre Bereitschaft, diese Arbeit an der Freien Universität zu betreuen.

Dank auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, welche unsere Arbeitsgruppe im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 344 finanziell unterstützte und Direktor Prof. Hans Lehrach für die materielle und finanzielle Unterstützung.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Angström (1 Å = 10 <sup>-10</sup> m)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMP-PCP	Adenosin-5'-[β,γ-methylen]triphosphat
Ap	Ampicillin
(d)ATP	(Desoxy)adenosin-5'-triphosphat
ATPγS	Adenosin-5'-[γ-thio]triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>cag</i>	<i>cancer associated gene</i>
Cm	Chloramphenicol
C-Terminus	carboxyterminales Ende des Proteins
(d)CTP	(Desoxy)cytosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(d)NTP	(Desoxy)nucleosin-5'-triphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
Dtr	<i>DNA transfer and replication</i>
DTT	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
EspE-His <sub>6</sub>	mit sechs Histidinen C-terminal modifiziertes EspE
(d)GTP	(Desoxy)guanosin-5'-triphosphat
GST(226-230)-TrwD	N-terminale Modifizierung von TrwD mit den Aminosäuren 226-230 von Glutathion-S-transferase
His <sub>6</sub> -TraD	mit sechs Histidinen N-terminal modifiziertes TraD
<i>his<sub>6</sub>-traD</i>	mit sechs Histidincodons am 5'-Ende modifiziertes <i>traD</i>
His <sub>6</sub> -TraG	mit sechs Histidinen N-terminal modifiziertes TraG
<i>his<sub>6</sub>-traG</i>	mit sechs Histidincodons am 5'-Ende modifiziertes <i>traG</i>
His <sub>6</sub> -TraM	mit sechs Histidinen N-terminal modifiziertes TraM
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
kb	Kilobasen, Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
MBP-VirB11	N-terminale Modifizierung von VirB11 mit dem Maltosebindungsprotein
min	Minute (1 min = 60 s)
Mpf	<i>mating pair formation</i>
MURFI	<i>multiple reading frame insertion</i>
NBS	Nukleotidbindungsstelle
Ni-NTA	Ni <sup>2+</sup> -Nitrolessigsäure
N-Terminus	aminoternales Ende des Proteins
Nx	Nalidixinsäure

<i>oriT</i>	<i>origin of transfer</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
P <sub>i</sub>	Phosphat
PP	Pyrophosphat
<i>ptl</i>	<i>pertussis toxin liberation</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>sec</i>	<i>general secretion pathway</i>
SOPHIA	<i>solid phase immuno assay</i>
SSB	<i>single strand binding protein</i>
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T-DNA	<i>transferred DNA</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Ti	<i>tumour inducing</i>
Tra	Transfer
<i>traD-his<sub>6</sub></i>	mit sechs Histidincodons am 3'-Ende modifiziertes <i>traD</i>
<i>traG-his<sub>6</sub></i>	mit sechs Histidincodons am 3'-Ende modifiziertes <i>traG</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTP	Uracil-5'-triphosphat
<i>vir</i>	<i>virulence</i>
wt	Wildtyp
YT	<i>yeast tryptone</i>

Die Angabe von Maßeinheiten erfolgte nach den SI (Système International) Normen. Für die Bezeichnung von Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet.