

## 4 ERGEBNISSE

### Teil 1 Die TraG-ähnlichen Proteine interagieren mit Komponenten des Relaxosoms

#### 4.1 Ein Sequenzvergleich der TraG-ähnlichen Proteine legt die Unterteilung in zwei Unterfamilien nahe

Die TraG-ähnlichen Proteine scheinen eine neue Proteinklasse darzustellen, da eine BLAST-Suche ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) keine signifikanten Ähnlichkeiten der Primärstruktur von TraG-ähnlichen Proteinen zu anderen Proteinklassen aufzeigte. Ein Vergleich (PILEUP; GCG *program package version 9.1*) der Aminosäuresequenzen der TraG-ähnlichen Proteine legt die Unterteilung in eine TraG-Unterfamilie (benannt nach RP4 TraG) und eine TraD-Unterfamilie (benannt nach F TraD) nahe (Abb. 4.1). Bisher sind jedoch keine funktionellen oder strukturellen Merkmale bekannt, die diese Unterteilung auf eine biochemische Grundlage stellen.

Die Konservierung der Primärstruktur innerhalb der TraG-ähnlichen Proteine ist sehr gering. So sind bei einer durchschnittlichen Größe von 600 Aminosäuren nur drei Aminosäuren zu 100% konserviert. Diese befinden sich in zwei der drei Motive. Motiv I besitzt ein hochkonserviertes Lysin, welches in der TraD-Unterfamilie Bestandteil einer Typ A-NBS [G-X<sub>4</sub>-G-K-(S,T)] (Walker *et al.*, 1982) sein könnte. In der TraG-Unterfamilie ist dieses Motiv jedoch nur bei zwei Vertretern (DotL, MagB12) zu finden. Die hochkonservierte Abfolge Aspartat-Glutamat befindet sich im Motiv III, welches jedoch keine Ähnlichkeiten zu bekannten Motiven aufweist. Zu 95% ist in diesem Motiv ein Glutamin konserviert. Im Motiv II ist keine hochkonservierte Aminosäure zu finden. Innerhalb der TraG-Unterfamilie ist in diesem Motiv jedoch ein Phenylalanin zu 100% konserviert, wohingegen innerhalb der TraD-Unterfamilie ein Tryptophan hochkonserviert ist.

Table with 10 columns: Identifier, Accession, Protein Name, and Sequence. Contains data for Motif I, including entries like MagB12 pVT745 101 L...QOK and TrkB pR6K 225 KLVEI LFP...G.AEAHFN.

Motiv I

Table with 10 columns: Identifier, Accession, Protein Name, and Sequence. Contains data for Motiv I, including entries like MagB12 pVT745 209 NQAMGLY...LT...GDPDK and TrkB pR6K 225 KLVEI LFP...G.AEAHFN.

Table with 10 columns: Identifier, Accession, Protein Name, and Sequence. Contains data for Motiv I, including entries like MagB12 pVT745 300 KL NLYNACESGK...DSTFISP and TrkB pR6K 322 KI.REY.HETED.EOR.S.DGSFRK.

Motiv II

Motiv III

Table with 10 columns: Identifier, Accession, Protein Name, and Sequence. Contains data for Motiv II and Motiv III, including entries like MagB12 pVT745 415 SVGFIAG...GALLIY and TrkB pR6K 434 GSVIAG...KLLTIYN.

Motiv III

**Abb. 4.1 Aminosäuresequenzvergleich der TraG-ähnlichen Proteine legt die Unterteilung in eine TraG- und eine TraF-Unterfamilie nahe.** Die Aminosäuresequenzen wurden in Untergruppen mit dem PILEUP-Programm (*GCG program package version 9.1.*) verglichen und angeordnet. Der endgültige Sequenzvergleich wurde manuell aus den Untergruppenvergleichen zusammengesetzt. Die TraD-Unterfamilie ist mit einem Kasten umgeben. Das Programm BOXSHADE 3.31 ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) wurde jeweils für eine Unterfamilie mit den folgenden Parametern benutzt: roter Hintergrund, 100%ige Konservierung der Aminosäure; gelber Hintergrund,  $\geq 75\%$ ige Konservierung der Aminosäure; blauer Hintergrund,  $\geq 75\%$ ige Konservierung ähnlicher Aminosäuren. Der grüne Hintergrund wurde manuell eingefügt und zeigt  $\geq 75\%$ ige Konservierung ähnlicher Aminosäuren innerhalb der TraG-ähnlichen Proteine an. Der Name des Proteins und das entsprechende Plasmid bzw. Bakterium stehen jeweils links neben der Sequenz. HP entspricht *Helicobacter pylori*, RP *Rickettsia provazekii*, und LP *Legionella pneumophila*. Die Nummer kennzeichnet die Position der ersten gezeigten Aminosäure. *GenBank accession numbers*: MagB 12 (pVT745), persönliche Mitteilung, Dr. D. Galli, Indiana University, USA; TaxB (pR6K), Y10906; HP0524 (HP), AE001481; TraG (R751), S22992; TraG (RP4), S22999; VirD4 (pTiC58), S11841; VirD4 (pRiA4B), S06886; VirD4 (pTiA6NC), E29826; VirD4 (RP), AJ235271; TraG (pTiA6NC), Q44360; TraG (pTiC58), Q44346; TraG (pNGR234), P45421; TrsK (pG01), C56976; TrsK (pMRC01), AE001272; DotL (LP), AAC38193; TraD (F), AJ011707; TraD (pR100), BAA78884; TraJ (pKM101), AF000361; TrwB (pR388), X63150; TraD (pnl1), AAD03934; Orf1025 (pNOB8), AJ010405; Orf1042 (pING1), persönliche Mitteilung, K. Stedman, MPI für Biochemie, Martinsried.

## 4.2 RP4 TraG und F TraD ließen sich nach Modifizierung reinigen

Eine Reinigung ausgehend von nativem TraD unter Anwendung einer Chromatographie mit *Blue-Dextran-Agarose* (Panicker & Minkley, Jr., 1992) bzw. Phosphocellulose und *Blue-Sepharose* (Disqué-Kochem & Dreiseikelmann, 1997) wurde bereits beschrieben. Vorversuche mit TraG (Strack, 1987) und TraD zeigten, daß beide Proteine unter Anwendung einer Chromatographie mit Heparin-Sepharose nicht mit zufriedenstellender Ausbeute und Reinheit gewonnen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Auch die Anwendung weiterer Chromatographieschritte mit anderen Säulenmaterialien, wie Ionenaustauscher und ATP-Agarose, führte nicht zur Abtrennungen von Verunreinigungen (Daten nicht gezeigt). Diese ungewöhnlichen Reinigungseigenschaften beider Proteine geben einen zusätzlichen Hinweis auf die Homologie zwischen TraG und TraD.

### 4.2.1 Die N-terminale Modifizierung von RP4 TraG und F TraD beeinträchtigte nicht die Transferfunktion der Proteine

Für die Reinigung von TraG und TraD wurde eine Affinitätschromatographie eingesetzt, da diese eine spezifische Bindung des zu reinigenden Proteins ermöglicht. Um das Protein nur geringfügig modifizieren zu müssen, wurde als Säulenmaterial  $\text{Ni}^{2+}$ -Nitrolessigsäure (Ni-NTA) (QIAGEN) gewählt. Beide Proteine wurden sowohl N-terminal als auch C-terminal mit sechs Histidinen versehen, da nicht bekannt war, ob eine Modifizierung die Transferfunktion der Proteine beeinflusst. Zur Verlängerung der Strukturgene um sechs Histidincodons wurde PCR (Kap. 3.1.2) mit pSK470 (*traG*) bzw. pSK410 (*traD*) als *template* und den entsprechenden Primern (Kap. 2.5)

eingesetzt (Abb. 4.2). Als Vektor für die Klonierung der modifizierten Strukturgene wurde pMS470 $\Delta$ 8 verwendet, da dieser eine der effektivsten *Shine-Dalgarno*-Sequenzen (die des T7 *Gen 10*) und die chemisch induzierbare  $P_{tac}$ /LacI-Einheit enthält und somit die Überexpression von *traG* und *traD* ermöglicht. DNA-Sequenzierung und SOPHIA (Kap. 3.4.7) mit gegen His<sub>5</sub> gerichteten Antikörpern bestätigten die Sequenz der beiden Strukturgene und dessen korrekte Verlängerung um sechs Histidincodons.



**Abb. 4.2 Modifizierung von *traG* mit sechs Histidincodons.** Für die Verlängerung durch PCR von *traG* um sechs Histidincodons am 5'-Ende (A) bzw. am 3'-Ende (B) diente das Plasmid pSK470 als *template* (unterstrichene DNA-Sequenz). Die dazu verwendeten Primer I und IV enthielten jeweils die sechs Histidincodons (grau markiert) und das Start- bzw. Stoppcodon (schwarz markiert). Die amplifizierten Gene wurden über die *Nde*I- und *Hind*III-Schnittstelle (gestrichelte Markierung) in pMS470 $\Delta$ 8 inseriert. Die Modifizierung des 5'- bzw. 3'-Endes von *traD* erfolgte analog.

Die chemische Induktion (Kap. 3.4.1) der Stämme SCS1(pFS241) (*his<sub>6</sub>-traG*), SCS1(pFS141) (*traG-his<sub>6</sub>*), SCS1(pSK410NH) (*his<sub>6</sub>-traD*) und SCS1(pSK410CH) (*traD-his<sub>6</sub>*) führte jeweils zur Überproduktion eines zusätzlichen Proteins, welches im Coomassie-Blau gefärbten SDS-15%igen Polyacrylamidgel die gleiche Mobilität wie nicht-modifiziertes TraG bzw. TraD besaß. Dies zeigte, daß die Histidylreste die Überproduktion der Proteine nicht beeinträchtigte. Die mit Hilfe des Gels ermittelten molekularen Massen von 70 kDa (His<sub>6</sub>-TraG) und 83 kDa (His<sub>6</sub>-TraD) stimmen gut mit den berechneten Molekulargewichten von His<sub>6</sub>-TraG (70.793,4 Da) bzw. His<sub>6</sub>-TraD (82.242,3 Da) überein. Das überproduzierte Protein machte in beiden Fällen ca. 25% des in SDS-löslichen Zellproteins aus. Löslichkeitsstudien (Kap. 3.4.3) zeigten, daß sich sowohl modifiziertes TraG als auch modifiziertes TraD genau wie das jeweilige wt-Protein in Puffer, der neben Salz (1M NaCl) das nicht-ionische Detergenz Brij-58 (0,1%(w/v)) bzw. Triton-X-100 (1%(v/v)) enthielt, löslich waren (Abb. 4.3).

Die Modifizierung von TraG beeinträchtigte seine Transferfunktion nicht, da die genetische Komplementation (Kap. 3.2) von pDB127 ( $\Delta$ *traG*) mit dem Plasmid pFS241 (*his<sub>6</sub>-traG*), pFS141 (*traG-his<sub>6</sub>*), pSK470 (*traG*) bzw. pBS140 (*traG*) im Donorstamm jeweils zu gleichen Transferfrequenzen führte (Tabelle 4.1). Sechs Histidylreste am N-Terminus von TraD hatten keinen meßbaren Einfluß auf die Transferfrequenz, wohingegen die C-terminale Modifizierung von TraD zu einer tausendfachen Reduktion der Transferfrequenz führte (Tabelle 4.2). Daher

wurden die Stämme SCS1(pFS241) und SCS1(pSK410NH), die für die N-terminal modifizierten Proteine kodieren, für die Reinigung eingesetzt.

**Tabelle 4.1 Transferaktivität der modifizierten TraG-Proteine.**

Plasmide im Donorstamm HB101(pDB127)	Beschreibung	Transferfrequenz <sup>1)</sup>
pFS241	<i>his<sub>6</sub>-traG</i>	5,0x10 <sup>-1</sup>
pFS141	<i>traG-his<sub>6</sub></i>	3,0x10 <sup>-1</sup>
pSK470	<i>wt-traG</i> (überproduziert)	3,0x10 <sup>-1</sup>
pBS140	<i>wt-traG</i>	5,0x10 <sup>-1</sup>
pMS119EH	Vektor	<1,0x10 <sup>-6</sup>

<sup>1)</sup> Die Transferfrequenz ist in Transkonjuganten je Donorzelle angegeben (Kap. 3.2).

**Tabelle 4.2 Transferaktivität der modifizierten TraD-Proteine.** Eine Übernachtskultur der Donorstämme *E. coli* XK1200, welche die entsprechend aufgeführten Plasmide enthielten, wurde 1:25 mit Medium verdünnt und bei 37°C geschüttelt. Nach 1 h wurde die Zellkultur mit 100 µl einer Übernachtskultur des Rezipienten (*E. coli* SG13109) versetzt und für weitere 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Konjugation durch starkes Schütteln unterbrochen und in mehreren Verdünnungsstufen auf Selektivmedien plattiert (persönliche Mitteilung, E. Zechner, Karl-Franzes-Universität, Graz, Österreich).

Plasmide im Donorstamm XK1200(pOX38 <i>traD411</i> ::Km)	Beschreibung	Transferfrequenz*
pSK410NH	<i>his<sub>6</sub>-traD</i>	3,3x10 <sup>0</sup>
pSK410CH	<i>traD-his<sub>6</sub></i>	2,0x10 <sup>-3</sup>
Km, pSK410	<i>wt-traD</i> (überproduziert)	7,6x10 <sup>0</sup>
pKI410	<i>wt-traD</i>	3,7x10 <sup>0</sup>
pMS119EH	Vektor	<1,0x10 <sup>-7</sup>

\* Die Transferfrequenz ist in Transkonjuganten je Donorzelle angegeben.

#### 4.2.2 Affinitätschromatographie mit Ni-NTA ergab gereinigtes His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD

Die Reinigung von His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD, ausgehend von einem Zellextrakt der jeweiligen Überproduktionsstämme SCS1(pFS241) und SCS1(pSK410NH), ist in Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4 zusammengefaßt.

**Tabelle 4.3 Reinigung von His<sub>6</sub>-TraG.** 9,6 l Kultur (SCS1(pFS241)) wurden induziert (Kap. 3.4.1). Anschließend wurden 35 g Zellen (Naßgewicht) geerntet und in 120 ml Spermidinmix aufgenommen (Kap. 3.4.1). Die Lyse der suspendierten Zellen erfolgte durch einen nativen Zellaufschluß (Kap. 3.4.4) (Fraktion I; 660 ml). Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 0°C - 4°C durchgeführt. ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung): Die mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60%(w/v)ige Sättigung) versetzte Fraktion I wurde für 2 h gerührt. Nach Zentrifugation (30.000 rpm/45 min/45 Ti-Rotor (Beckman)) wurde das gefällte Protein in 100 ml TN-Puffer (Kap. 2.6) aufgenommen (Fraktion II; 100 ml). (Ni-NTA-Chromatographie): Fraktion II wurde gegen TN-Puffer dialysiert und anschließend auf eine Ni-NTA-Säule (Vol. = 50 ml; Ø = 1,5 cm), die zuvor in TN-Puffer equilibriert wurde, bei einer Flußrate von 50 ml/h aufgetragen. Die Säule wurde erst mit 200 ml TN-Puffer und anschließend mit TN-Puffer (20 mM Imidazol pH 7,6) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 200 ml TN-Puffer; 250 mM Imidazol (pH 7,6). Fraktionen, die His<sub>6</sub>-TraG enthielten, wurden zusammengefaßt (Fraktion III; 85 ml) und gegen TN-Puffer (20%(w/v) PEG-20.000) zur Aufkonzentrierung dialysiert. Zur Lagerung bei -20°C wurde His<sub>6</sub>-TraG gegen TN-Puffer (50%(w/v) Glycerin) dialysiert und war so nach mehreren Monaten noch aktiv.

Fraktion	Reinigungsschritt	Protein [mg]	Ausbeute [%]	Reinheit [%]*
I	Rohextrakt	2017	100	28,9
II	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	1139	56,6	24,3
III	Ni-NTA	87	4,3	72,8

\* Laserdensitometrische Bestimmung von Coomassie-Blau gefärbten Gelen

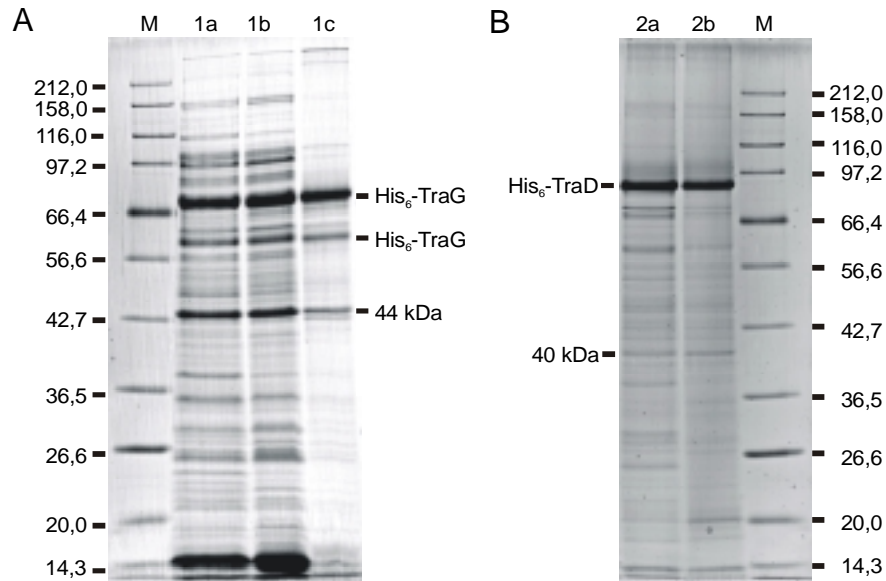
**Tabelle 4.4 Reinigung von His<sub>6</sub>-TraD.** Nach der Induktion (Kap. 3.4.1) von 4,8 l Kultur SCS1(pSK410NH) wurden 18 g Zellen (Naßgewicht) geerntet und in 60 ml Spermidinmix aufgenommen (Kap. 3.4.1) und anschließend durch einen nativen Zellaufschluß lysiert (Kap. 3.4.4). Nach Zentrifugation (45 min/30000 rpm/45 Ti-Rotor (Beckman)) wurde das Pellet in Triton-Mix [50 mM Ches, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1%(v/v) Triton] aufgenommen und zentrifugiert (45 min/30000 rpm/45 Ti-Rotor (Beckman)) (Fraktion I; 28 ml). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei einer Temperatur von 0°C - 4°C. (Ni-NTA-Chromatographie): Fraktion I wurde direkt auf eine Ni-NTA-Säule (Vol. = 30 ml; Ø = 1,5 cm), die zuvor in 50 mM Ches, pH 9,5; 500 mM NaCl equilibriert wurde, bei einer Flußrate von 50 ml/h aufgetragen. Ungebundenes Protein wurde mit 100 ml 50 mM Ches, pH 9,5; 500 mM NaCl und 100 ml 50 mM Ches, pH 9,5; 500 mM NaCl; 35 mM Imidazol, pH 7,6 von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit 150 ml 50 mM Ches, pH 9,5; 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,6. Fraktionen, die His<sub>6</sub>-TraD enthielten, wurden zusammengefaßt (Fraktion II; 38 ml) und das enthaltene Protein mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40%(w/v)ige Sättigung) gefällt. Nach Zentrifugation (45 min/30000 rpm/45 Ti-Rotor (Beckman)) wurde das Sediment in 50 mM Ches, pH 9,5; 500 mM NaCl aufgenommen und gegen den selben Puffer dialysiert. Vor der Lagerung bei -20°C wurde His<sub>6</sub>-TraD gegen 50 mM Ches, pH 9,5; 500 mM NaCl; 50%(w/v) Glycerin dialysiert und war so nach mehreren Monaten noch aktiv.

Fraktion	Reinigungsschritt	Protein [mg]	Ausbeute [%]	Reinheit [%]*
I	Rohextrakt	179	100	62,2
II	Ni-NTA	34	19,2	74,5

\* Laserdensitometrische Bestimmung von Coomassie-Blau gefärbten Gelen

Affinitätschromatographie an Ni-NTA ergab eine 72,8%ig reine His<sub>6</sub>-TraG-Präparation bzw. eine 74,5%ig reine His<sub>6</sub>-TraD-Präparation (Abb. 4.3). Im SDS-15%igen Polyacrylamidgel war für die His<sub>6</sub>-TraG-Präparation neben der 70 kDa-Bande zwei weitere prominente Banden von 56 kDa bzw. 44 kDa (Abb. 4.3) zu erkennen. N-terminale Sequenzierung des 56 kDa-Proteins ergab eine Übereinstimmung der ersten 10 Aminosäuren mit dem N-Terminus von His<sub>6</sub>-TraG, d.h. His<sub>6</sub>-TraG wurde während der Reinigung teilweise abgebaut. Die 44 kDa-Bande schien ein Gemisch aus Proteinen zu sein, da die N-terminale Sequenzierung keine eindeutige Sequenz ergab. Für TraD wurde ebenfalls ein partieller Abbau zu einem 35-40 kDa großen Protein beschrieben,

welcher auch durch die Zugabe von Proteasehemmern nicht unterbunden werden konnte (Panicker & Minkley, Jr., 1992). Die His<sub>6</sub>-TraD-Präparation enthält neben dem His<sub>6</sub>-TraD eine zweite bei 40 kDa laufende prominente Bande im Coomassie-Blau gefärbten SDS-15%igen Polyacrylamidgel. Diese Bande repräsentierte kein Abbauprodukt von His<sub>6</sub>-TraD, wie durch N-terminale Sequenzierung gezeigt werden konnte. Diese Sequenzierung ermöglichte jedoch keine eindeutige Zuordnung zu einem *E. coli*-Protein.



**Abb. 4.3 Reinigung von His<sub>6</sub>-TraG und (A) His<sub>6</sub>-TraD (B).** Gezeigt sind Coomassie-Blau gefärbte SDS-15%igen Polyacrylamidgelen. Spur: 1a: SCS1(pFS241), 20 µl His<sub>6</sub>-TraG-Rohextrakt (Fraktion I); 1b: 5,5 µl der His<sub>6</sub>-TraG-Fraktion II; 1c: 0,4 µl His<sub>6</sub>-TraG der Fraktion III; 2a: SCS1(pSK410NH), 3 µl His<sub>6</sub>-TraD-Rohextrakt (Fraktion I); 2b: 0,5 µl der His<sub>6</sub>-TraD-Fraktion II; M: Standard für molekulare Massen, die in kDa angegeben sind.

Die Anwendung weiterer Chromatographieschritte mit ATP-Agarose, Heparin-Sepharose bzw. DEAE-Sephacel führte nicht zu einer höheren Reinheit der His<sub>6</sub>-TraG-Präparation (Daten nicht gezeigt). Erklärbar ist dies unter der Annahme, daß die Verunreinigungen über hydrophobe Wechselwirkungen an His<sub>6</sub>-TraG „klebten“. Die Anwendung einer hydrophoben Chromatographie mit Phenyl-Sepharose als weiterer Reinigungsschritt erniedrigte die Ausbeute, da His<sub>6</sub>-TraG sich nur schwer mit 1%(v/v) Triton-X-100 eluieren ließ, und erhöhte die Reinheit nur unwesentlich (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, daß His<sub>6</sub>-TraG eine hydrophobe Oberfläche besitzt, obwohl der Anteil an hydrophoben Aminosäuren (A,G,I,L,M,V) nur 41,6% beträgt.

### 4.3 His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD besitzen keine ATPase-Aktivität

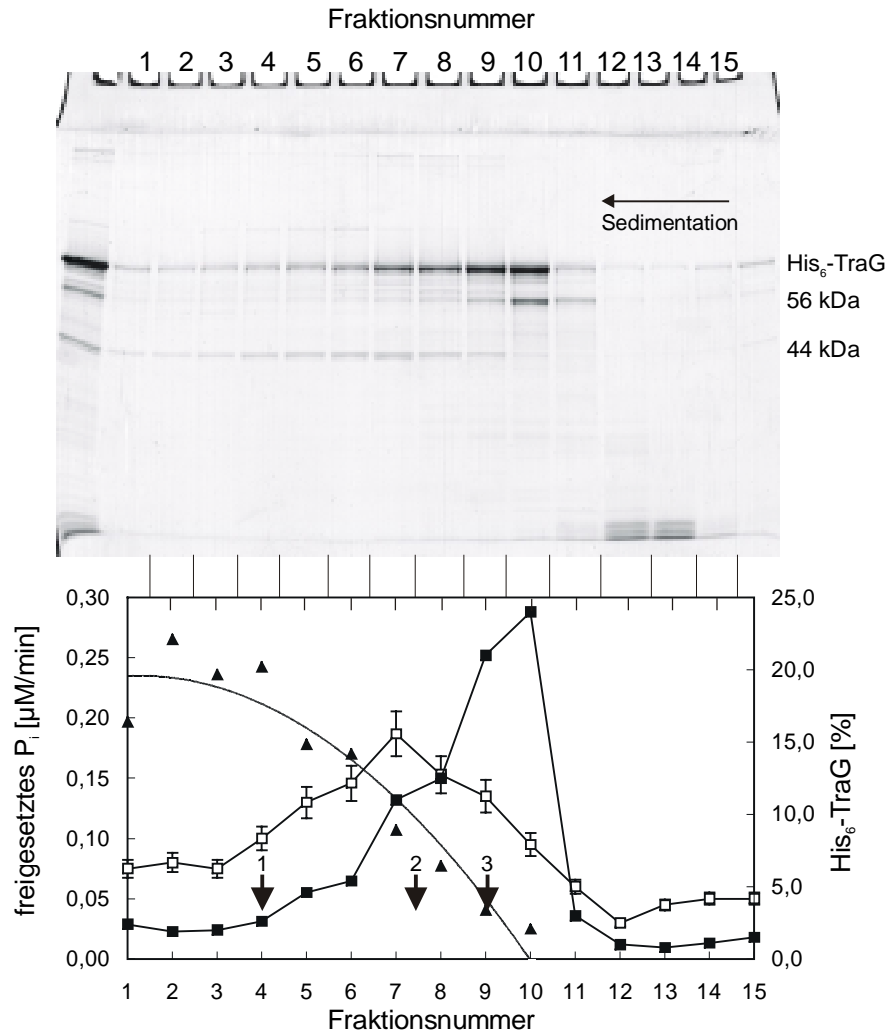
Panicker und Minkley beobachteten in Vorversuchen eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität ihrer TraD-Präparation (Panicker & Minkley, Jr., 1992). Da TraD eine Typ A-NBS besitzt, TraG jedoch nicht, wurde untersucht, ob His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD in der Lage waren, Nukleotide zu hydrolysieren (Kap. 3.7). Die His<sub>6</sub>-TraG-Präparation hydrolysierte [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] GTP

zu dem entsprechenden Nucleosiddiphosphat und  $P_i$ , jedoch wurde keine meßbare Hydrolyse von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dATP}$  und  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dCTP}$  festgestellt (Daten nicht gezeigt). ATP war das bevorzugte Substrat und seine Hydrolyse lies sich durch Zugabe von ssDNA um den Faktor zwei stimulieren. Die ATPase-Aktivität der His<sub>6</sub>-TraG-Präparation unter stimulierenden Bedingungen betrug  $0,39 \pm 0,05 \mu\text{M}/\text{min}$  ( $1 \mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-TraG;  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ssDNA). Dagegen wurde für die His<sub>6</sub>-TraD-Präparation eine um den Faktor 10 größere ATPase-Aktivität ( $3,5 \pm 0,5 \mu\text{M}/\text{min}$ ;  $1 \mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-TraD;  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ssDNA) gemessen.

Glyceringradientenzentrifugation (Kap. 3.6) sollte aufzeigen, ob die gemessene ATPase-Aktivität der His<sub>6</sub>-TraG- bzw. His<sub>6</sub>-TraD-Präparation His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD zugeordnet werden kann. Die gemessene ATPase-Aktivität der His<sub>6</sub>-TraG-Präparation korrelierte nicht mit der His<sub>6</sub>-TraG-Proteinbande (70 kDa) (Abb. 4.4), d.h., die ATPase-Aktivität wurde von His<sub>6</sub>-TraG abgetrennt und konnte somit einer Verunreinigung zugeordnet werden. Die Mutation des konservierte Lysin (K187T) im Motiv I (Abb. 4.1) in TraG führte zu einem transferdefekten Phänotyp, was zeigte, daß das Lysin (K187) für die *in vivo*-Funktion von TraG während der Konjugation essentiell ist (Balzer *et al.*, 1994). Das Mutantenprotein wurde in der gleichen Weise wie His<sub>6</sub>-TraG modifiziert und gereinigt (Daten nicht gezeigt). Die His<sub>6</sub>-TraG K187T-Präparation hydrolysierte ATP im größerem Ausmaß (um den Faktor 10 erhöht) als die His<sub>6</sub>-TraG-Präparation. Für andere ATP-spaltende Enzyme konnte gezeigt werden, daß eine Mutation des Lysins in der Typ A-NBS zur Inaktivierung der ATPase-Aktivität führte (Pansegrau *et al.*, 1999; Saraste *et al.*, 1990). Die Mutation K187T in His<sub>6</sub>-TraG inaktivierte nicht die ATPase-Aktivität der His<sub>6</sub>-TraG K187T-Präparation, was ein weiterer Hinweis darauf sein könnte, daß His<sub>6</sub>-TraG keine NTPase-Aktivität besitzt.

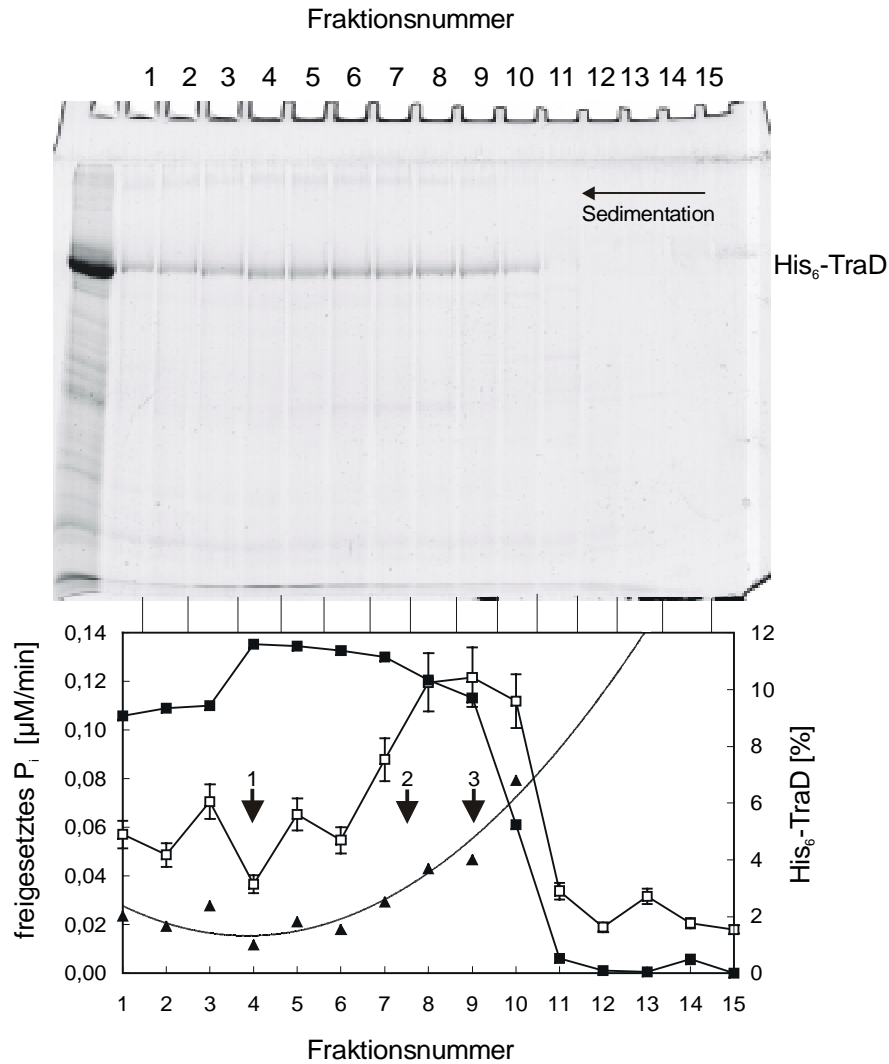
In einer Glyceringradientenzentrifugation (Kap. 3.6) mit His<sub>6</sub>-TraD korrelierte die gemessene ATPase-Aktivität nicht mit der Konzentration an His<sub>6</sub>-TraD (82 kDa) in den einzelnen Fraktionen. Die ATPase-Aktivität konnte nicht vollständig von His<sub>6</sub>-TraD abgetrennt werden, da His<sub>6</sub>-TraD im Gradienten nicht bandete, sondern über mehrere Fraktionen des Gradienten verteilt war (Abb. 4.5). Das Verhältnis aus ATPase-Aktivität zur Menge an His<sub>6</sub>-TraD (70 kDa-Bande) war jedoch nicht für jede His<sub>6</sub>-TraD-enthaltende Fraktion konstant. Darüber hinaus ist das Verhältnis in der Fraktion am kleinsten, welche die größte Menge an His<sub>6</sub>-TraD enthielt. Dies zeigte, daß die ATPase-Aktivität der His<sub>6</sub>-TraD-Präparation einer Verunreinigung zugeordnet werden kann.





**Abb. 4.4 Glyceringradientenzentrifugation His<sub>6</sub>-TraG.** 630 μg gereinigtes His<sub>6</sub>-TraG wurden auf einen linearen Glyceringradienten (15% (w/v) - 35% (w/v) Glycerin, 3,7 ml) geschichtet und zentrifugiert (Kap. 3.6). Aliquote der erhaltenen Fraktionen wurden auf SDS-15%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch untersucht. Die Menge an Protein wurde mit ImageQuANT (Molecular Dynamics) ermittelt. Aliquote der erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre ATPase-Aktivität getestet (Kap. 3.7). Das Coomassie-Blau gefärbte Gel ist oben gezeigt. Die ATPase-Aktivität (□) und die Menge an His<sub>6</sub>-TraG (■) der entsprechenden Fraktionen ist in dem darunterliegenden Diagramm dargestellt (▲; Verhältnis aus ATPase-Aktivität zu His<sub>6</sub>-TraG-Menge). Aldolase (1; M<sub>r</sub> = 185 kDa; S<sub>20,w</sub> = 7,8 x 10<sup>-13</sup> s), BSA (2; M<sub>r</sub> = 68 kDa; S<sub>20,w</sub> = 4,4 x 10<sup>-13</sup> s) und Ovalbumin (3; M<sub>r</sub> = 43,5 kDa; S<sub>20,w</sub> = 3,6 x 10<sup>-13</sup> s) wurden parallel als Standard mitgeführt und sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Beide Glyceringradienten zeigten deutlich, daß sowohl His<sub>6</sub>-TraG und in noch stärkerem Maße His<sub>6</sub>-TraD, die Tendenz besitzen unregelmäßige Aggregate zu bilden. Betrachtete man beide Proteine unter dem Elektronenmikroskop, so wurden verschieden große Proteinaggregate unterschiedlicher Form beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß sowohl His<sub>6</sub>-TraG als auch His<sub>6</sub>-TraD die Tendenz zur Aggregation besitzen, was vielleicht auf ihre hydrophobe Oberfläche zurückgeführt werden kann.

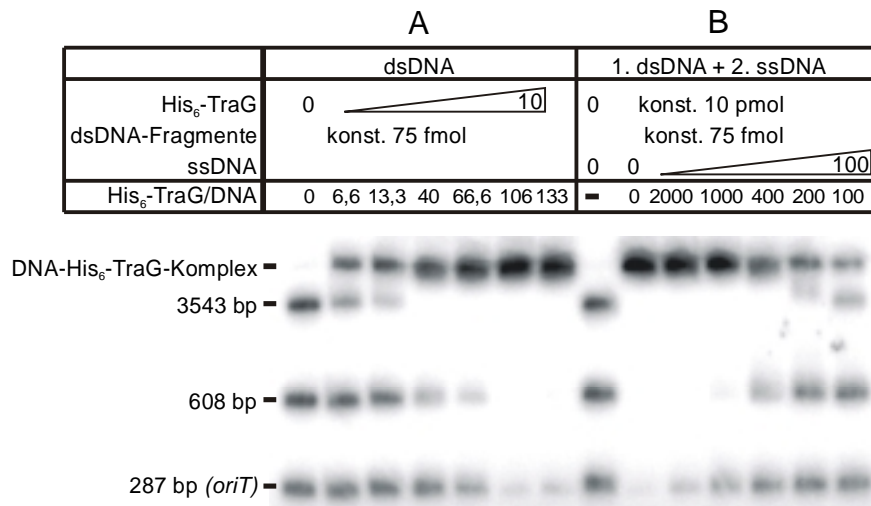


**Abb. 4.5 Glycinergradientenzentrifugation His<sub>6</sub>-TraD.** 372  $\mu\text{g}$  gereinigtes His<sub>6</sub>-TraD wurden auf einem linearen Glycinergradienten (15% (w/v) - 35% (w/v) Glycerin, 3,7 ml) geschichtet und zentrifugiert (Kap. 3.6). Aliquote der erhaltenen Fraktionen wurden auf SDS-15%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch untersucht. Die Menge an Protein wurde mit ImageQuANT (Molecular Dynamics) ermittelt. Aliquote der erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre ATPase-Aktivität getestet (Kap. 3.7). Das Coomassie-Blau gefärbte Gel ist oben gezeigt. Die ATPase-Aktivität ( $\square$ ) und die Menge an His<sub>6</sub>-TraG ( $\blacksquare$ ) der entsprechenden Fraktionen ist in dem darunterliegenden Diagramm dargestellt ( $\blacktriangle$ ; Verhältnis aus ATPase-Aktivität zu His<sub>6</sub>-TraG-Menge). Aldolase (1;  $M_r = 185 \text{ kDa}$ ;  $S_{20,w} = 7,8 \times 10^{13} \text{ s}$ ), BSA (2;  $M_r = 68 \text{ kDa}$ ;  $S_{20,w} = 4,4 \times 10^{13} \text{ s}$ ) und Ovalbumin (3;  $M_r = 43,5 \text{ kDa}$ ;  $S_{20,w} = 3,6 \times 10^{13} \text{ s}$ ) wurden parallel als Standard mitgeführt und sind durch Pfeile gekennzeichnet.

#### 4.4 His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD binden nicht-sequenzspezifisch an dsDNA und ssDNA

Für TraD wurde eine unspezifische Bindung an dsDNA bzw. ssDNA vermutet, da es an dsDNA-Cellulose bzw. ssDNA-Cellulose band (Panicker & Minkley, Jr., 1992). Darüber hinaus wurde angenommen, daß die TraG-ähnlichen Proteine mit Komponenten des Relaxosoms interagieren

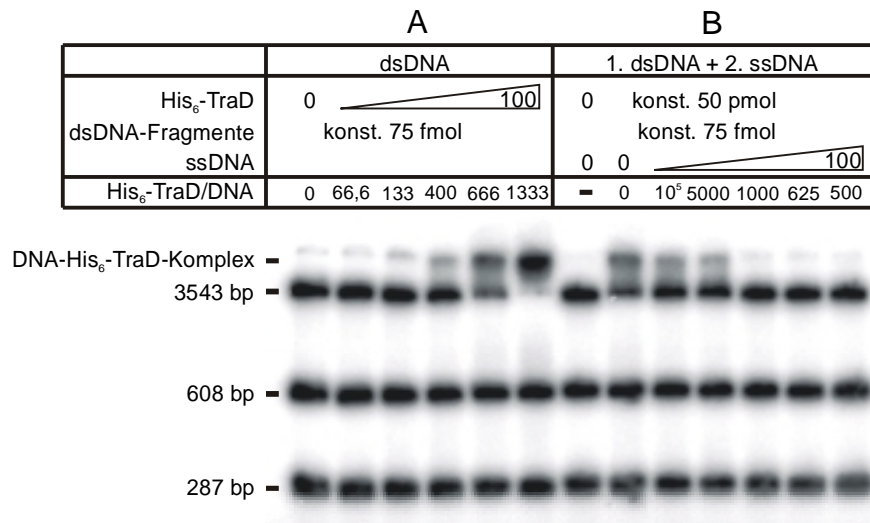
(Cabezón *et al.*, 1997). Daher wurde ein Fragmentretentionstest (Kap. 3.8) herangezogen, um die Bindung von His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD an dsDNA und ssDNA zu untersuchen. Außerdem wurde die spezifische Bindung von His<sub>6</sub>-TraG an den *oriT* von RP4 - einer Komponente des Relaxosoms - analysiert. Als dsDNA wurden drei radioaktiv markierte Fragmente unterschiedlicher Größe verwendet (Kap. 3.1.6). Sie waren aus der Restriktion des RP4 *oriT*-enthaltenden Plasmides pJF143 entstanden, wobei das kleinste Fragment den *oriT* enthielt.



**Abb. 4.6 Die Bindung von His<sub>6</sub>-TraG an dsDNA und ssDNA.** (A) Steigende Mengen His<sub>6</sub>-TraG (0,1 - 10 pmol) wurden mit 75 fmol radioaktiv markierten dsDNA-Fragmenten (Kap. 3.1.6) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend in einem nativen 3,5%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 3.8). (B) 10 pmol His<sub>6</sub>-TraG wurden mit 75 fmol radioaktiv markierten dsDNA-Fragmenten (Kap. 3.1.6) 20 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit steigenden Mengen (5 - 100 fmol) an ssDNA (pJF182; Kap. 2.3) versetzt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden in einem 3,5%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch analysiert.

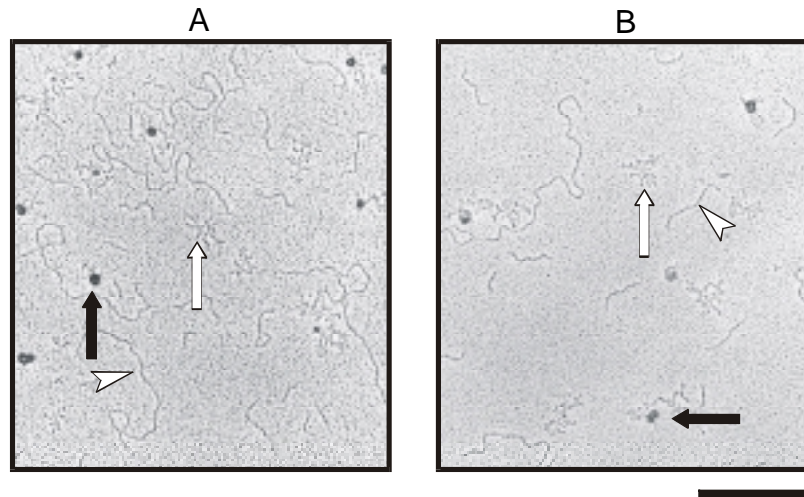
Im Fragmentretentionstest wurde die Bildung eines DNA-Protein-Komplexes von His<sub>6</sub>-TraG und dsDNA beobachtet (Abb. 4.6). Das größte DNA-Fragment wurde von His<sub>6</sub>-TraG gegenüber dem kleinsten DNA-Fragment als Bindungspartner bevorzugt. Dies zeigte, daß His<sub>6</sub>-TraG unspezifisch an dsDNA jedoch nicht spezifisch an den *oriT* von RP4 band. ssDNA (pJF182) war bei equimolarer Konzentration im Vergleich zu dsDNA-Fragmenten in der Lage, His<sub>6</sub>-TraG vom dsDNA-Protein-Komplex abziehen (Abb. 4.6), was auf eine bevorzugte Bindung von His<sub>6</sub>-TraG an ssDNA hindeutet. Die His<sub>6</sub>-TraG enthaltende Fraktion 10 der Glyceringradientenzentrifugation (Kap. 4.3) band in gleicher Weise wie die His<sub>6</sub>-TraG-Päparation an dsDNA und ssDNA (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, daß His<sub>6</sub>-TraG der His<sub>6</sub>-TraG-Präparat und nicht eine Verunreinigung die DNA-Bindungsaktivität besaß. Die Mutation K187T in His<sub>6</sub>-TraG führte nicht zu einer verminderten DNA-Bindungsaktivität des Mutantenproteins His<sub>6</sub>-TraG K187T im Vergleich zu His<sub>6</sub>-TraG (Daten nicht gezeigt). ssDNA war auch hier in der Lage His<sub>6</sub>-TraG K187T von dem dsDNA-Protein-Komplex abziehen (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, daß das konservierte Lysin im Motiv I (Abb. 4.1) für die DNA-Bindung nicht essentiell ist.

His<sub>6</sub>-TraD band im Fragmentretentionstest an dsDNA, jedoch war die 100-fache Menge an Protein nötig, um eine Bindung im selben Ausmaß wie bei His<sub>6</sub>-TraG beobachten zu können (Abb. 4.7). Die Zugabe von ssDNA (pJF182) im equimolaren Verhältnis zur dsDNA bewirkte wie bei His<sub>6</sub>-TraG ein Abzug von His<sub>6</sub>-TraD vom dsDNA-Protein-Komplex (Abb. 4.7). Demzufolge bindet His<sub>6</sub>-TraD genau wie His<sub>6</sub>-TraG bevorzugt an ssDNA.



**Abb. 4.7 Die Bindung von His<sub>6</sub>-TraD an dsDNA und an ssDNA.** (A) Steigende Mengen His<sub>6</sub>-TraD (5 - 100 pmol) wurden mit 75 fmol radioaktiv markierten dsDNA-Fragmenten (Kap. 3.1.6) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend in einem nativen 3,5%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 3.8). (B) 50 pmol His<sub>6</sub>-TraD wurden mit 75 fmol radioaktiv markierten dsDNA-Fragmenten (Kap. 3.1.6) 20 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit steigenden Mengen (5 - 100 fmol) an ssDNA (pJF182; Kap. 2.3) versetzt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden in einem 3,5%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch analysiert.

Elektronenmikroskopie zeigte, daß sowohl His<sub>6</sub>-TraG als auch His<sub>6</sub>-TraD bevorzugt an ssDNA banden, wenn dsDNA und ssDNA im equimolaren Verhältnis mit dem jeweiligen Protein inkubiert wurden. Jedoch variieren in beiden Fällen die DNA-Protein-Komplexe in ihrer Größe und Gestalt. Bisher ist noch nicht verstanden, welche Bedeutung die Bindung von His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD an DNA hat.



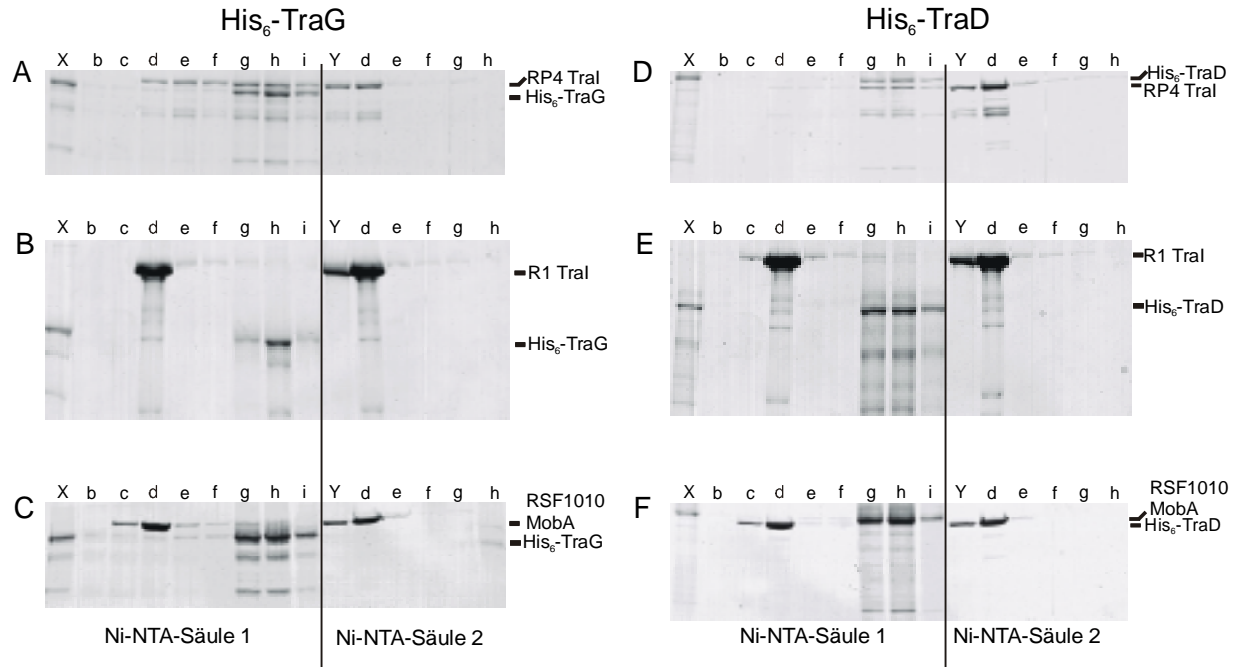
**Abb. 4.8 Elektronenmikroskopie an His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD.** 0,48 pmol His<sub>6</sub>-TraG (A) bzw. His<sub>6</sub>-TraD (B) wurden mit 25 pmol dsDNA (pJF143, das mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut wurde) und 25 pmol ssDNA (pJF182; Kap. 2.3) in Puffer [20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 100 mM NaCl; 1 mM DTT] für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Fixierung für 10 min mit 0,2%(w/v) Glutaraldehyd wurden die Komplexe nach der Glimmeradsorbionsmethode (Spiess & Lurz, 1988) für die Elektronenmikroskopie präpariert. Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen (Elektronenmikroskop Philips CM 100), die bei 15500-facher Primärvergrößerung und 100 kV gemacht wurden. weiße Pfeile, ssDNA; weiße Pfeilspitzen, dsDNA; schwarze Pfeile, ssDNA-Protein-Komplex. Die Balkenlänge entspricht 500 nm.

#### 4.5 His<sub>6</sub>-TraG bindet an die Relaxase von RP4 und His<sub>6</sub>-TraD an R1 TraM

Für alle denkbaren Funktionen, die TraG-ähnliche Proteine während der Konjugation ausüben könnten (Kap. 1.3.1), kann eine Interaktion mit Komponenten des Relaxosoms vorausgesetzt werden. Für F TraD konnte gezeigt werden, daß es einen Komplex mit F TraM bildete, das ein *oriT*-bindendes Protein und möglicherweise Bestandteil des Relaxosoms ist (Disqué-Kochem & Dreiseikelmann, 1997). Vorversuche zeigten, daß RP4 TraG an die Relaxase (TraI) von RP4 band (Pansegrau & Lanka, 1996b). Die Relaxase aller konjugativer und mobilisierbarer Plasmide katalysiert den Einzelstrangbruch an der *nic-site* des *oriT*. Sie ist neben dem *oriT* die Komponente des Relaxosoms, die allen Plasmiden gemeinsam ist. Da für His<sub>6</sub>-TraG gezeigt wurde, daß es nicht spezifisch an den *oriT* band (Kap. 4.4), wurde die Bindung von Relaxasen verschiedener Plasmide an His<sub>6</sub>-TraG und His<sub>6</sub>-TraD systematisch untersucht. Dazu wurde die Relaxase RP4 (IncP) TraI (Pansegrau *et al.*, 1990), R1 (IncFII) TraI (Lahue & Matson, 1988) und RSF1010 (IncQ) MobA (von E. Scherzinger freundlicherweise zur Verfügung gestellt) (Scherzinger *et al.*, 1993) gereinigt.

Für die Bindungstests wurde eine Ni-NTA-Säule mit His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD gesättigt und anschließend mit der zu testenden Relaxase beladen. Die gleichzeitige Elution der entsprechenden Relaxase mit dem TraG-ähnlichen Protein, kennzeichnete die Fähigkeit der jeweiligen Relaxase an das TraG-ähnliche Protein zu binden. Parallel wurde eine zweite Ni-NTA-Säule geführt, um ausschließen zu können, daß die gleichzeitige Elution von TraG-

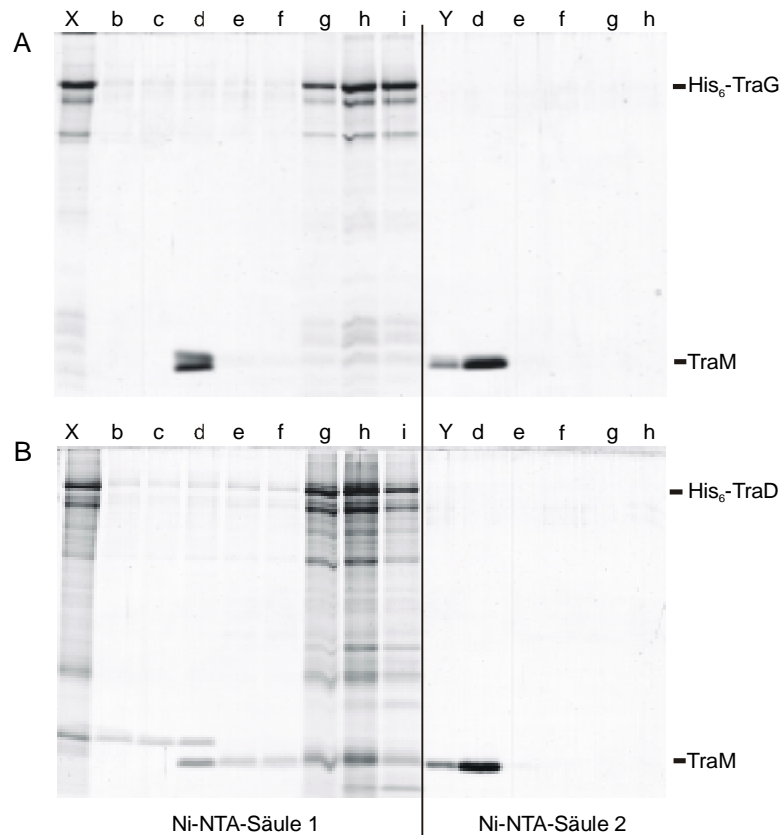
ähnlichem Protein und Relaxase nicht auf eine Interaktion der Relaxase mit der Säulenmatrix zurückgeführt werden muß.



**Abb. 4.9 Interaktion von His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD mit RP4 TraI, R1 TraI und RSF1010 MobA.** Die SDS-15%igen Polyacrylamidgele der Bindungsstudien (Kap. 3.9) von His<sub>6</sub>-TraG an RP4 TraI (A), an R1 TraI (B) bzw. an RSF1010 MobA (C) und der Bindungsstudien von His<sub>6</sub>-TraD an RP4 TraI (D), an R1 TraI (E) bzw. an RSF1010 MobA (F) sind gezeigt. Es wurden für jeden Bindungstest zwei Säulen parallel geführt: An der Ni-NTA-Säule 1 wurde der eigentliche Bindungstest durchgeführt. Die Ni-NTA-Säule 2 diente als Kontrolle für die Bindung der Relaxase an die Ni-NTA-Matrix. Die Spuren enthalten jeweils 20 µl der entsprechenden Fraktion: b, 7. Waschfraktion nach dem Auftrag von His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD; c, Auftragsfraktion der entsprechenden Relaxase; d, 1. Waschfraktion nach dem Auftrag der Relaxase; e, 7. Waschfraktion nach dem Auftrag der Relaxase; f, 1. Elutionsfraktion; g, 2. Elutionsfraktion; h, 3. Elutionsfraktion; i, 4. Elutionsfraktion. Spur X entspricht 1 µl des Auftrags an His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD; Y 1 µl des Auftrags der entsprechenden Relaxase.

RP4 TraI eluierte gemeinsam mit His<sub>6</sub>-TraG von einer Ni-NTA-Säule, die vor dem Beladen mit TraI mit His<sub>6</sub>-TraG gesättigt wurde (Abb. 4.9). Der gleiche Versuchsaufbau zeigte, daß RP4 TraI an His<sub>6</sub>-TraD band. Im Gegensatz dazu bildeten weder R1 TraI noch RSF1010 MobA einen Protein-Protein-Komplex mit His<sub>6</sub>-TraG oder His<sub>6</sub>-TraD aus (Abb. 4.9). Da Relaxasen ein histidinreiches Motiv besitzen, wurde der Waschschritt, welcher dem Laden der Säule mit der Relaxase folgte, bei sehr hoher Salzkonzentration (200 mM) durchgeführt. Somit konnte eine Bindung der Relaxase an die Säulenmatrix unterbunden werden. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß R1 TraI bei niedrigeren Salzkonzentrationen an His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD bindet, wurde der Test bei einer niedrigeren Salzkonzentration (50 mM) wiederholt, jedoch konnte auch hier keine Bindung von R1 TraI an His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, daß die Bindung von His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD an RP4 TraI spezifisch war.



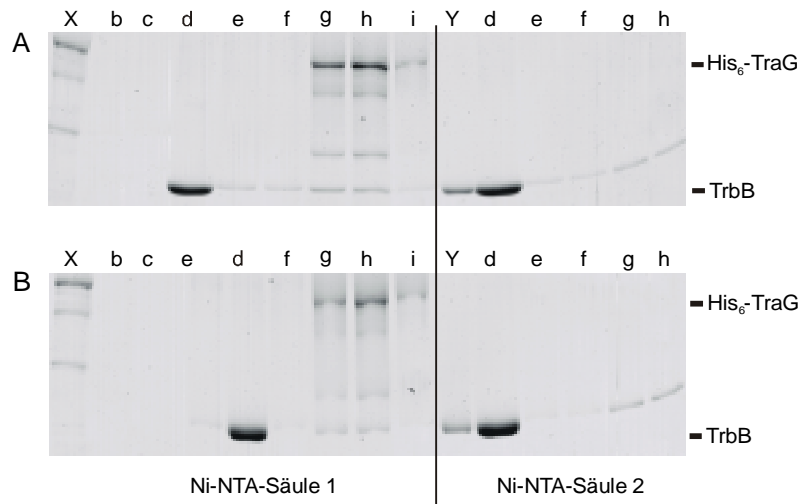


**Abb. 4.10 Interaktion von His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD mit R1 TraM.** Die SDS-17,5%igen Polyacrylamidgele der Bindungsstudien (Kap. 3.9) von His<sub>6</sub>-TraG an R1 TraM (A) bzw. von His<sub>6</sub>-TraD an R1 TraM (B) sind gezeigt. Es wurden für jeden Bindungstest zwei Säulen parallel geführt: An der Ni-NTA-Säule 1 wurde der eigentliche Bindungstest durchgeführt. Die Ni-NTA-Säule 2 diente als Kontrolle für die Bindung von R1 TraM an die Ni-NTA-Matrix. Die Spuren enthalten jeweils 20 µl der entsprechenden Fraktion: b, 7. Waschfraktion nach dem Auftrag von His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD; c, Auftragsfraktion von R1 TraM; d, 1. Waschfraktion nach dem Auftrag von R1 TraM; e, 7. Waschfraktion nach dem Auftrag von R1 TraM; f, 1. Elutionsfraktion; g, 2. Elutionsfraktion; h, 3. Elutionsfraktion; i, 4. Elutionsfraktion. Spur X entspricht 1 µl des Auftrags an His<sub>6</sub>-TraG bzw. His<sub>6</sub>-TraD; Y 1 µl des Auftrags von R1 TraM.

Da es unwahrscheinlich ist, daß nur das RP4-Relaxosom mittels TraI in der Lage ist, mit TraG-ähnlichen Proteinen zu interagieren, wurde R1 TraM als möglicher R1-Partner für die Interaktion mit den TraG-ähnlichen Proteinen untersucht. Dazu wurde R1 TraM überproduziert und wie in (Disqué-Kochem & Dreiseikelmann, 1997; Laurenzio *et al.*, 1991) beschrieben gereinigt. Der Bindungstest zeigte, daß bei geringer Salzkonzentration (50 mM) R1 TraM an His<sub>6</sub>-TraD band, jedoch nicht an His<sub>6</sub>-TraG (Abb. 4.10), d.h., daß die Bindung von R1 TraM an His<sub>6</sub>-TraD spezifisch war. Da diese Bindung bei hohen Salzkonzentrationen nicht beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), scheint sie, über ionische Wechselwirkungen ausgebildet zu werden. Gleiches trifft auch auf die Bindung zwischen His<sub>6</sub>-TraG und RP4 TraI zu, da hier eine Abhängigkeit zwischen gebundener Menge an TraI und eingesetzter Salzkonzentration beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Es wurde postuliert, daß die TraG-ähnlichen Proteine mit Komponenten des Mpf-Systems interagieren (Cabezón *et al.*, 1997). Da TraG-ähnliche Proteine Innermembranproteine sind, deren größter Anteil jedoch in das Cytoplasma ragt (Grahn *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1991),

(persönliche Mitteilung, Dr. B. Traxler, University of Washington, Seattle, USA), wurde untersucht, ob RP4 TrbB, als einzige cytoplasmatische Komponente des Mpf-Systems, an His<sub>6</sub>-TraG bindet. Der Bindungstest wurde mit und ohne Anwesenheit von ATP und Mg<sup>2+</sup> durchgeführt, da diese die hexamere Ringstruktur von TrbB stabilisierten (Kap. 4.9.1). TrbB band unter beiden Bedingungen nicht an His<sub>6</sub>-TraG (Abb. 4.11). Auch nach Herabsetzen der Salzkonzentration (50 mM) konnte keine Bindung beobachtet werden.



**Abb. 4.11 Interaktion von His<sub>6</sub>-TraG mit RP4 TrbB.** Die SDS-15%igen Polyacrylamidgele der Bindungsstudien (Kap. 3.9) von His<sub>6</sub>-TraG an RP4 TrbB (A) bzw. an RP4 TrbB in Anwesenheit von ATP und Mg<sup>2+</sup> (B) sind gezeigt. Es wurden für jeden Bindungstest zwei Säulen parallel geführt: An der Ni-NTA-Säule 1 wurde der eigentliche Bindungstest durchgeführt. Die Ni-NTA-Säule 2 diente als Kontrolle für die Bindung von RP4 TrbB an die Ni-NTA-Matrix. Die Spuren enthalten jeweils 20 µl der entsprechenden Fraktion: b, 7. Waschfraktion nach dem Auftrag von His<sub>6</sub>-TraG; c, Auftragsfraktion von RP4 TrbB; d, 1. Waschfraktion nach dem Auftrag von RP4 TrbB; e, 7. Waschfraktion nach dem Auftrag von RP4 TrbB; f, 1. Elutionsfraktion; g, 2. Elutionsfraktion; h, 3. Elutionsfraktion; i, 4. Elutionsfraktion. Spur X entspricht 1 µl des Auftrags an His<sub>6</sub>-TraG; Y 1 µl des Auftrags von RP4 TrbB.



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

### 4.6 TrbB ist eine für die Konjugation von RP4 essentielle, enzymatische Komponente des Mpf-Komplexes

TrbB, TrwD und HP0525 ähneln sich in Eigenschaften, die aus ihrer Aminosäuresequenz ableitbar sind (Tabelle 4.5). Sie sind schwach saure Proteine, besitzen eine negative Nettoladung und haben eine ähnliche Größe. TrbB ist ein Genprodukt der Tra2-Region. *TrbB* ist das zweite Gen eines langen polycistronischen Operons, das alle für die Konjugation essentiellen Komponenten des Mpf-Komplexes mit Ausnahme von TraF kodiert. In einer RP4-haltigen *E. coli* Zelle kommt TrbB in einer Kopienzahl von 2000 vor und wird damit in ähnlicher Menge wie andere Komponenten des Mpf-Komplexes produziert (Grahn *et al.*, 1999). TrbB ist die einzige essentielle Komponente des Mpf-Komplexes, die im Cytoplasma und in geringen Mengen in der inneren Membran lokalisiert wurde (Grahn *et al.*, 1999), was auf eine schwache Assoziation mit der inneren Membran hindeutet.

**Tabelle 4.5 Eigenschaften von TrbB, TrwD und HP0525, die sich aus der Aminosäuresequenz ableiten lassen.**

Protein	Anzahl der Aminosäuren	Molekulare Masse [Da]	isoelektrischer Punkt	Nettoladung
TrbB	319	34.9905,05	6,69	-4
TrwD	337	38.002,43	5,94	-7
HP0525	330	37.579,49	6,88	-3

Die Werte wurden mit Hilfe von PEPTIDESORT des GCG *program package 9.1* berechnet.

Als Bestandteil des Mpf-Komplexes ist TrbB für die Assemblierung des Sex-Piluses aus dem ringförmigen Pilin, den konjugativen DNA-Transfer, die Mobilisierung des nichtkonjugativen Plasmides RSF1010 und die Adsorption donorspezifischer Phagen (PF3, PRR1, PRD1) essentiell (Grahn *et al.*, 1997; Haase *et al.*, 1997).

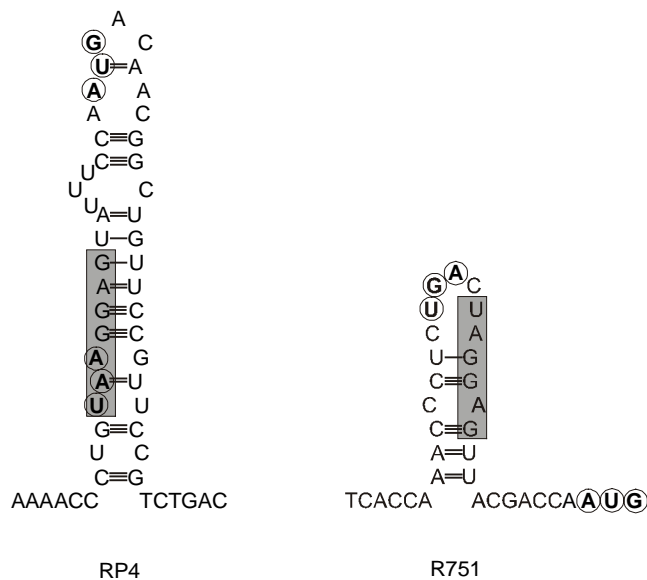
Zu Beginn der Arbeit war ein Überexpressionsplasmid für *trbB* (pMS54) vorhanden, mit dem es gelungen ist, TrbB überzuproduzieren und unter nativen Bedingungen in ausreichender Menge aus der Zelle zu lösen, um es für die Reinigung zugänglich zu machen. Die Anwendung von drei säulenchromatographischen Schritten mit Heparin-Sepharose, Hydroxylapatit und DEAE-Sephacel ergab eine annähernd homogene TrbB-Präparation. Elektronenmikroskopie und chemische Vernetzung zeigten, daß TrbB in Anwesenheit von ATP und  $Mg^{2+}$  ringförmige, hexamere Strukturen ausbildete (Balzer, 1993).

Diese Arbeit beschreibt die strukturelle und enzymatische Charakterisierung von TrbB. Als zwei weitere Vertreter der Pule-Superfamilie wurden das essentielle Transferprotein des konjugativen Plasmides R388, TrwD, und HP0525 der *cag*-Region von *Helicobacter pylori* überproduziert, gereinigt und strukturell sowie enzymatisch charakterisiert.

#### 4.6.1 Die Gene *trbB* und *trbC* sind translational gekoppelt

Die Insertion eines MURFI-Linkers innerhalb des zweiten Gens der Tra2-Region *trbB* führte zu einem DNA-Transfer defekten Phänotyp. Erst die Komplementation durch *trbB* in natürlicher Abfolge mit *trbC in trans*, jedoch nicht von *trbB* alleine, ermöglichte die Konjugation (Haase *et al.*, 1995). Eine Translationskopplung zwischen *trbB* und *trbC* könnte die Ursache des polaren Effektes der MURFI-Linker-Mutante sein. Um diese Vermutung weiter zu untermauern, wurde eine *trbB-in frame*-Deletionsmutante (pSK126), die für ein TrbB-Rumpfpeptid aus 9 Aminosäuren kodiert, erzeugt (Kap. 3.1.3).

Die vollständige Basensequenz des *trbB*-Rumpfgens und der korrekte Anschluß an die wt-Sequenz in pSK126 wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt. Nach der chemischen Induktion (Kap. 3.4.1) von SCS1(pSK126) wurde kein TrbB mehr gebildet. Die Expression der *trbB*-Folgegene entsprach für *trbE* und *trbG* dem Wildtyp, war jedoch für *trbC* reduziert, wie mit Hilfe von SOPHIA (Kap. 3.4.7) ermittelt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Für die Mutante HB101(pSK126) konnte kein DNA-Transfer gemessen werden. Ein Komplementationstest (Kap. 3.2) mit HB101(pSK126, pMS54) bzw. HB101(pSK126, pDB179) ergab, daß nur *trbB*, in natürlicher Abfolge mit *trbC* in der Lage war, die wt-Transferfrequenz wieder herzustellen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf die postulierte Translationskopplung zwischen *trbB* und *trbC*.



**Abb. 4.12 Potentielle Sekundärstrukturen im Bereich der *trbC*-Translationsstarts von RP4 und R751.** Die Vorhersage der Strukturen erfolgte mit STEMLOOP (GCG software package 9.1). Start- und Stopcodon sind fett dargestellt. Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist jeweils grau hinterlegt.

Die Analyse der Sekundärstruktur im Bereich zwischen dem *trbB*- und *trbC*-Strukturgen zeigte eine *inverted repeat*-Sequenz in diesem Bereich auf. Die Vorhersage der Sekundärstruktur der mRNA ergab in diesem Bereich eine *hairpin*-Struktur, bei der sich die Shine-Dalgarno-Sequenz von *trbC* in einem stabilen *stem* befinden würde, so daß sie für Ribosomen unzugänglich wäre (Abb. 4.12). Eine Erkennung der *trbC*-Shine-Dalgarno-Sequenz wäre demzufolge erst möglich, wenn die *hairpin*-Struktur durch die Translation von *trbB* aufgelöst wird. Da das *trbB*-Stopcodon innerhalb der Ribosombindungsstelle des *trbC*-Gens liegt, scheint das Ribosom die Translation

des *trbC*-Strukturgens nach erfolgter Translation des *trbB*-Strukturgens fortzusetzen. Dies läßt vermuten, daß darüber das Mengenverhältnisses TrbB/TrbC in der Zelle reguliert wird. Im IncP $\beta$ -Plasmid R751 konnte im Bereich des *trbC*-Translationsstarts keine mRNA-Sekundärstruktur gefunden werden, welche die gleiche Stabilität besitzt wie bei RP4. Daher liegt bei R751 wahrscheinlich ein anderer Regelmechanismus vor. Da für R751 keine *trbB*-Mutanten vorhanden sind, ist auch nicht bekannt, ob *trbB* ausreicht, um *trbB*-Mutanten zu komplementieren

Die Lage der Gene, die für TrbB-analoge Proteine kodieren, innerhalb der Tra2-Region anderer konjugativer Plasmide ist nicht einheitlich. Sie befinden sich entweder am Anfang eines polycistronischen Operons vor dem Gen, welches für ein TrbC-Analog kodiert, (Ti *trbB*, pNGR243 *trbB*) oder sie sind das letzte Gen des Operons (R388 *trwD*, Ti *virB11*, pKM101 *traG*) (Abb. 1.6). Daher kann angenommen werden, daß die translationale Kopplung zwischen *trbB* und *trbC* für RP4 spezifisch ist.

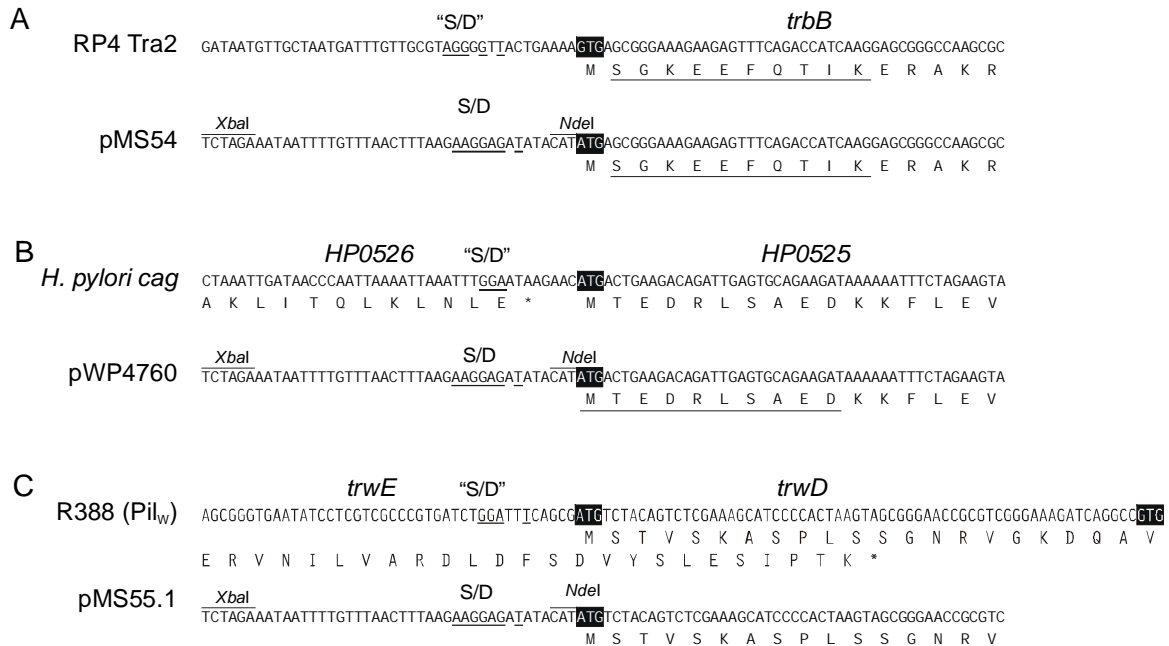
## 4.7 Die Reinigung von RP4 TrbB, R388 TrwD und *cag* HP0525 erfolgte unter nativen Bedingungen

Für die Reinigung von Vertretern der Pule-Superfamilie wurde bisher entweder modifiziertes oder denaturiertes Protein als Ausgangsmaterial verwendet (Rivas *et al.*, 1997; Sandkvist *et al.*, 1995; Christie *et al.*, 1989; Stephens *et al.*, 1995). Dies führte zu kontroversen Ergebnissen. So wurde für Ti VirB11, welches für die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen aus der Zelle gelöst wurde, eine ATPase-Aktivität beschrieben (Christie *et al.*, 1989). Dagegen war das gereinigte Fusionsprotein Ti MBP-VirB11 nicht in der Lage ATP zu hydrolysieren (Stephens *et al.*, 1995). Für einen anderen Vertreter der Pule-Superfamilie, *V. cholerae* EspE-His<sub>6</sub>, wurde ebenfalls keine ATPase-Aktivität beobachtet (Sandkvist *et al.*, 1995), R388 GST(226-230)-TrwD hingegen hydrolysierte ATP (Rivas *et al.*, 1997). Hier wird daher die Reinigung der Proteine unter nativen Bedingungen beschrieben.

### 4.7.1 Die Überexpression von RP4 *trbB*, R388 *trwD* und *cag* HP0525 in *E. coli* führte zur Überproduktion von löslichem Protein, das *in vivo* aktiv war

Für die Überexpression von TrbB, TrwD und HP0525 wurde der Vektor pMS470 $\Delta$ 8 verwendet, der eine der effektivsten *Shine-Dalgarno*-Sequenzen (die des T7 *Gen 10*) und die chemisch induzierbare P<sub>tac</sub>/LacI-Einheit enthält (Abb. 4.13). HP0525 wurde mittels PCR aus *H. pylori* NCTC11637 gewonnen (Pansegrau *et al.*, 1999). Das *trbB*-Strukturgen wurde mittels *Nde*I-Restriktion aus RP4 isoliert (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1992). Der offene Leserahmen für *trwD* enthält zwei mögliche Genstarts: ein ATG- und ein davon 22 Codons stromabwärts gelegenes GTG-Initiationscodon (Abb. 4.13). (Rivas *et al.*, 1997) zeigte, daß eine N-terminale GST(Glutathion-S-transferase)-Fusion mit TrwD *in vivo* aktiv war. Das *trwD*-Gen in dieser Fusion beginnt mit dem Serincodon, das sich stromabwärts neben dem ATG-Startcodon befindet. Da dies jedoch keinen Schluß auf das benutzte Startcodon zuläßt, wurde in dieser Arbeit der *trwD*-Start ermittelt. Nach Insertion der beiden möglichen *trwD*-Strukturgene in pMS470 $\Delta$ 8, die

mittels PCR (Kap. 3.1.2) gewonnen wurden (der GTG-Start wurde dabei in einen ATG-Start umgewandelt), konnte die Sequenz der beiden *trwD*-Gene mittels DNA-Sequenzierung bestätigt werden.



**Abb. 4.13 Konstruktion der Überexpressionsplasmide für die Stukturgene *trbB*, *HP0525* und *trwD*.** Oberer Teil: wt-DNA-Sequenzbereich am Startcodon von *trbB* (A), *HP0525* (B) und *trwD* (C). Nukleotidsequenzen, die der *Shine-Dalgarno*-Sequenz („S/D“) ähneln sind unterstrichen. Die Startcodons sind mit einem schwarzem Kasten unterlegt. Die partielle Aminosäuresequenz der einzelnen Genprodukte befindet sich unter der DNA-Sequenz. Der untere Teil zeigt die Stukturgene in der Umgebung des Vektors pMS470Δ8. Der unterstrichene Bereich der jeweiligen Aminosäuresequenzen wurde mittels N-terminaler Sequenzierung bestätigt.

Beide *trwD* enthaltende Plasmide produzierten nach chemischer Induktion (Kap. 3.4.1) ausreichende Mengen TrwD, jedoch kodierte nur pMS55.1 (ATG-Start) für ein *in vivo* aktives Protein. Dies zeigte, daß der Gestart von *trwD* ein ATG ist.

Die chemische Induktion (Kap. 3.4.1) der Stämme SCS1(pMS54) (*trbB*) und SCS1(pMS55.1) (*trwD*) führte zur Überproduktion eines zusätzlichen Proteins mit einer molekularen Masse von 32 kDa bzw. 44 kDa (Abb. 4.14). Die im Coomassie-Blau gefärbten SDS-15%igen Polyacrylamidgel ermittelte Masse von 32 kDa stimmt gut mit dem errechneten Molekulargewicht von TrbB (Tabelle 4.5) überein. Für TrwD wurde eine Masse ermittelt, die stark von dem errechneten Molekulargewicht (Tabelle 4.5) abweicht. Erklärbar ist dies dadurch, daß TrwD einen niedrigeren pI als TrbB besitzt (Tabelle 4.5).

Das überproduzierte TrbB machte ca. 52% des in SDS-löslichen Zellproteins aus; TrwD 62% (Abb. 4.14). Löslichkeitsstudien zeigten, daß ca. 50% des überproduzierten Proteins im Puffer, der wenig Salz (50 mM) und 0.1% (w/v) des nicht-ionischen Detergenz Brij-58 enthielt, löslich waren. Das lösliche Protein wurde als Ausgangsmaterial für die Reinigung von TrbB und TrwD verwendet.

#### 4.7.2 Eine dreistufige Reinigung führte zu nahezu homogenen RP4 TrbB, R388 TrwD und *cag* HP0525

Die Reinigung von TrbB, HP0525 und TrwD ausgehend von einem Zellextrakt der jeweiligen Überproduktionsstämme SCS1(pMS54), SCS1(pWP4760) und SCS1(pMS55.1) ist in den Tabelle 4.6 und Tabelle 4.7 bzw. in (Pansegrau *et al.*, 1999) zusammengefaßt.

TrbB und TrwD konnten beide durch Einsatz desselben Verfahrens gereinigt werden. Die Anwendung einer Heparin-Sepharose-Säulenchromatographie und anschließender Hydroxylapatit-Säulenchromatographie ergab eine 99,8%ig (TrbB) bzw. 93,4%ig (TrwD) reine Proteinpräparation (Abb. 4.14). Vorversuche zeigten, daß unter natürlicher Regulation gebildetes TrbB mit einem Serin beginnt, was auch auf das genetisch manipulierte TrbB in pMS54 zutrif.

**Tabelle 4.6 Reinigung von TrbB.** 1,2 l Kultur (SCS1(pMS54)) wurden induziert (Kap. 3.4.1). Anschließend konnten 7 g Zellen (Naßgewicht) geerntet und in 40 ml Spermidinmix aufgenommen werden (Kap. 3.4.1). Die Lyse der suspendierten Zellen erfolgte durch einen nativen Zellaufschluß (Kap. 3.4.4) (Fraktion I; 164 ml). Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 0°C - 4°C durchgeführt. ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung): Die mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60%(w/v)ige Sättigung) versetzte Fraktion I wurde für 2 h gerührt. Nach Zentrifugation (30.000 rpm/45 min/45 Ti-Rotor (Beckman)) wurde das gefällte Protein in 100 ml R-Puffer (Kap. 2.6; 500 mM NaCl) aufgenommen (Fraktion II; 100 ml). (Heparin-Sepharose-Chromatographie): Fraktion II wurde gegen R-Puffer dialysiert und anschließend auf eine Heparin-Sepharose-Säule (Vol. = 20 ml; Ø = 1,5 cm), die zuvor in R-Puffer (50 mM NaCl) equilibriert wurde, bei einer Flußrate von 20 ml/h aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 400 ml eines linear ansteigenden NaCl-Gradienten (50 mM - 600 mM NaCl in R-Puffer), wobei TrbB bei 375 mM NaCl eluierte (Fraktion III; 45 ml). (Hydroxylapatit-Chromatographie): Fraktion III wurde direkt auf eine Hydroxylapaptitsäule (Vol. = 18 ml; Ø = 1,5 cm), die zuvor in K-Puffer (Kap. 2.6) equilibriert wurde, bei einer Flußrate von 20 ml/h aufgetragen. Die Säule wurde stufenweise erst mit 60 ml K-Puffer und dann mit 60 ml K-Puffer (250 mM Kaliumphosphat) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 60 ml K-Puffer (500 mM Kaliumphosphat). Fraktionen, die TrbB enthielten, wurden zusammengefaßt (Fraktion IV; 29 ml) und gegen R-Puffer (200 mM NaCl; 20%(w/v) PEG-20.000) zur Aufkonzentrierung dialysiert. Zur Lagerung bei -20°C wurde TrbB gegen R-Puffer (200mM NaCl; 50%(w/v) Glycerin) dialysiert und war so nach drei Jahren noch aktiv.

Fraktion	Reinigungsschritt	Protein [mg]	Ausbeute [%]	Reinheit [%]*
I	Rohextrakt	912	100	27,1
II	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	600	65,8	32,3
III	Heparin-Sepharose	262	28,7	47,6
IV	Hydroxylapatit	85	9,3	99,8

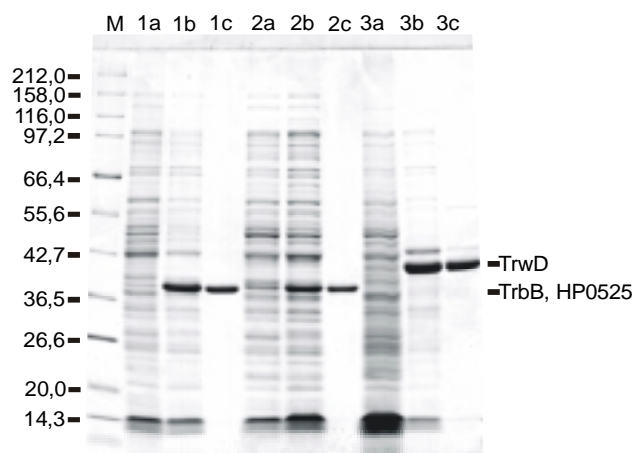
\* Laserdensitometrische Bestimmung von Coomassie-Blau gefärbten Gelen

**Tabelle 4.7 Reinigung von TrwD.** Nach der Induktion (Kap. 3.4.1) von 1,2 l Kultur (SCS1(pMS54)) wurden 10 g Zellen (Naßgewicht) geerntet, in 52 ml Spermidinmix aufgenommen (Kap. 3.4.1) und anschließend durch einen nativen Zellaufschluß lysiert (Kap. 3.4.4) (Fraktion I; 212 ml). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei einer Temperatur von 0°C - 4°C. ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung): Fraktion I wurde mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60%(w/v)ige Sättigung) versetzt, für 2 h gerührt und anschließend zentrifugiert (30.000 rpm/45 min/45 Ti-Rotor (Beckman)). Das Proteinpellet wurde in 35 ml R-Puffer (Kap. 2.6; 500 mM NaCl) gelöst (Fraktion II; 35 ml). (Heparin-Sepharose-Chromatographie): Die gegen R-Puffer (150 mM NaCl) dialysierte Fraktion II wurde auf eine Heparin-Sepharose-Säule (Vol. = 50 ml; Ø = 1,5 cm), die zuvor in R-Puffer (150 mM NaCl) equilibriert wurde, bei einer Flußrate von 50 ml/h aufgetragen. Zur Elution wurden 500 ml eines linear ansteigenden NaCl-Gradienten (150 mM - 600 mM NaCl in R-Puffer) eingesetzt. TrwD eluierte bei 220 mM NaCl (Fraktion III; 150 ml). (Hydroxylapatit-Chromatographie): Fraktion III wurde direkt auf eine Hydroxylapatitsäule (Vol. = 25 ml; Ø = 1,5 cm), die zuvor in K-Puffer (Kap. 2.6) equilibriert wurde, bei einer Flußrate von 25 ml/h aufgetragen. Ungebundenes Protein wurde mit 150 ml K-Puffer von der Säule gewaschen. Die Anwendung von 250 ml eines linear ansteigenden Kaliumphosphatgradienten (20 - 500 mM) in K-Puffer führte zur Elution von TrwD bei 160 mM Kaliumphosphat. Fraktionen, die TrwD enthielten, wurden zusammengefaßt (Fraktion IV; 120 ml) und gegen R-Puffer (500 mM NaCl; 20%(w/v) PEG-20.000) zur Aufkonzentrierung dialysiert. Vor der Lagerung bei -20°C wurde TrbB gegen R-Puffer (500mM NaCl; 50%(w/v) Glycerin) dialysiert und war so nach einem Jahr noch aktiv.

Fraktion	Reinigungsschritt	Protein [mg]	Ausbeute [%]	Reinheit [%]*
I	Rohextrakt	1075	100	31,9
II	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	280	26,1	32,5
III	Heparin-Sepharose	135	12,6	35,4
IV	Hydroxylapatit	23	2,1	93,4

\* Laserdensitometrische Bestimmung von Coomassie-Blau gefärbten Gelen

TrbB und TrwD zeigten ein leicht voneinander abweichendes Elutionsverhalten. So war die Bindungsaffinität von TrbB an Heparin-Sepharose stärker als die von TrwD, da TrbB bei 375 mM NaCl und TrwD bei 220 mM NaCl eluierte, wenn zur Elution ein linear ansteigender NaCl-Gradient verwendet wurde. Von der Hydroxylapatitsäule konnte TrbB erst mit einem Puffer, der 500 mM Kaliumphosphat enthielt, eluiert werden, wohingegen TrwD schon bei 160 mM Kaliumphosphat eluierte.



**Abb. 4.14. Reinigung von TrbB, HP0525 und TrwD.** Spur: 1a: SCS1(pMS54), ohne Zugabe von IPTG; 1b SCS1(pMS54), induziert für 5 h mit 1 mM IPTG; 1c: 5 µg TrbB der Fraktion V; 2a: SCS1(pWP4760), ohne Zugabe von IPTG; 2b SCS1(pWP4760), induziert für 5 h mit 1 mM IPTG; 2c: 5 µg HP0525 der Fraktion IV; 3a: SCS1(pMS55.1), ohne Zugabe von IPTG; 3b: SCS1(pMS55.1), induziert für 5 h mit 1 mM IPTG; 3c: 5 µg TrwD der Fraktion V; M: Standard für molekulare Massen, die in kDa angegeben sind. Proben wurden in einem SDS-15%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, das anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt wurde.

Da HP0525 nicht an Heparin-Sepharose band, wurde als erster Reinigungsschritt eine Anionenaustauschchromatographie mit HiTrapQ durchgeführt. Die anschließende Hydroxylapatit-Säulenchromatographie führte zu einer annähernd homogenen Proteinfraction. Die Anwendung einer Gelfiltration ergab eine 98,3% reine HP0525-Präparation (Abb. 4.14; Pansegrau *et al.*, 1999).

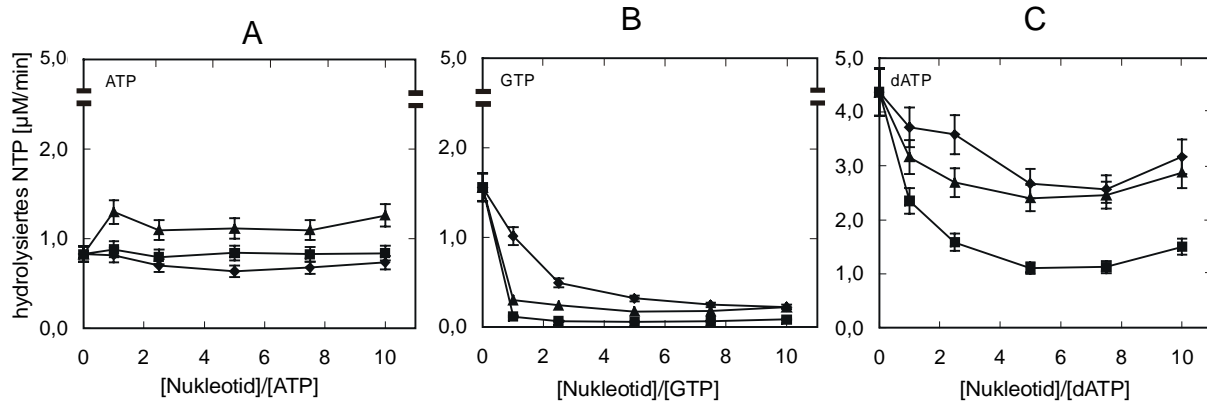
## 4.8 RP4 TrbB, R388 TrwD und *cag* HP0525 sind NTP-Hydrolasen

### 4.8.1 dATP, GTP und ATP sind Substrate für RP4 TrbB

Da die Vertreter der PulE-Superfamilie neben der konservierten Typ A-NBS noch weitere für NTPasen typische Motive besitzen, sollte TrbB auf seine Fähigkeit NTP zu hydrolysieren, untersucht werden (Kap. 3.7). TrbB hydrolysierte [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP, [ $\gamma$ - $^{32}$ P] GTP und [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP zu dem entsprechenden Nukleosiddiphosphat und  $P_i$ . Bei einem pH von 7,5 und 2 mM  $Mg^{2+}$  wies TrbB gegenüber dATP seine größte Aktivität auf. GTP wurde nur mit 30%iger und ATP nur mit 10%iger Effizienz, verglichen mit der dATPase-Aktivität, hydrolysiert. Zur Ermittlung weiterer möglicher Substrate für die NTPase-Aktivität von TrbB wurde die dATPase-Aktivität in Gegenwart von 200  $\mu$ M dATP und steigenden Molaritäten anderer Ribo- oder Desoxyribonukleosidtriphosphate bestimmt. Keines außer GTP und ATP war in der Lage, mit dATP um die Bindung an TrbB zu konkurrieren. Glyceringradientenzentrifugation (Kap. 3.6) zeigte, daß die gemessene dATPase der TrbB-Präparation mit TrbB korrelierte und nicht auf Verunreinigungen zurückgeführt werden konnte (Abb. 4.16).

Die dATPase-, GTPase- und ATPase-Aktivität wurde in Anwesenheit der jeweils anderen beiden Nukleotide bestimmt. Eine Reduktion der Hydrolysierungsaktivität wäre Indiz für eine bessere Bindungsaktivität zum aktiven Zentrum des zugesetzten kalten Nukleotids gegenüber dem markierten Nukleotid. Dieser Test zeigte, daß ATP besser gebunden wurde als GTP und dATP, obwohl TrbB dATP mit der höchsten Effizienz hydrolysierte (Abb. 4.15).

Für das Ablösen des DNA-Einzelstranges von der Plasmid-DNA wird eine Helikase benötigt. Bisher konnte jedoch auf RP4 kein Strukturgen, das für eine Helikase kodiert, identifiziert werden. Da die hexamere Ringstruktur von TrbB<sub>6</sub> (Kap. 4.9.4) der Ringstruktur von Helikasen wie z.B. DnaB ähnelte (Hingorani & O'Donnell, 1998), sollte der Einfluß von ssDNA auf die NTPase-Aktivität analysiert werden. Die Zugabe von ssDNA des Phagen M13mp19 stimulierte weder die dATPase-, GTPase- noch die ATPase-Aktivität von TrbB (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis für die Annahme, daß TrbB nicht direkt sondern indirekt am konjugativen DNA-Transfer beteiligt ist.



**Abb. 4.15 Vergleich der NTPase-Aktivität von TrbB und der Bindungsaffinität von dATP, GTP und ATP zu TrbB.** Zum Standardansatz für die Bestimmung der dATP-, GTP-, ATPase (Kap. 3.7) wurde jeweils nicht markiertes NTP bzw. dNTP bis zu einem 10-fachen Überschuß zugesetzt. Die dATPase-Aktivität (A), GTPase-Aktivität (B) und ATPase-Aktivität (C) ist in Abhängigkeit des Verhältnisses von nicht markiertem zugesetzten Nukleotid zu der Gesamtmenge von radioaktivem Nukleotid dargestellt.

#### 4.8.2 Die NTPase-Aktivität von RP4 TrbB besitzt zwei pH-Maxima

Der optimale pH-Wert der dATPase-, GTPase- und ATPase-Aktivität von TrbB lag bei pH 9,5. Die pH-Abhängigkeit der GTPase- und ATPase-Aktivität besaß ein zusätzliches Maximum bei pH 7,0.  $\text{Mg}^{2+}$  (2mM) war das bevorzugte bivalente Kation für alle drei Aktivitäten. Dessen Austausch gegen  $\text{Mn}^{2+}$  (1 mM) führte zu einer Reduktion der dATPase-Aktivität auf 50%, der GTPase-Aktivität auf 70% und der ATPase-Aktivität auf 30%. Wenn  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen anstelle von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen eingesetzt wurden, so sank die NTPase-Aktivität auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze.

#### 4.8.3 Das Substratspektrum der NTPase-Aktivität von RP4 TrbB und R388 TrwD unterscheidet sich vom *cag* HP0525-Substratspektrum

Für GST(226-230)-TrwD wurde eine ATPase- und GTPase-Aktivität nachgewiesen (Rivas *et al.*, 1997). Die ATPase-Aktivität konnte für TrwD bestätigt werden. Ein quantitativer Vergleich ist jedoch nicht möglich, da sich die Reaktionsbedingungen etwas unterschieden. Diese Arbeit ergab außerdem, daß TrwD zusätzlich dATP hydrolysierte.

Von allen drei untersuchten Proteinen, TrbB, HP0525 und TrwD, wies HP0525 die höchste NTPase-Aktivität auf. So war z.B. die dATPase-Aktivität von HP0525 bei pH 8,5 um das 2,8-fache größer als von TrbB und um das 6,7-fache größer als von TrwD.

Die optimalen Bedingungen für die NTPase-Aktivität der einzelnen Proteine waren im wesentlichen dieselben. Das pH-Optimum lag für alle Proteine im basischen Bereich um pH 9,0 (Rivas *et al.*, 1997; Pansegrau *et al.*, 1999).  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen wurden von jedem Protein als bivalentes Kationen bevorzugt. Der Austausch gegen  $\text{Ca}^{2+}$  reduzierte die ATPase-Aktivität der drei



Proteine, jedoch nur bei TrbB bis unterhalb der Nachweisgrenze (Rivas *et al.*, 1997; Pansegrau *et al.*, 1999).

Der auffälligste Unterschied zwischen den NTPase-Aktivitäten der drei untersuchten Proteine lag in ihrer Substratspezifität. Alle drei hydrolysierten dATP und ATP, wobei TrbB und TrwD dATP als Substrat bevorzugten, HP0525 jedoch ATP. TrbB und TrwD besaßen darüber hinaus eine GTPase-Aktivität, wohingegen HP0525 noch CTP, dCTP, UTP und dTTP, jedoch nicht GTP hydrolysierte.

## 4.9 RP4 TrbB, R388 TrwD und *cag* HP0525 besitzen eine ähnliche hexamere Ringstruktur

### 4.9.1 Physikalische Eigenschaften von RP4 TrbB und *cag* HP0525

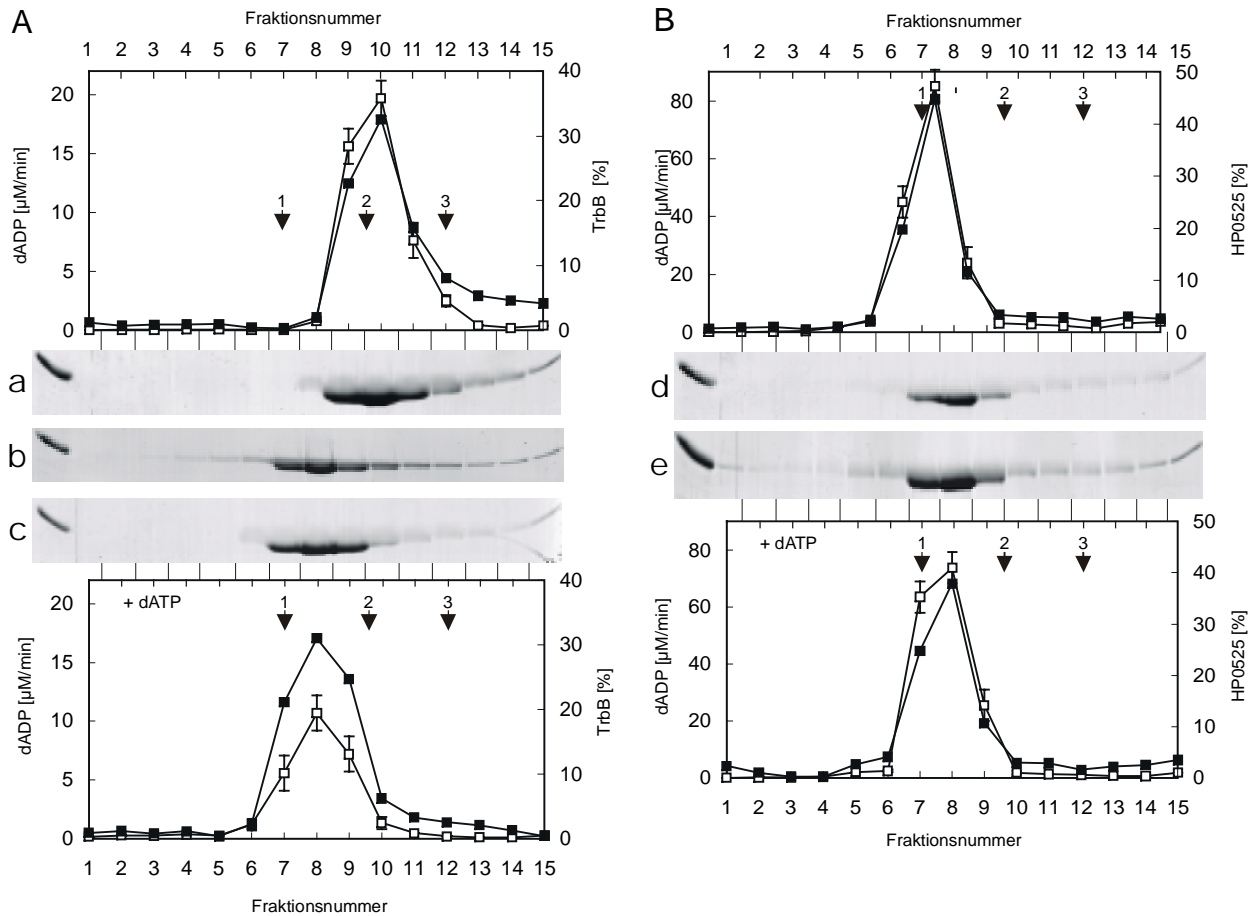
Zur Ermittlung des nativen Molekulargewichtes und des Formfaktors wurde eine Glyceringradientenzentrifugation und eine Gelfiltration mit TrbB und HP0525 durchgeführt (Tabelle 4.8; (Siegel & Monty, 1966)).

**Tabelle 4.8 Physikalische Eigenschaften von TrbB und HP0525.** Die Durchführung der Glyceringradientenzentrifugation ist in Abb. 4.16 beschrieben. Für die Gelfiltration mit Superose 6 (10 x 300 mM, Pharmacia) wurden 770 µg TrbB und 140 µg HP0525 in 200 µl Puffer [20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 100 mM NaCl; 1mM DTT; 10% (w/v) Glycerin] bzw. in 200 µl desselben Puffers, der zusätzlich 0,5 mM dATP und 10 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proteine auf eine Superose 6, die zuvor in dem jeweiligen Inkubationspuffer equilibriert wurde, mit einer Flußrate von 0,3 ml/min aufgetragen. 0,5 ml-Fraktionen wurden gesammelt und gelelektrophoretisch untersucht.

	TrbB		HP0525	
	- dATP	+ dATP	- dATP	+ dATP
Stokesradius [Å]	50	55	52	52
Sedimentationskoeffizient [ $\times 10^{-13}$ s]	6,8	9,7	9,7	9,7
Molekulare Masse [kDa]	140	220	208	208
Formfaktor	1,38	1,46	1,52	1,52

\* Für die Berechnung der nativen molekularen Massen und der Formfaktoren wurde ein partielles spezifisches Volumen von 0,725 cm<sup>3</sup>/g angesetzt (Siegel & Monty, 1966).

Beide Verfahren wurden sowohl mit als auch ohne dATP und Mg<sup>2+</sup> durchgeführt, um den Einfluß von Nukleotiden auf die Oligomerisierung zu bestimmen. Es wurde dATP gewählt, da TrbB dATP bevorzugt hydrolysierte. Glyceringradientenzentrifugation und Gelfiltration ergaben eine native molekulare Masse von 220 kDa für TrbB und 208 kDa für HP0525 in Anwesenheit von dATP und Mg<sup>2+</sup>. Dies zeigte, daß sich TrbB und HP0525 unter diesen Bedingungen wie Hexamere verhielten, wenn man eine molekulare Masse der Monomere von 35 kDa (TrbB) bzw. 38 kDa (HP0525) zu Grunde legt. In Abwesenheit von dATP und Mg<sup>2+</sup> ergab sich für TrbB eine native molekulare Masse von 140 kDa, die einem Tetramer entspricht. HP0525 verhielt sich unter diesen Bedingungen wie ein Hexamer (Abb. 4.16).

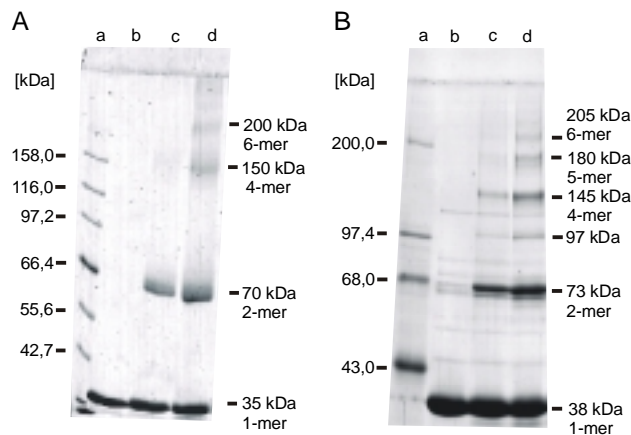


**Abb. 4.16 Glyceringradientenzentrifugation von TrbB und HP0525.** 435  $\mu\text{g}$  gereinigtes TrbB (A) und 435  $\mu\text{g}$  gereinigtes HP0525 (B) wurden in 150  $\mu\text{l}$  Puffer bzw. in Puffer, der mit 0,5 mM dATP bzw. dADP und 10 mM  $\text{MgCl}_2$  für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, auf 3,7 ml eines linearen Glyceringradienten (15%(w/v) - 35%(w/v) Glycerin) geschichtet und zentrifugiert (Kap. 3.6). Aliquote der erhaltenen Fraktionen wurden auf SDS-15%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch untersucht. Die Menge an Protein wurde mit ImageQuaNT (Molecular Dynamics) ermittelt. Aliquote der erhaltenen Fraktionen wurden ebenfalls auf ihre dATPase-Aktivität getestet (Kap. 3.7). Die mit Coomassie-Blau gefärbten Gele der Glyceringradientenzentrifugation ohne dATP und  $\text{Mg}^{2+}$  sind in a (TrbB) und d (HP0525) gezeigt. Die dATPase-Aktivität ( $\square$ ) und die Menge an Protein ( $\blacksquare$ ) der entsprechenden Fraktionen ist in dem jeweiligen darüberliegenden Diagramm dargestellt. Gel c (TrbB) und e (HP0525) zeigen die Glyceringradientenzentrifugation mit dATP und  $\text{Mg}^{2+}$ . Die entsprechende dATPase-Aktivität ( $\square$ ) und die Menge an Protein ( $\blacksquare$ ) ist jeweils in dem Diagramm darunter dargestellt. Für TrbB wurde ebenfalls eine Glyceringradientenzentrifugation mit dADP und  $\text{Mg}^{2+}$  durchgeführt (b). Katalase (1;  $M_r = 240$  kDa;  $S_{20,w} = 11,3 \times 10^{-13}$  s), Aldolase (2;  $M_r = 185$  kDa;  $S_{20,w} = 7,8 \times 10^{-13}$  s) und BSA (3;  $M_r = 68$  kDa;  $S_{20,w} = 4,4 \times 10^{-13}$  s) wurden parallel als Standard mitgeführt und sind durch Pfeile gekennzeichnet.

TrbB und HP0525 sedimentierten im Glyceringradienten in Anwesenheit von dATP und  $\text{Mg}^{2+}$  mit gleicher Geschwindigkeit, zeigten jedoch ein voneinander abweichendes Elutionsverhalten während der Gelfiltration. Dies deutet darauf hin, daß sich die Hexamere der beiden Proteine in ihrer Kompaktheit unterschieden und zeigte an, daß sie in ihrer globalen Gestalt divergierten.

#### 4.9.2 RP4 TrbB und *cag* HP0525 bilden Hexamere

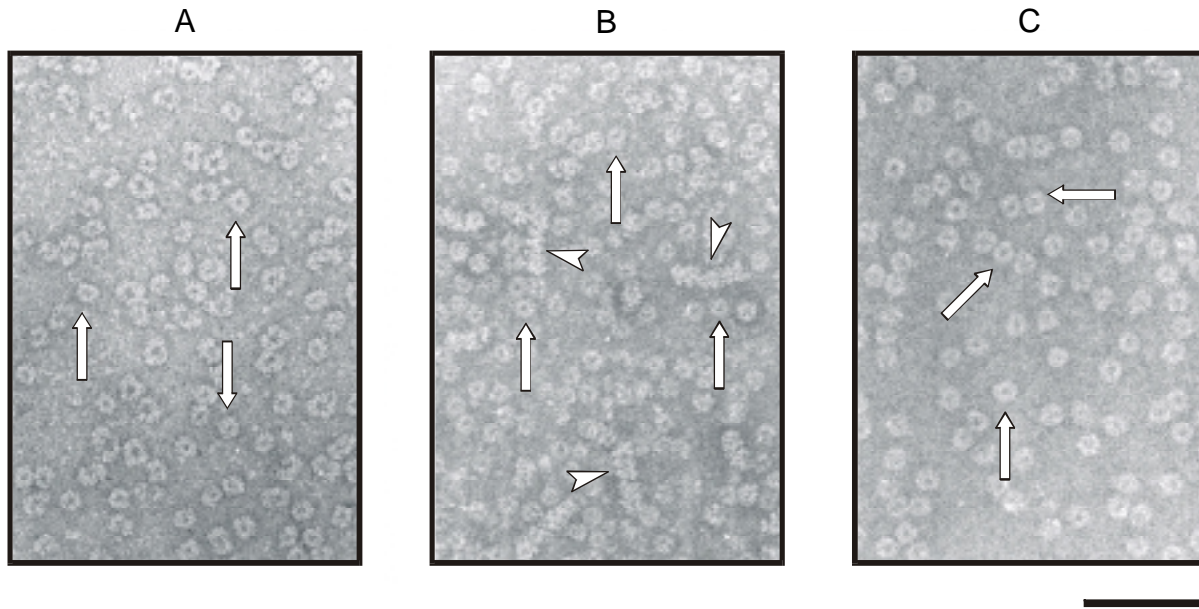
Chemische Vernetzung mit Glutaraldehyd wurde benutzt, um den oligomeren Status von TrbB und HP0525 zu analysieren. Für TrbB konnten auf dem Coomassie-Blau gefärbtem SDS-10%igen Polyacrylamidgel vier Banden nachgewiesen werden, die dem Monomer, Dimer, Tetramer und Hexamer entsprachen (Abb. 4.17). Dies deutet darauf hin, daß ein TrbB-Hexamere aus drei Dimeren aufgebaut sein könnte. Die chemische Vernetzung von HP0525 ergab sechs Banden im Coomassie-Blau gefärbten SDS-10%igen Polyacrylamidgel, die Vielfachen der monomeren Masse von HP0525 (38 kDa) entsprachen. Die Trimer-Bande war jedoch unterrepräsentiert und wich von ihrer theoretischen Masse um 17 kDa ab (Abb. 4.17; (Krause *et al.*, 1999)). Dimere waren bei allen drei Proteinen die prominenteste Spezies nach der chemischen Vernetzung.



**Abb. 4.17 Chemische Vernetzung von TrbB, HP0525 und TrwD mit Glutaraldehyd.** 5 μM TrbB und 15 μM HP0525 wurden mit verschiedenen Konzentrationen Glutaraldehyd in 20 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dATP, 1mM DTT und 50% (w/v) Glycerin für 90 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3,5 M Harnstoff (Endkonzentration) gestoppt und elektrophoretisch analysiert. Gezeigt sind die Coomassie-Blau gefärbten SDS-10%igen Polyacrylamidgele. A: Vernetzung von TrbB. Spur a: Proteinmarker (NEB); b: ohne Glutaraldehyd; c: 100 μM Glutaraldehyd und d: 300 μM Glutaraldehyd. B: Vernetzung von HP0525. Spur a: Proteinmarker (NEB); b: ohne Glutaraldehyd; c: 650 μM Glutaraldehyd und d: 1.300 μM Glutaraldehyd.

#### 4.9.3 Die oligomeren Strukturen von RP4 TrbB, R388 TrwD und *cag* HP0525 sind ringförmig

Elektronenmikroskopie (Kap. 3.5) wurde angewendet, um Aufschluß über die Architektur der Oligomere von TrbB, HP0525 und TrwD zu bekommen. In Anwesenheit von ATP und Mg<sup>2+</sup> bildeten alle drei Proteine Ringstrukturen mit einem zentralen Hohlraum aus (Abb. 4.18). Im Fall von TrbB und TrwD war neben den prominenten Ringen nicht-assembliertes Protein zu beobachten, d.h. TrbB- und TrwD-Oligomere waren instabiler als HP0525-Oligomere. Mit Hilfe einer Fixierung in 0,2% (w/v) Glutaraldehyd für 5 min konnten die TrbB-Ringe stabilisiert werden. Dies war für TrwD nicht möglich, da es unter diesen Bedingungen aggregierte. Interessanterweise wurden bei TrwD stäbchenförmige Strukturen beobachtet (Abb. 4.18), was die Aggregationsneigung von TrwD unterstreicht.



**Abb. 4.18 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von TrbB, HP0525 und TrwD in Anwesenheit von 1 mM ATP und 10 mM MgCl<sub>2</sub>.** Die Präparation von TrbB, HP0525 und TrwD erfolgte wie in Kapitel 3.5 beschrieben. A: TrbB; B: TrwD; C: HP0525. Pfeile zeigen in allen drei Abbildungen auf typische Ringstrukturen der Proteine. Die Pfeilspitzen im TrwD-Foto (B) sind auf stäbchenförmige Strukturen von TrwD ausgerichtet. Die Balkenlänge entspricht 500 nm.

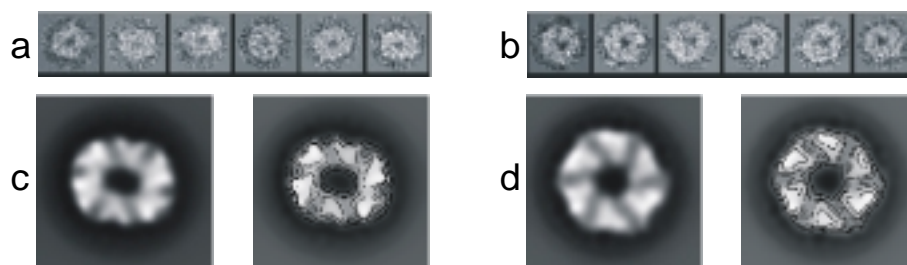
Glyceringradientenzentrifugation und Gelfiltration ergaben, daß sich TrbB in Abwesenheit von Nukleotiden und Mg<sup>2+</sup> wie ein Tetramer verhielt (Kap. 4.9.1). Im Elektronenmikroskop waren jedoch unter diesen Bedingungen, außer einigen wenigen Ringen keine regelmäßigen Strukturen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Dasselbe traf auch auf TrwD zu, wenn es in Abwesenheit von ATP und Mg<sup>2+</sup> inkubiert und anschließend unter dem Elektronenmikroskop beobachtet wurde. Daraus folgt, daß ATP die TrbB- und TrwD-Ringe stabilisiert, was für HP0525 offenbar nicht erforderlich war. Das Verhalten von TrbB und HP0525 bei der Glyceringradientenzentrifugation und der Gelfiltration führte zur selben Schlußfolgerung (Kap. 4.9.1).

TrbB wurde mit verschiedenen Nukleotiden und Mg<sup>2+</sup> inkubiert und anschließend unter dem Elektronenmikroskop beobachtet, um den Einfluß verschiedener Nukleosidverbindungen auf die Stabilität der hexameren Ringe zu bestimmen. ATP, dATP, AMP, ATP $\gamma$ S, UTP, ADP, AMP-PCP, und GTP stabilisierten die hexameren Ringe, was für CTP und PP nicht zutraf (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutete, daß die Hydrolyse der Nukleotide für die Ringstabilisierung nicht notwendig war, was auch durch Glyceringradientenzentrifugation mit TrbB und dADP + Mg<sup>2+</sup> (Abb. 4.16 b) gezeigt werden konnte, da sich TrbB unter diesen Bedingungen wie ein Hexamer verhielt.

#### 4.9.4 Die Hexamere von RP4 TrbB und *cag* HP0525 bestehen aus unregelmäßig trigonalen Untereinheiten

Die computergestützte Bildanalyse (*Image Processing*) von TrbB und HP0525 ausgehend von elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Kap.3.5) wurde verwendet, um die Strukturen der

hexameren Ringe von TrbB und HP0525 vergleichen zu können. Zur Stabilisierung der Ringstrukturen wurde ATP und  $Mg^{2+}$  verwendet, da ATP für diesen Zweck im gleichen Maße wie dATP wirksam war. Drei Präparate aus unabhängigen Reinigungen von TrbB und HP0525 führten zum gleichen Abbild im *Image Processing*.



**Abb. 4.19 Image processing für TrbB und HP0525.** Vor der Elektronenmikroskopie (Kap. 3.5) wurde gereinigtes TrbB und HP0525 in Anwesenheit von ATP und  $Mg^{2+}$  10 min bei Raumtemperatur inkubiert. TrbB wurde zusätzlich mit 0,2% (w/v) Glutaraldehyd für 5 min fixiert. 6773 Abbilder (TrbB) bzw. 4855 Abbilder (HP0525) wurden aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe des *Xmipp software package* (Marabini *et al.*, 1996) extrahiert und stellten das Ausgangsmaterial für das *Image Processing* dar. Die ausgewählten Partikel wurden translational und rotational nach der *Cross-correlation*-Methode und dem *Reference-free PSPC alignment*-Algorithmus ausgerichtet (Krause *et al.*, 1999). Im oberen Teil sind sechs charakteristische Abbilder von TrbB (a) bzw. HP0525 (b), die aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen extrahiert wurden, gezeigt. Ein gemitteltes Abbild von TrbB (c) und HP0525 (d) befindet sich unterhalb der extrahierten Abbilder. Sie besitzen eine Auflösung von 14 Å. Die Rahmenkantenlänge der gemittelten Abbilder und der extrahierten Abbilder repräsentiert jeweils 200 Å.

Das gemittelte Abbild von TrbB weist eine Reihe von Gemeinsamkeiten mit dem gemittelten Abbild von HP0525 auf (Abb. 4.19). In beiden Abbildern sind sechs scharf begrenzte Bereiche hoher Elektronendichte zu erkennen, die mit dem vorhergesagten hexameren Status (Kap. 4.9.2) von TrbB und HP0525 korrelieren. Dies läßt vermuten, daß sich in beiden Molekülen sechs Monomere zu einem Ring (120 Å) mit einem zentralen Bereich niedriger Elektronendichte (30 Å), der eine Pore sein könnte, zusammenlagern. In beiden Fällen haben die Monomere die Gestalt eines unregelmäßigen Dreiecks. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließen eine statistische Verteilung der einzelnen Molekülansichten von TrbB bzw. HP0525 nicht erkennen, da nahezu alle Moleküle in axialer Ausrichtung und nur von einer Seite zu beobachten waren. Dies war erkennbar, da die gemittelten Abbilder stereoisomere Objekte sind und jeweils nur ein Enantiomer im Elektronenmikroskop gesehen werden konnte. Offenbar besitzt eine Seite des TrbB- bzw. HP0525-Hexamers eine stärkere Affinität zum Kontrastmittel, welches für die Elektronenmikroskopie verwendet wurde. Der gleichgerichtete Drehsinn des TrbB- und HP0525-Abbildes deutet darauf hin, daß in beiden Molekülen jeweils die gleiche Seite die höhere Affinität zum Kontrastmittel hatte.

Beide gemittelten Abbilder unterscheiden sich in der Symmetrie: das TrbB-Abbild ist zweifach rotationssymmetrisch und hat die Form eines langgestreckten unregelmäßigen Sechsecks,

wohingegen das HP0525-Abbild ein reguläres Sechseck mit einer sechsfachen Rotations-symmetrie ist.

#### **4.10 *trbB*-Mutationsanalyse von innerhalb der PulE-Superfamilie konservierten Bereichen**

Ob die gemessene NTPase-Aktivität von TrbB für seine *in vivo*-Funktion während der Konjugation essentiell ist, sollte anhand der Eigenschaften von TrbB-Mutanten geklärt werden. Die PulE-Superfamilie besitzt vier konservierte Motive: eine Typ A-NBS, eine Aspartat-Box I und II und eine Histidin-Box (Abb. 1.7). Drei der 12 hochkonservierten Aminosäuren aus drei verschiedenen Motiven wurden für die gerichtete Mutagenese von *trbB* ausgewählt: Lysin (K161A) der Typ A-NBS, Aspartat (D186A) in der Aspartat-Box I und Arginin (R217T) in der Aspartat-Box II (Abb. 4.20). Die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Funktion von TrbB *in vivo* und *in vitro*, sowie auf seine Fähigkeit hexamere Ringe auszubilden, wurden in dieser Arbeit untersucht.

Die Punktmutationen wurden im Plasmid pMS54 mit Hilfe des *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene erzeugt (Kap. 3.1.4). Der Austausch der Aminosäuren erfolgte nach den Regeln von Bordo & Argos (1991), so daß die daraus folgenden Änderungen der tertiären Struktur von TrbB theoretisch minimal gehalten wurden. Die Sequenzierung der mutierten Gene bestätigte die Einführung der gewünschten Mutation und das Ausbleiben unerwünschter Mutationen innerhalb des *trbB*-Struktur-gens. Um Veränderungen im nicht sequenzierten Vektoranteil auszuschließen, wurden die mutierten Struktur-gene in den Vektor pMS470Δ8 subkloniert. Dies führte zu den Plasmiden pMS54K161A, pMS54D186A und pMS54R217T, die für weitere Untersuchungen der Mutanten benutzt wurden. Die chemische Induktion (Kap. 3.4.1) von SCS1-Zellen, welche die pMS54-Derivate enthielten, führte zur Überproduktion der Mutantenproteine, die im SDS-15%igen Polyacrylamidgel die gleiche Mobilität hatten wie das wt-TrbB (Abb. 4.22). Dieses Ergebnis zeigte, daß die Mutation keinen Einfluß auf die Expression hatte.

A	157	158	159	160	161	162	163	164	165
	T	G	S	G	K	T	T	L	V
	ACT	GGC	TCG	GGG	AAG	ACC	ACG	CTC	GTC
	ACT	GGC	TCG	GGC	<u>GCG</u>	ACC	ACG	CTC	GTC
	T	G	S	G	A	T	T	L	V
B	182	183	184	185	186	187	188	189	190
	V	I	I	E	D	T	G	E	I
	GTC	ATC	ATC	GAG	GAC	ACC	GGC	GAA	ATC
	GTC	ATC	ATC	GAG	<u>GCC</u>	ACC	GGC	GAA	ATC
	V	I	I	E	A	T	G	E	I
C	213	214	215	216	217	218	219	220	221
	K	T	T	L	R	M	R	P	D
	AAG	ACA	ACG	CTG	CGT	ATG	CGC	CCC	GAC
	AAG	ACA	ACG	CTG	<u>ACT</u>	ATG	CGC	CCC	GAC
	K	T	T	L	T	M	R	P	D

**Abb. 4.20 Sequenzübersicht der gerichteten Mutation im *trbB*-Gen.** Folgende Aminosäureaustausche wurden vorgenommen: A: Lysin an Position 161 gegen Alanin; B: Aspartat an Position 186 zu Alanin; C: Arginin an Position 217 zu Threonin. Die Mutation ist jeweils grau hinterlegt. Die Zahlenreihe zeigt die Position des jeweiligen Aminosäurerestes innerhalb des Proteins an. Unter der Zahlenreihe steht die wt-Aminosäuresequenz; die wt-DNA-Sequenz befindet sich darunter. Die unterste Zeile ist die Aminosäuresequenz der entsprechenden Mutante; die dazugehörige DNA-Sequenz befindet sich darüber. In der DNA-Sequenz des mutierten *trbB*-Gens sind die ausgetauschten Nukleotide fett und unterstrichen dargestellt.

#### 4.10.1 Die intakte Typ A-Nukleotidbindungsstelle in TrbB ist für den konjugativen Transfer von RP4 essentiell

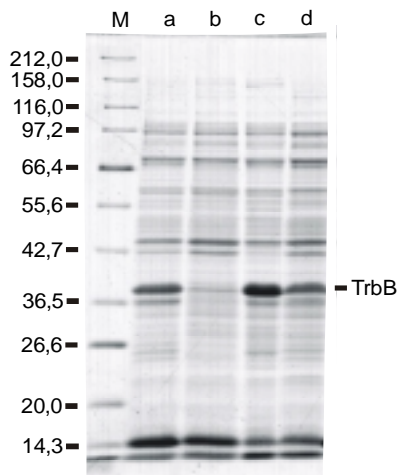
Die Auswirkungen der einzelnen Punktmutationen in *trbB* auf den konjugativen DNA-Transfer wurden in einem Komplementationstest mit Hilfe von Filterkreuzungen (Kap. 3.2) ermittelt. Da eine *in-frame-trbB*-Deletionsmutante nur mit *trbB*, *trbC* in natürlicher Abfolge komplementiert werden konnte (Kap. 4.6.1), wurden die mutierten *trbB*-Strukturgene über die *KpnI*- und *SphI*-Schnittstellen in pDB179 (*trbB*, *trbC*) kloniert. Der Komplementationstest mit HB101(pSK126, pDB179-Derivat) als Donor zeigte, daß bei Zellen, die *trbB K161A* enthielten, keine Konjugation beobachtet werden konnte. Eine auf 25% der wt-Frequenz reduzierte Transferfrequenz wurde für Zellen, die *trbB D186A* enthielten, beobachtet. *trbB R217T* reduzierte die Transferfrequenz um 50%. (Tabelle 4.9).

#### 4.10.2 Eigenschaften der TrbB-Mutanteneiweiße

Da die drei TrbB-Mutanten einen unterschiedlichen Phänotyp besaßen (Kap. 4.10.1), wurden alle Mutanteneiweiße gereinigt, um sie für enzymatische Tests zugänglich zu machen. TrbB K161A und TrbB R217T waren unter den gleichen Bedingungen wie wt-TrbB löslich und der entsprechende Zellextrakt diente als Ausgangsmaterial für die Reinigung (Abb. 4.21). Die Mutation D186A führte zu einem Protein, das unter nativen Bedingungen nahezu unlöslich war.

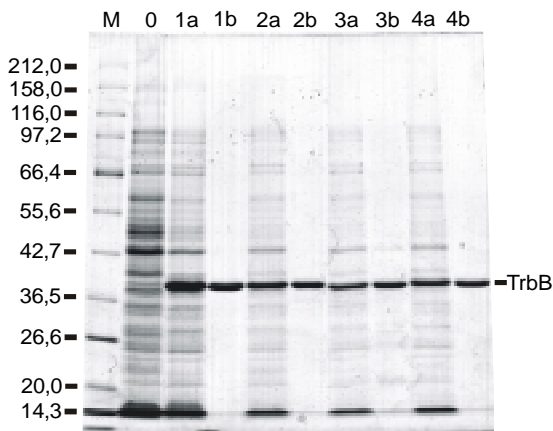


In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß wt-TrbB nach einer Extraktion aus Zellen mit Harnstoff und anschließender Renaturierung seine NTPase-Aktivität und die Fähigkeit Hexamere zu bilden, wiedererlangte. Daher wurde ein Harnstoffextrakt als Ausgangsmaterial für die Reinigung von TrbB D186A verwendet. Die Anwendung des Reinigungsverfahrens für wt-TrbB führte auch bei den Mutantenproteinen zu einer nahezu homogenen Präparation.



**Abb. 4.21 Löslichkeit der TrbB-Mutantenproteine.**

Gezeigt sind die elektrophoretisch aufgetrennten Brij-58/NaCl-Extrakte (3.4.3.). Spur: a: SCS1(pMS54); b: SCS1(pMS54K161A); c: SCS1(pMS54D186A); d: SCS1(pMS54R217T); m: Standard für molekulare Massen, welche in kDa angegeben sind. Proben wurden in einem SDS-15%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, das anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt wurde.



**Abb. 4.22 Reinigung der TrbB-Mutantenproteine.**

Spur: a: SCS1(pMS54), ohne Zugabe von IPTG; b: SCS1(pMS54), induziert für 5 h mit 1 mM IPTG; c: 5 µg TrbB der Fraktion V; d: SCS1(pMS54K161A), induziert für 5 h mit 1 mM IPTG; e: 5 µg TrbB K161A; f: SCS1(pMS54D186A), induziert für 5 h mit 1 mM IPTG; g: 5 µg TrbB D186A; h: SCS1(pMS54R217T), induziert für 5 h mit 1 mM IPTG; i: 5 µg TrbB R217T; m: Standard für molekulare Massen, welche in kDa angegeben sind. Proben wurden in einem SDS-15%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, das anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt wurde.

Wt-TrbB hydrolysierte dATP, GTP und ATP, wobei das pH-Optimum für diese Aktivitäten bei 9,5 lag. Die GTPase- und ATPase-Aktivität von wt-TrbB besaß jeweils ein zweites pH-Maximum bei 7,0 (Kap. 4.8.2). Daher wurde bei den drei gereinigten Mutantenproteinen die dATPase-Aktivität bei pH 9,5 und die GTPase- bzw. die ATPase-Aktivität bei pH 9,5 und pH 7,5 bestimmt (Tabelle 4.9).

TrbB K161A besaß keine der getesteten NTPase-Aktivitäten mehr. 40% der wt-GTPase-Aktivität bei pH 7,5 und 60% der wt-ATPase-Aktivität bei pH 9,5 wurden für TrbB D186A ermittelt. Die GTPase-Aktivität von TrbB D186A war bei pH 7,5 größer als bei pH 9,5, was auf eine veränderte



pH-Abhängigkeit dieser Aktivität hindeutet. TrbB R217T besaß bei pH 7,5 eine GTPase-Aktivität, die sich im Bereich der Nachweisgrenze der Methode befand. Keines der Mutantenproteine war in der Lage dATP zu hydrolysieren, obwohl dATP bevorzugt von wt-TrbB hydrolysiert wurde. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine Korrelation zwischen dem Verlust bzw. der Verminderung der NTPase-Aktivität der einzelnen Mutantenproteine mit der Transferfrequenz der entsprechenden Mutante besteht.

**Tabelle 4.9 Eigenschaften der *trbB*-Punktmutanten.**

<i>trbB</i> - Mutante	Transfer frequenz <sup>1)</sup>	dATPase- Aktivität <sup>2)</sup>		GTPase- Aktivität <sup>2)</sup>		ATPase- Aktivität <sup>2)</sup>		Ausbildung hexamerer Ringe <sup>3)</sup>	Trans- dominanz <sup>4)</sup>
		pH 9,5	pH 7,5	pH 9,5	pH 7,5	pH 9,5	pH 7,5		
wt	2,0 x 10 <sup>0</sup>	4,48±0,5	0,9±0,1	1,88±0,3	0,55±0,1	0,91±0,1		+	4,2 x 10 <sup>-1</sup>
wt <sup>u</sup>		2,27±0,4	0,26±0,03	0,34±0,03	0,28±0,03	0,31±0,03		+	
K161A	<10 <sup>-7</sup>	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03		+	1,4 x 10 <sup>-4</sup>
D186A <sup>u</sup>	4,8 x 10 <sup>-1</sup>	<0,03	0,11±0,03	<0,07	<0,07	0,22±0,03		+	n.b.
R217T	9,6 x 10 <sup>-1</sup>	<0,07	<0,09	<0,03	<0,03	<0,03		+	n.b.

<sup>1)</sup> Die Transferfrequenz ist in Transkonjuganten/Donorzelle angegeben (Kap. 3.2).

<sup>2)</sup> Die NTPase-Aktivitäten wurden mit 1,5 µM Protein bei 30°C für 20 min bestimmt und sind in µM/min angegeben (Kap. 3.7).

<sup>3)</sup> Der Test wurde in Anwesenheit von ATP und Mg<sup>2+</sup> durchgeführt (Kap. 3.5).

<sup>4)</sup> Für die Bestimmung der Transdominanz wurde der merodiploide Stamm HB101(pDB126, pDB179-Derivate) eingesetzt, der sowohl *wt-trbB* und mutiertes *trbB* exprimiert. Die Transferfrequenz ist in Transkonjuganten/Donorzelle angegeben (Kap. 3.2).

<sup>u</sup> Die Reinigung erfolgte ausgehend von einem Harnstoffextrakt (Kap. 3.4.4).

n.b. nicht bestimmt

Einen genetischen Hinweis auf die Wechselwirkung von Genprodukten *in vivo* gibt der Test auf Transdominanz. Transdominanz liegt vor, wenn das gleichzeitige Vorhandensein des wt-TrbB und eines transferinaktiven TrbB-Mutantenproteins in der Zelle zur Reduktion der DNA-Transferfrequenz führt. Dies würde bedeuten, daß heterohexamere Ringe aus wt-TrbB und mutiertem TrbB gebildet wurden, die keine volle Funktionsfähigkeit mehr besitzen. Die gleichzeitige Expression von *wt-trbB* und *trbB K161A* führte zu einer tausendfachen Reduktion der Transferfrequenz, was andeutet, daß TrbB K161A in der Lage war mit wt-TrbB heterohexamere Ringe auszubilden.

Elektronenmikroskopie zeigte, daß alle drei Mutantenproteine, genau wie wt-TrbB, in der Lage waren, stabile hexamere Ringe nur bei Anwesenheit von ATP und Mg<sup>2+</sup> (pH 7,5) auszubilden (Tabelle 4.9).

Aus den Eigenschaften der Mutantenproteine lassen sich drei Schlußfolgerungen ziehen: (i) Bindung und/oder Hydrolyse von NTP sind für die volle Funktion von TrbB während der

Konjugation notwendig, (ii) keine der drei mutierten Aminosäuren (K161; D186; R217) ist für die Ausbildung der hexameren Ringstruktur notwendig und (iii) die Bindung und nicht die Hydrolyse von NTP scheint die Ringstruktur von TrbB zu stabilisieren.