

5 DISKUSSION

5.1 Die TraG-ähnlichen Proteine bilden eine neue Proteinklasse, deren Funktion auf die Konjugation beschränkt zu sein scheint

His₆-TraG und His₆-TraD besaßen ungewöhnliche Reinigungseigenschaften, die bisher bei keinem anderen Protein beschrieben wurden: (i) Beide Proteine wurden während der Reinigung teilweise abgebaut (Kap. 4.2.2). (ii) Nach der Affinitätschromatographie an Ni-NTA enthielt die His₆-TraG- bzw. His₆-TraD-Präparation noch Verunreinigungen, die sich mit weiteren verschiedenen Säulenmatrizes nicht abtrennen ließen (Kap. 4.2.2). (iii) In einem Glyceringradienten zeigten His₆-TraG und His₆-TraD ein polydisperses Verhalten (Kap. 4.3). Darüber hinaus wiesen die TraG-ähnlichen Proteine in ihrer Primärstruktur keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinklassen auf und enthielten keine bekannten Motive (Kap. 4.1). Daher scheinen die TraG-ähnlichen Proteine eine neuartige Proteinklasse zu bilden.

Die TraG-ähnlichen Proteine unterstützen wahrscheinlich einen Prozeß, der für die Konjugation spezifisch ist. Sie wurden zuerst nur in konjugativen Systemen gefunden. Sogar die konjugativen Plasmide pNOB8 und pING1 des Archeons *Sulfolobus* kodieren ein TraG-ähnliches Protein, jedoch besitzen sie darüber hinaus keine weiteren Ähnlichkeiten zu anderen konjugativen Plasmiden (She et al., 1998). Ein gegenteiliges Beispiel ist das *ptl*-Operon von *B. pertussis*. Es kodiert für ein Transportsystem, dessen Substrat ein Multiproteinkomplex - das Pertussistoxin - und keine DNA ist. Die einzelnen Komponenten des *ptl*-Transportsystems besitzen Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen konjugativer Systeme (Lessl et al., 1992), jedoch kodiert das *ptl*-Operon nicht für ein TraG-ähnliches Protein. Daraus kann geschlossen werden, daß für den reinen Proteintransport ein TraG-ähnliches Protein überflüssig ist. Dies konnte dadurch gezeigt werden, daß die TraG-ähnlichen Proteine für die Ausbildung des Mpf-Systems und den Transport des Pilins zur Assemblierungsplattform nicht benötigt wurden (Lessl et al., 1993; Frost et al., 1994). Bei der bakteriellen Konjugation tritt ein zweiter Proteintransfer auf, der mit dem DNA-Transfer gekoppelt ist. So ist bei RP4 der Transfer der Primase TraC mit dem DNA-Transfer gekoppelt (Rees and Wilkins, 1990). Für das IncI-Plasmid Collb-P9 wurde ebenfalls ein gekoppelter Transfer von DNA und der Primase Sog beobachtet (Rees and Wilkins, 1989). Bisher konnte jedoch nicht gezeigt werden, ob dieser DNA-Proteintransport unabhängig von RP4 TraG bzw. Collb-P9 TrbC abläuft. Die T-DNA des Ti-Plasmides aus *A. tumefaciens* ist während des Transfers kovalent an die Relaxase VirD2 gebunden und wird gleichzeitig mit dem SSB-Protein VirE2 transportiert. Experimentell konnte der T-DNA-Transfer vom VirE2-Transport entkoppelt werden. Jedoch ist auch hier nicht bekannt, ob das TraG-ähnliche VirD4 direkt für den VirE2- bzw. DNA-VirD2-Transport benötigt wird (Binns et al., 1995). Für die kürzlich entdeckten Transportkomplexe in *R. prowazekii*, *H. pylori* und *L. pneumophila* ist bisher noch kein Substrat bekannt (Vogel et al., 1998; Andersson et al., 1998; Covacci et al., 1999). Da

jedoch alle drei Organismen ein Gen enthalten, daß für ein TraG-ähnliches Protein kodiert, kann angenommen werden, daß sie DNA oder einen DNA-Proteinkomplex transportieren. Ein erster Hinweis darauf ist die Mobilisierung des nicht-konjugativen Plasmides RSF1010 durch die *dot*-Proteine in *L. pneumophila* (Vogel et al., 1998).

Welcher Prozeß tritt nur bei der Konjugation auf? Die Konjugation kann in mehrere Schritte unterteilt werden (Abb. 1.4), die Assemblierung des Sex-Piluses, die Kontaktaufnahme mit dem Rezipienten, das Ablösen des zu transferierenden DNA-Einzelstranges von der Plasmid-DNA, den Transport des DNA-Einzelstranges vom Donor in den Rezipienten und die Komplementärstrangsynthese im Rezipienten. Von all diesen Teilprozessen sind wahrscheinlich der Transport des DNA-Einzelstranges vom Donor in den Rezipienten und das Ablösen des DNA-Einzelstranges für die Konjugation spezifisch. Zwar erfolgt das Ablösen des DNA-Einzelstranges von der Plasmid-DNA nach dem *rolling circle*-Mechanismus (Pansegrau and Lanka, 1996), der auch bei der Replikation von zirkulärer DNA beobachtet wurde (Stryer, 1988). Jedoch scheint der Vorgang, der während der Konjugation den *rolling circle*-Mechanismus auslöst, für die Konjugation spezifisch zu sein. Es kann daher angenommen werden, daß die TraG-ähnlichen Proteine entweder das Ablösen des DNA-Einzelstranges initiieren oder an dem Transport des DNA-Einzelstranges vom Donor in den Rezipienten beteiligt sind. Welche experimentellen Hinweise gibt es, die die Initiations- oder Transporthypothese unterstützen?

(1) Da weder *His₆-TraG* noch *His₆-TraD* ATP hydrolysierten, scheinen die TraG-ähnlichen Proteine keinen energieverbrauchenden Prozeß zu katalysieren

Einige TraG-ähnliche Proteine besitzen innerhalb des Motivs I eine Typ A-NBS, dennoch ist sie nicht innerhalb der gesamten Proteinfamilie konserviert (Abb. 4.1). Es gibt jedoch NTP-bindende Proteine (z.B. Elongationsfaktoren, Thymidinkinasen) deren Typ A-NBS von der von Walker aufgestellten Konsensussequenz [G-X₄-G-K-(S,T)] (Walker et al., 1982) abweichen (Saraste et al., 1990). Allen gemeinsam ist nur das Lysin (Saraste et al., 1990; Traut, 1993), welches auch innerhalb der TraG-ähnlichen Proteine die einzige vollständig konservierte Aminosäure im Motiv I ist. Das Lysin scheint für die Konformation der Typ A-NBS notwendig zu sein und interagiert möglicherweise mit dem γ - und dem β -Phosphat des gebundenen Nukleotids (Saraste et al., 1990). Es wird vermutet, daß Lysin während der NTP-Hydrolyse ein Wassermolekül oder ein OH⁻-Ion bindet, welches den nukleophilen Angriff auf das γ -Phosphat ausübt (Flaherty et al., 1994). Die ATPase-Aktivität der *His₆-TraG*- und *His₆-TraD*-Präparation konnte von *His₆-TraG* und *His₆-TraD* abgetrennt werden (Kap. 4.3), d.h., die TraG-ähnlichen Proteine scheinen keine NTP-Hydrolasen zu sein. Es ist bekannt, daß nicht jedes Protein, das eine Typ A-NBS enthält, auch die Fähigkeit besitzt, Nukleotide zu binden bzw. zu spalten (Saraste et al., 1990).

Die Mutation des konservierten Lysins in Motiv I (Abb. 4.1) in RP4 TraG (K187T) führte zu einem transferdefekten Phänotyp, was zeigt, daß das konservierte Lysin für die Funktion der TraG-ähnlichen Proteine während der Konjugation essentiell ist (Balzer et al., 1994). Dieser Befund erlaubt jedoch keine Aussage über das Verhalten von TraG innerhalb eines Komplexes.

(2) *His₆-TraG* und *His₆-TraD* banden nicht-sequenzspezifisch dsDNA und ssDNA, wobei ssDNA das bevorzugte Substrat war

Obwohl kein TraG-ähnliches Protein ein für DNA-bindende Proteine typisches Motiv (z.B. *helix-turn-helix*, Zink-Finger) enthält, banden *His₆-TraG* und *His₆-TraD* unspezifisch an dsDNA und

ssDNA (Kap. 4.4). DNA-bindende Proteine haben die verschiedenartigsten Funktionen. So regulieren Aktivatoren (z.B. Ti TraR; (Hwang *et al.*, 1995)) und Repressoren (z.B. *lac*-Repressor; (Stryer, 1988)) die Genexpression. Am DNA-Metabolismus sind Polymerasen, Helikasen, Primasen, Topoisomerasen, Ligasen, Methylasen und SSB-Proteine beteiligt. Der DNA-Abbau wird von Restriktionsenzymen, Endo- und Exonukleasen bewerkstelligt. Strukturproteine (z.B. Histon-ähnliche Proteine) sind an der Organisation der DNA in der Zelle beteiligt. Viele dieser Proteine erkennen eine spezifische DNA-Sequenz (z.B. Aktivatoren, Repressoren, Restriktionsenzyme, Methylasen, Primasen) andere hingegen binden generell an DNA (z.B. SSB-Proteine, Strukturproteine, Helikasen). Da His₆-TraG nicht spezifisch an den *oriT* band (Kap. 4.4), scheinen die TraG-ähnlichen Proteine, zur zweiten Kategorie von DNA-bindenden Proteinen zu gehören. Jedoch wurden keine anderen DNA-Sequenzen für die spezifische Bindung getestet, da neben dem *oriT* bisher keine weiteren spezifischen Sequenzen bekannt sind, die während des DNA-Transfers eine Rolle spielen.

(3) His₆-TraG band an die Relaxase von RP4 und His₆-TraD band an R1 TraM

His₆-TraD band an R1 TraM (Kap. 4.5), welches ein *oriT*-bindendes Protein und möglicherweise ein Bestandteil des Relaxosoms des F-ähnlichen Plasmides R1 ist. Es ist für die Konjugation essentiell, jedoch nicht für die Erzeugung des Einzelstrangbruchs an der *nic-site* des *oriT* (Frost *et al.*, 1994). TraM ist ein Protein der inneren Membran und scheint daher die *tailing*-Region des Plasmides an der Membran zu verankern (Abo *et al.*, 1991). Für F TraD wurde eine Bindung an F His₆-TraM beschrieben (Disqué-Kochem and Dreiseikelmann, 1997). Jedoch kann keine Aussage über die Spezifität der beobachteten Bindung gemacht werden, da von Disqué-Kochem und Dreiseikelmann keinerlei Kontrollexperimente dokumentiert wurden. So wurde nicht geprüft, ob F TraD an die Säulenmatrix band. Weiterhin wurde nicht getestet, ob die Bindung von F TraD an F His₆-TraM über ein *E. coli*-Protein vermittelt wurde. Dies wäre jedoch notwendig, da für den Bindungsversuch kein gereinigtes F TraD, sondern ein mit TraD angereicherter Zellextrakt verwendet wurde. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Bindung von R1 TraM an His₆-TraD spezifisch war, da R1 TraM nicht an His₆-TraG band (Kap. 4.5) und für His₆-TraD keine Bindung an die Relaxase R1 TraI beobachtet werden konnte (Kap. 4.5) Eine unspezifische Bindung von R1 TraM an die Säulenmatrix konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Kap. 4.5).

His₆-TraG band an die Relaxase RP4 TraI (Kap. 4.5). Unerwartet interagierte auch His₆-TraD im vergleichbaren Ausmaß mit RP4 TraI (Kap. 4.5), was erstaunlich ist, da eine *traG*-Deletionsmutante nur in sehr geringem Maße (Transferrate = 5×10^{-7}) mit F *traD* komplementiert werden konnte (Cabezón *et al.*, 1997). Da His₆-TraG weder an R1 TraI noch an RP4 TrbB band (Kap. 4.5), kann von einer spezifischen Wechselwirkung zwischen His₆-TraG und RP4 TraI ausgegangen werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß andere RP4-Komponenten des Relaxosoms (TraH, J, K) an His₆-TraG binden, jedoch nicht an His₆-TraD. Die Tatsache, daß die Relaxasen R1 TraI und RSF1010 MobA nicht an His₆-TraG bzw. His₆-TraD banden (Kap. 4.5), deutet ebenfalls darauf hin, daß die Relaxase wahrscheinlich nicht die Komponente des Relaxosoms ist, welche einen Komplex mit dem entsprechenden TraG-ähnlichen Protein ausbildet, der von funktioneller Bedeutung ist.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Bindungstests können nur als Vorversuche angesehen werden, da durch die Fixierung von His₆-TraG bzw. His₆-TraD an die Ni-NTA-Säule Bindungsdomänen blockiert oder aus sterischen Gründen unzugänglich gewesen sein könnten. Auch erfordert die Bindung von His₆-TraG und His₆-TraD an die Ni-NTA-Säule einen pH-Wert von 8,0. Um eine unspezifische Bindung der untersuchten Relaxasen an die Säulenmatrix unterbinden zu können, wurden Salzkonzentrationen von 200 mM verwendet. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß R1 TraI bei geringerer Salzkonzentration (50 mM) ebenfalls nicht an His₆-TraG bzw. His₆-TraD band (Kap. 4.5). Eine andere Möglichkeit, Protein-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen, ist die Glyceringradientenzentrifugation. Da jedoch His₆-TraG und His₆-TraD im Glyceringradienten ein polydisperses Verhalten zeigten (Kap. 4.3), war diese Methode nicht anwendbar. Aus Gründen der Verfügbarkeit wurde für die Bindungsversuche nicht F TraI benutzt, sondern das homologe Protein des F-ähnlichen Plasmides R1, welches in der Lage war eine F TraI-Mutation zu komplementieren (Traxler & Minkley, Jr., 1987). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß F TraI zumindest an His₆-TraD binden könnte.

(4) His₆-TraG band nicht an RP4 TrbB

Da für den Transport des DNA-Einzelstranges Energie benötigt wird, die TraG-ähnlichen Proteine jedoch kein NTP spalten können, scheinen sie selbst den DNA-Transport nicht durchzuführen. Es ist eher denkbar, daß sie den Kontakt zwischen dem DNA-Einzelstrang und der Transportpore vermitteln. Alternativ ist es auch möglich, daß die TraG-ähnlichen Proteine während des Transportvorganges mit einer NTPase interagieren. Setzt man voraus, daß der Mpf-Komplex als DNA-Transportkanal dient, dann würden im Fall von RP4 TrbB und TrbE als Interaktionspartner für TraG in Frage kommen, da diese mehrere Motive NTP-bindender Proteine besitzen (Pansegrau and Lanka, 1996). Für TrbB konnte bereits gezeigt werden, daß es dATP, GTP und ATP hydrolysierte (Kap. 4.8.1). TraG wurde in RP4-haltigen Zellen in der gleichen Membranfraktion lokalisiert (Grahm et al., 1999), wie die anderen Mpf-Komponenten, was ein erster Hinweis auf eine Interaktion von TraG mit Mpf-Komponenten ist. Jedoch waren in dieser Fraktion auch die Proteine LPase (Protein der inneren Membran) und OmpA (Protein der äußeren Membran) detektiert worden (Grahm et al., 1999). Obwohl TrbB die einzige Mpf-Komponente war, die im Cytoplasma lokalisiert wurde (Grahm et al., 1999), ist es auch ein möglicher Bindungspartner, da die TraG-ähnlichen Proteine Innermembrankomponenten sind, deren größter Teil in das Cytoplasma reicht (Grahm et al., 1999; Okamoto et al., 1991), (persönliche Mitteilung Dr. B. Traxler, University of Washington, Seattle, USA). Jedoch konnte eine Bindung von RP4 TrbB an His₆-TraG nicht beobachtet werden (Kap. 4.5). Dies ist jedoch auch nur als Vorversuch anzusehen, da die gleichen Einschränkungen, die unter Punkt (3) beschrieben wurden, auch hier gelten.

Da His₆-TraG und His₆-TraD mit Komponenten des Relaxosoms wechselwirken und keinen energieverbrauchenden Prozeß zu katalysieren scheinen, könnten die TraG-ähnlichen Proteine ein Verbindungsglied zwischen dem Relaxosom und anderen Faktoren, wie wirts- bzw. plasmidkodierten Proteinen, sein. Ein Hinweis auf die Interaktion von TraG-ähnlichen Proteinen mit *E. coli*-Proteinen ist die Tatsache, daß sich einige *E. coli*-Proteine nicht von His₆-TraG und His₆-TraD abtrennen ließen (Kap. 4.2.2), d.h. daß diese wahrscheinlich über hydrophobe oder

ionische Wechselwirkungen miteinander komplexieren. Als mögliche Bindungspartner wären zum einen wirtskodierte Proteine denkbar, welche das Ablösen des DNA-Einzelstranges katalysieren. Somit würden die TraG-ähnlichen Proteine diesen Prozeß initiieren. Versuche mit dem Plasmid RP4 haben gezeigt, daß TraH, I, J, K und TraG nicht ausreichen, um das Ablösen des DNA-Einzelstranges *in vitro* auszulösen. Dies zeigt, daß zusätzlich z.B. eine wirtskodierte Helikase benötigt wird, um diesen Prozeß beobachten zu können (Pansegrau et al., 1990a). Im Fall des F-Plasmides besitzt die Relaxase eine Helikaseaktivität. Ein Ablösen des DNA-Einzelstranges *in vitro* konnte bisher im F-System nicht beobachtet werden, jedoch wurde der Einfluß von TraD nicht getestet (Byrd & Matson, 1997).

Eine zweite Möglichkeit ist, daß die TraG-ähnlichen Proteine das Relaxosom am DNA-Transportkanal verankern. Es gibt bisher keine Hinweise, ob dieser Transportkanal wirtskodiert ist, oder ob die DNA mit Hilfe des Mpf-Systems transferiert wird. Die unspezifische DNA-Bindungsaktivität von His₆-TraG bzw. His₆-TraD könnte dazu dienen, den zu transferierenden DNA-Einzelstrang durch eine Transportpore zu leiten. Die dazu nötige Energie könnte TraG durch Kopplung mit einer NTPase oder einem Protonengradienten beziehen.

Liegen RP4 und F gleichzeitig in einer Zelle vor, so wird die RP4-Transferrate reduziert. Für diese Reduktion ist das F-kodierte *pif*(*phage inhibition by F plasmid*)C-Genprodukt verantwortlich (Miller et al., 1985), indem es die Funktion von TraG beeinflusst. Dies macht deutlich, daß die TraG-ähnlichen Proteine eine wichtige Rolle in der Konjugation spielen und deutet an, daß sie auf diesen Prozeß spezialisiert sind. Es wurde vermutet, daß PifC an die nur zu einer Hälfte vorhandenen PifC-Bindungsstelle im *traI*-Strukturgen bindet und dadurch die Expression von *traG* beeinflusst (Miller et al., 1985). Genetische Studien lassen jedoch den Schluß zu, daß PifC durch Interaktion mit TraG die RP4-Transferrate reduziert (Santini & Stanisich, 1998). Bindungsstudien mit His₆-TraG könnten zur weiteren Klärung dieses Phänomens beitragen.

Die in Zusammenarbeit mit B. Traxler (University of Washington, WA, USA) begonnene Analyse der Membrantopologie von TraG und TraD deutet an, daß die TraG-ähnlichen Proteine über zwei N-terminale Helices in der inneren Membran verankert sind und der C-terminale Bereich, der die innerhalb der TraG-ähnlichen Proteine konservierten Motive enthält, in das Cytoplasma ragt. Da die TraG-ähnlichen Proteine in ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz stark voneinander abweichen, kann angenommen werden, daß ihre enzymatischen Domänen im C-Terminus lokalisiert sind. Die gezielte Deletion der transmembranalen Helices in TraG bzw. TraD könnte jeweils zu einem Protein mit verbesserten Reinigungseigenschaften führen. Ein solches TraD-Derivat ist bereits vorhanden, welches unter physiologischen Bedingungen besser löslich war als wt-TraD. Damit könnten bereits gewonnene Erkenntnisse verifiziert und weitere biochemische Untersuchungen durchgeführt werden.

5.2 Die Rolle der Proteine der Pule-Superfamilie innerhalb der Assemblierung des Membrankomplexes

Vertreter der Pule-Superfamilie sind sowohl in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien als auch in Archaea zu finden (Abb. 1.7). In Eubakterien sind sie Bestandteil von Membrankomplexen, die an den unterschiedlichsten Prozessen wie dem Proteintransport, der Pilusassemblierung/deassemblierung und der DNA-Bindung beteiligt sind. All diesen Prozessen ist die Bildung eines Piluses (Hobbs and Mattick, 1993) bzw. eines Pseudopiluses (Pugsley, 1993) gemeinsam. Daher kann angenommen werden, daß das Pilin ein Substrat für die Vertreter der Pule-Superfamilie sein könnte. Alle Mutiproteinkomplexe, die ein Pule-ähnliches Protein besitzen, sind in der Membran lokalisiert. Zum Beispiel sind im Fall von IncP-Plasmiden 12 plasmidkodierte Proteine (TrbB - TrbL [Tra2] und TraF [Tra1]) Bestandteil des Mpf-Komplexes (Pansegrau and Lanka, 1996). Daher ist es auch denkbar, daß einzelne Komponenten des Membrankomplexes ein Substrat für die Pule-ähnlichen Proteine sind.

Im Fall von RP4 wurde TrbC als Pilusuntereinheit identifiziert (Eisenbrandt et al., 1999). Die Translationskopplung zwischen TrbB und TrbC könnte ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen TrbB und TrbC sein. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Anwesenheit der RP4-kodierten Peptidase TraF in der Zelle genügt, um vollständig prozessiertes und modifiziertes TrbC in der Zellhülle massenspektrometrisch nachweisen zu können (Eisenbrandt et al., 1999), d.h. es wird kein TrbB benötigt, um TrbC über die innere Membran zu transportieren. Da TrbB ein cytoplasmatisches Protein ist, scheint TrbB eher an dem Transport einiger Mpf-Komponenten über die innere Membran bzw. an der Assemblierung des Mpf-Komplexes beteiligt zu sein. Denkbare Substrate für TrbB wären daher TrbD, TrbE, TrbF, TrbL, TrbI und TraF, da diese kein Signalpeptid besitzen und in RP4-freien *E. coli*-Zellen im Cytoplasma- und der inneren Membranfraktion lokalisiert wurden (Grahn et al., 1999). In RP4-haltigen Zellen befanden sich alle Mpf-Komponenten in ein und derselben nicht-löslichen Fraktion, die weder der inneren noch der äußeren Membran zugeordnet werden konnte (Grahn et al., 1999). Es sind daher möglicherweise Mpf-Komponenten nötig, um diese Proteine an ihren Zielort zu transportieren. TraF ist zwar in der Lage, TrbC zu modifizieren, ohne daß es von TrbB in den Membrankomplex integriert wurde, es ist jedoch denkbar, daß TraF weitere Funktionen nur als Bestandteil des Membrankomplexes ausüben kann.

Welche Funktion könnten die Proteine der Pule-Superfamilie innerhalb der Assemblierung des Membrankomplexes spielen? Die Untersuchung von drei Vertretern dieser Proteinfamilie RP4 TrbB, R388 TrwD und HP0525 der *cag*-Region von *H. pylori* ergaben folgende Anhaltspunkte, die zur Beantwortung dieser Frage beitragen.

(1) *TrbB*, *TrwD* und *HP0525* bilden eine oligomere Ringstruktur aus

Es gibt mehrere genetische Hinweise, daß andere Vertreter der Pule-Superfamilie oligomere Strukturen ausbilden. Mutationen in Pule-ähnlichen Proteinen (Possot and Pugsley, 1994; Sandkvist et al., 1995; Turner et al., 1993; Rashkova et al., 1998; Stephens et al., 1995; Zhou and Christie, 1997) führten zu einem transdominanten Effekt. Für XcpR konnte Dimerbildung *in vivo* nachgewiesen werden, wobei die angewandte Nachweismethode die Bildung höherer Oligomere nicht ausschließt (Turner et al., 1997).

Ringförmig oligomere Strukturen von Proteinen sind in der Natur sehr häufig vertreten und besitzen die verschiedenartigsten Funktionen und Aktivitäten. Für Chaperone (z.B. GroEL), Proteasen (z.B. ClpP), replikative Helikasen (z.B. DnaB), und die F₁-ATPase wurde eine ringförmige Gestalt beschrieben (Hingorani and O'Donnell, 1998). Was sind die Vorteile einer solchen Struktur? Sie grenzt einen Hohlraum von der Umgebung ab. Somit wird ein Raum mit definierten chemischen Eigenschaften für eine katalytische Aktivität geschaffen. Der oligomere Status dieser Struktur erlaubt eine Aufeinanderfolge einer katalytischen Aktivität oder ein sich wiederholendes Binden und Dissoziieren eines Substratmoleküls. Alternativ bietet eine solche Struktur eine hohe Anzahl an aktiven Zentren auf begrenztem Raum. Dies ermöglicht eine gleichzeitige Interaktion mit dem Substrat an mehreren Stellen.

Der Innendurchmesser (30 Å) der hexameren Ringstruktur von TrbB und HP0525 gleicht dem Innendurchmesser der hexameren replikativen Helikasen DnaB und RSF1010 RepA (Hingorani and O'Donnell, 1998). Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die PuleE-ähnlichen Proteine eine Helikasefunktion ausüben, da sie keine der bekannten Helikasemotive besitzen. Außerdem ist es schwer vorstellbar, daß ein Proteintransportsystem, wie das Typ II-Sekretionssystem, eine Helikaseaktivität benötigt. Da die NTPase-Aktivität von TrbB und HP0525 nicht durch DNA stimuliert wurde (Kap. 4.8.1), ist es unwahrscheinlich, daß DNA ein Substrat für TrbB bzw. HP0525 ist. Der hohlzylindrische Komplex aus GroEL und GroES hat einen Innendurchmesser von 45 Å und eine Höhe von 184 Å (Sigler *et al.*, 1998). Somit bietet er genügend Raum für ein durchschnittlich großes Protein, dessen Faltung im Inneren des Hohlraums unterstützt wird (Sigler *et al.*, 1998). Die Höhe des TrbB- bzw. HP0525-Hexamers konnte nicht bestimmt werden, da eine Seitenansicht im Elektronenmikroskop nicht detektiert werden konnte (Kap. 4.9.4). Der Innendurchmesser des ringförmigen TrbB- bzw. HP0525-Hexamers umfaßte nur 30 Å (Kap. 4.9.4). Es ist daher unwahrscheinlich, daß TrbB₆ und HP0525₆ das gesamte Substratmolekül umschließen, falls es ein Protein ist.

Interessanterweise gibt es strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen TrbB und Clp(*caseino-lytic protease*)-ATPasen (ClpA, ClpX). Dies sind Chaperone, welche zuerst in *E. coli*-Proteosomen, wo sie das zu spaltende Protein entfalten und dem katalytischen Zentrum der Protease (ClpP) zuführen, entdeckt wurden (Gottesman and Maurizi, 1992). Sie gehören zu den Hsp100-Chaperonen, die sich von anderen Chaperonen durch die Fähigkeit Protein-Aggregate aufzulösen, unterscheiden (Cowan and Schirmer, 1994). So induziert ClpA die DNA-Bindungsaktivität von P1 RepA, indem es die inaktiven RepA-Dimere in aktive RepA-Monomere zerlegt (Pak and Wickner, 1997). ClpA und ClpX bilden wie TrbB hexamere Ringe aus, die durch ATP bzw. seine nicht-spaltbaren Derivate stabilisiert werden (Maurizi *et al.*, 1998). Diese hexameren Ringe waren in allen Fällen im Elektronenmikroskop, nur in der Aufsicht, jedoch nicht von der Seite zu beobachten (Grimaud *et al.*, 1998). TrbB₆ und ClpA₆ besitzen einen ähnlichen Formfaktor von 1,46 bzw. 1,4 (Maurizi *et al.*, 1998). Genau wie TrbB hatte auch ClpX in Abwesenheit von Nukleotiden ein natives Molekulargewicht, das einem Tetramer entspricht. Doch auch bei ClpX waren unter diesen Bedingungen im Elektronenmikroskop keine definierten Strukturen zu beobachten (Grimaud *et al.*, 1998).

(2) Die TrbB- und HP0525-Hexamere besitzen zwei chemisch verschiedene Seiten

Es ist vorstellbar, daß eine dieser Seiten mit der inneren Membran assoziiert ist und die andere Seite ins Cytoplasma zeigt. Einen Hinweis darauf liefert die Interaktion von TrbB und HP0525 mit Phospholipiden (Pansegrau et al., 1999). Die Assoziation mit der inneren Membran scheint auch von enzymatischer Bedeutung zu sein, da die dATPase-Aktivität von TrbB und HP0525 durch Phospholipide stimuliert werden konnte (Pansegrau et al., 1999). Für die dATPase-Aktivität von TrbB konnte diese Stimulation nur bei pH 7,5 und nicht bei dem für die Aktivität optimalen pH-Wert von 9,5 beobachtet werden (Pansegrau et al., 1999). Auch für GST(226-230)-TrwD wurde eine Stimulation der ATPase-Aktivität durch Phospholipide beschrieben (Rivas et al., 1997).

(3) TrbB, TrwD und HP0525 hydrolysieren Nukleotide

Studien mit TrbB-Mutanten zeigten, daß der Verlust bzw. die Reduktion der NTPase-Aktivität der Mutantenproteine mit der DNA-Transferfrequenz der entsprechenden Mutante korrelierte (Kap. 4.10.2). Das heißt, die NTPase-Aktivität von TrbB ist für seine Funktion *in vivo* notwendig. Somit scheinen die Pule-ähnlichen Proteine einen energieverbrauchenden Prozeß zu katalysieren oder an einem solchen Prozeß beteiligt zu sein. Auch für die anderen Mitglieder der Pule-Superfamilie wird eine ATPase-Aktivität postuliert. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, weitere Vertreter dieser Familie in ihrer nativen Form zu reinigen, um eine solche Aktivität nachweisen zu können. Die Reinigung mit Hilfe einer Modifikation bzw. durch Denaturierung führte zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen. So wurde für Ti VirB11, welches unter denaturierenden Bedingungen aus der Zelle gelöst wurde, eine ATPase-Aktivität beschrieben (Christie et al., 1989), welche jedoch nicht für das Fusionsprotein MBP-VirB11 bestätigt werden konnte (Stephens et al., 1995). Auch bei C-terminal modifiziertem EspE-His₆ aus *V. cholerae* konnte keine Hydrolyse von ATP gemessen werden (Sandkvist et al., 1995). Ein Lösen von TrbB unter denaturierenden Bedingungen aus der Zelle und anschließende Renaturierung hatte nur eine geringe Auswirkung auf seine NTPase-Aktivität und beeinträchtigte nicht die Ausbildung der hexameren Ringstruktur.

Da die NTPase-Aktivität von TrbB und HP0525 nicht durch DNA stimuliert wurde (Kap. 4.8.1), scheint es sich nicht um eine Helikase zu handeln. Die geringe NTPase-Aktivität der drei untersuchten Proteine ist mit den beschriebenen NTPase-Aktivitäten von Chaperonen vergleichbar (Zylicz et al., 1983; Maurizi et al., 1998; Sigler et al., 1998). Die Stimulierbarkeit der NTPase-Aktivität von TrbB, TrwD bzw. HP0525 durch kurze Peptide oder denaturierte Proteine könnte einen Hinweis auf eine funktionelle Gemeinsamkeit zwischen den Pule-ähnlichen Proteinen und Chaperonen geben. Da jedoch nicht jedes denaturierte Protein ein Substrat für ein bestimmtes Chaperon ist, und das Ausmaß der Stimulation der ATPase-Aktivität demzufolge von der Aminosäuresequenz des Peptides bzw. Proteins abhängt (Sigler et al., 1998; Skowrya et al., 1990; Liberek et al., 1991; Richarme and Kohiyama, 1993; Richarme and Kohiyama, 1993; Wawrzynow et al., 1995), ist es notwendig, das Substrat der Pule-ähnlichen Proteine zu kennen, um solch einen Test entwickeln zu können. Bisher gibt es jedoch weder für TrbB noch für TrwD und HP0525 einen Hinweis darauf, welche Aminosäuresequenz oder welches Protein stimulierend auf ihre NTPase-Aktivität wirken könnte.

Die strukturellen und enzymatischen Gemeinsamkeiten von TrbB und Chaperonen läßt vermuten, daß TrbB eine Mpf-Komponente bindet und somit einem Prozeß/Reaktion zugänglich macht. Es ist denkbar, daß TrbB Mpf-Komponenten entfaltet, damit diese über die innere Membran transportiert werden können. Die partielle Entfaltung von Mpf-Komponenten ermöglicht vielleicht die Bindung an andere Mpf-Bestandteile, um in den Membrankomplex integriert zu werden.

Welche Bestandteile des Mpf-Systems ein Substrat für TrbB sein könnten, ist mit biochemischen Methoden schwer zu analysieren, da es sich ausschließlich um unlösliche Membranproteine handelt. Eine genetische Möglichkeit bietet eine kürzlich entwickelte Methode, die sich dem *yeast two hybrid system* zu Grunde liegenden Prinzip bedient. (Karimova *et al.*, 1998). Da diese Methode einen bakteriellen Transduktionsweg ausnutzt, ist sie in Prokaryonten anwendbar und für bakterielle Enzyme besser geeignet als das *yeast two hybrid system*. Ein weiterer Vorteil ist die örtliche Entkopplung der Protein-Protein-Wechselwirkung von der signalgebenden Reaktion, was das Einbinden von Membranproteinen in den Test ermöglicht.