

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

TraG/VirD4-ähnliche Proteine sind essentielle Komponenten bakterieller Typ IV Sekretionssysteme. Ihre Funktion besteht wahrscheinlich im Transport definierter Substrate durch die innere Membran. Die für dafür benötigte Energie wird möglicherweise durch Nukleotid-Hydrolyse gewonnen, denn TraG/VirD4-ähnliche Proteine wurden aufgrund von Sequenzmotiven als potentielle Nukleotid-Hydrolasen (NTPasen) identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden vier Vertreter der Familie der TraG/VirD4-ähnlichen Proteine biochemisch charakterisiert und zum Teil genetisch analysiert: TraG (RP4), TrwB (R388), TraD (F) und HP0524 (*H. pylori*). Diese Proteine besaßen eine sequenzunspezifische DNA-Bindungsaffinität und hatten eine ausgeprägte Tendenz zur Oligomerisierung. Entgegen der Vorhersage konnte keine NTPase Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden. Es wurde jedoch gezeigt, daß ATP durch TraG gebunden wurde, so wie es schon für TrwB beschrieben worden ist. Zusätzlich zur ATP-Bindung konnte eine ADP-Bindung nachgewiesen werden. Andere Nukleotide (GTP, CTP, UTP, dTTP) wurden als Kompetitoren zu ATP ebenfalls gebunden. DNA- und Nukleotid-Bindung waren miteinander konkurrierende Aktivitäten, die beide durch  $Mg^{2+}$  inhibiert wurden. Mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR) -Technologie wurde gezeigt, daß TraG mit dem für die Sekretion essentiellen Protein TraI interagiert. Dies war der erste direkte Beweis für solch eine Interaktion. Eine Topologieanalyse von TraG ergab, daß TraG einen Membrananker nahe dem N-Terminus besitzt. Durch Insertions-Mutagenese wurden funktional essentielle Domänen von TraG identifiziert. Nach Sequenzvergleich mit TrwB, dessen Kristallstruktur bekannt ist, konnten die so identifizierten Domänen den strukturellen Determinanten des Proteins zugeordnet werden. Deletions- und Punktmutanten von TraG und TrwB wurden gereinigt und charakterisiert. Dadurch wurde gezeigt, daß die cytoplasmatische Domäne auch ohne Membrananker sowohl an DNA, als auch an Nukleotide bindet. Hingegen gingen die Fähigkeit zur Oligomerisierung und zur Interaktion mit TraI verloren. Letzteres ließ vermuten, daß die Oligomerisierung Voraussetzung für die Bindung an TraI ist. Punktmutation im konservierten Walker A Sequenzmotif (*P-loop*) von TraG hatte eine signifikante Abschwächung der Nukleotidbindung zur Folge, die TraI- und DNA-Bindungsaffinitäten blieben hingegen unverändert. In dieser Arbeit konnten die verschiedenen Aktivitäten von TraG und TrwB strukturell und funktionell voneinander getrennt werden. Die vergleichende Analyse verschiedener Vertreter der VirD4/TraG-ähnlichen Proteine leistete einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Funktion dieser Schlüsselkomponente der Typ IV Sekretion.