

1. EINLEITUNG

1.1 Bakterielle Konjugation

Die Übertragung genetischer Information von einer bakteriellen Donorzelle auf einen Rezipienten unter physikalisch stabilem Zell-Zell-Kontakt wird als bakterielle Konjugation bezeichnet. Lederberg & Tatum (1946) haben diesen Vorgang erstmalig bei *Escherichia coli* K12 beschrieben. Der F-(*fertility*)-Faktor, ein extrachromosomales, ringförmiges DNA-Molekül (Plasmid), wurde später als Verursacher dieses Phänomens identifiziert (Cavalli-Sforza *et al.*, 1953; Hayes, 1953). Seitdem wurden außer dem F-Plasmid eine große Anzahl anderer konjugativer Plasmide und konjugativer Transposons in Bakterien beschrieben (Datta, 1985; Datta *et al.*, 1971; Watanabe, 1963; Franke & Clewell, 1981; Clewell & Gawron-Burke, 1986; Salyers *et al.*, 1995). Konjugation scheint jedoch nicht auf Bakterien beschränkt zu sein, da kürzlich das erste konjugative Plasmid in einem Archaeon entdeckt wurde (She *et al.*, 1998).

Das Modell für den Verlauf der bakteriellen Konjugation in Gram-negativen Zellen beruht zum größten Teil auf Erkenntnissen, denen Beobachtungen am F-Faktor zu Grunde liegen. Da jedoch die DNA-Transfersysteme der IncF-Plasmide F, R1, R100, der IncP-Plasmide RP4 und R751, der IncI-Plasmide Collb, R144, R64, des IncN-Plasmides pKM101 und des IncW-Plasmides R388 große Ähnlichkeiten in der Genorganisation und der Sequenz der essentiellen Transferkomponenten aufweisen (Abb. 1.6) (Lessl & Lanka, 1994), kann dieses Modell als allgemein gültig angesehen werden. Im ersten Schritt bildet die Donorzelle, welche das konjugative Plasmid enthält, den physikalischen Zellkontakt mit dem plasmidfreiem Rezipienten aus (Willetts, 1981). Als Vermittler wird ein extrazelluläres Filament, der konjugative Pilus, angesehen (Willetts & Skurray, 1987). Die plasmidkodierte Proteine, die für die Ausbildung konjugativer Pili essentiell sind, werden dem *mating pair formation* (Mpf)-System zugeordnet.

Wahrscheinlich geht von der Kontaktaufnahme ein *trigger*-Signal aus, welches das plasmidkodierte *DNA transfer and replication* (Dtr)-System veranlaßt, den zu transferierenden Einzelstrang nach dem *rolling circle*-Prinzip abzulösen (Willetts, 1981). Der Transfer des DNA-Einzelstranges erfolgt in 5'-3'-Richtung. Wie und durch welchen Kanal der erzeugte Einzelstrang die insgesamt vier Zellmembranen und zwei Peptidoglycanschichten des Donors und des Rezipienten passiert, ist bislang ungeklärt.

Die Komplementärstrangsynthese des in den Rezipienten transferierten Einzelstranges erfolgt nach dem *lagging strand*-Mechanismus für die DNA-Replikation. Am Ende des konjugativen Transfers liegen zwei Zellen vor, die das negativ superhelikale Plasmid enthalten und somit als Donorzellen fungieren können (Abb. 1.1).

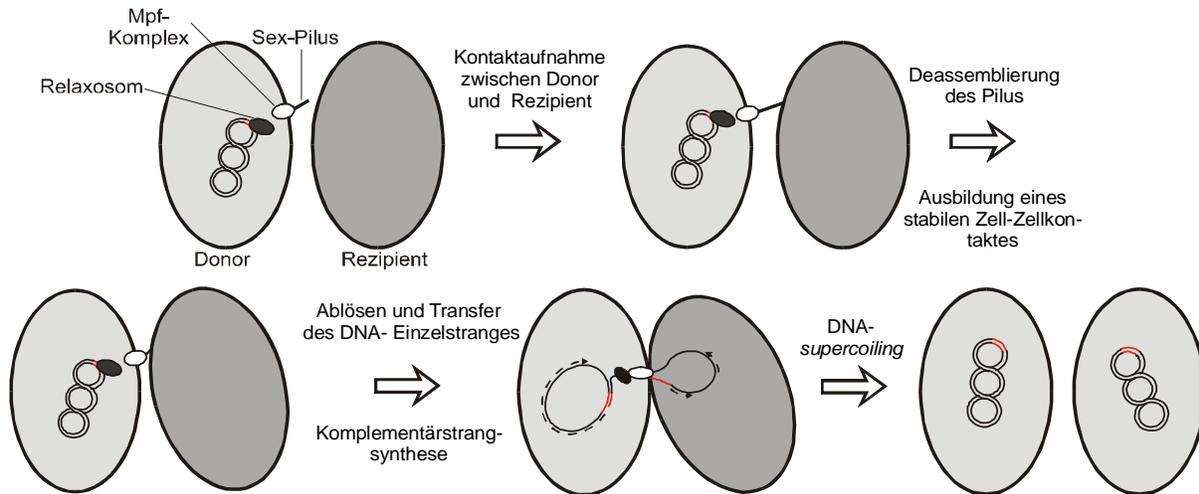


Abb. 1.1 Modell des konjugativen DNA-Transfers. Ausführliche Erläuterungen im Text.

1.2 Das promiskuitive IncP α -Plasmid RP4

Das konjugative IncP α -Plasmid RP4 verleiht seinem Wirt Resistenzen gegen die Antibiotika Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin (Abb. 1.2). Außerdem kodiert es für eine induzierbare Resistenz gegen Tellurite. Es wurde erstmals Ende der sechziger Jahre aus hospitalisierten *Pseudomonas*-Stämmen isoliert (Lowbury *et al.*, 1969; Datta *et al.*, 1971; Chandler & Krishnapillai, 1974; Fulbrook *et al.*, 1970). Die Nukleotidsequenzen von RP4 und des eng verwandten IncP β -Plasmides R751 sind vollständig bekannt (Pansegrau *et al.*, 1994; Thorsted *et al.*, 1998). RP4 besteht aus 60.099 bp und tritt in einer Kopiezahl von 4 - 8 pro *E. coli* Chromosomenäquivalent auf (Guiney & Lanka, 1989).

IncP-Plasmide weisen einen sehr weiten Wirtsbereich auf. Sie können in fast alle Gram-negative Bakterien transferiert werden und sich dort autonom durch Replikation vermehren. Ihr Transfersystem ermöglicht ihnen darüber hinaus eine DNA-Übertragung in Spezies, die nicht zu ihrem vegetativen Wirtsbereich gehören. Dazu zählen die Gram-negative Familie *Bacteroides* (Guiney *et al.*, 1984), verschiedene Gram-positive Bakterien (Trieu-Cuot *et al.*, 1987; Mazodier *et al.*, 1989), Streptomycceten (Mazodier *et al.*, 1989) und verschiedene Hefen, wie z.B. *Saccharomyces* (Heinemann & Sprague, Jr., 1989). Eine vegetative Replikation der IncP-Plasmide ist hier nur unter der Voraussetzung möglich, daß die transferierte DNA in das Wirtschromosom integriert wird.

Die Strukturgene der Transferkomponenten von RP4 befinden sich in zwei getrennten Regionen, Tra1 und Tra2. Die Tra1-Region kodiert hauptsächlich Funktionen, die an der DNA-Prozessierung beteiligt sind und daher dem Dtr-System zugeordnet werden. Die Genprodukte der Tra2-Region sind an der Ausbildung des Zell-Zell-Kontaktes beteiligt. Die essentiellen Anteile der Transferregionen für die DNA-Übertragung innerhalb von *E. coli*, die Kernregionen, wurden mittels Mutagenese ermittelt und umfassen 19 Gene zuzüglich des *oriT* (*origin of transfer*)

(Lessl *et al.*, 1992; Lessl *et al.*, 1993). Mindestens vier Genprodukte der Tra1-Region (TraH - TraK) und der *oriT* bilden zusammen das Relaxosom. Die Genprodukte TraL und TraM sind für den DNA-Transfer nicht essentiell. Die Transferfrequenz wird bei ihrer Abwesenheit jedoch um das 200-fache gesenkt (Lessl *et al.*, 1993). 11 Genprodukte der Tra2-Region (TrbB - TrbL) und TraF der Tra1-Region bilden zusammen das Mpf-System und sind mit Ausnahme von TrbK für die Pilussynthese in *E. coli* essentiell (Lessl *et al.*, 1992). TraG der Tra1-Kernregion ist für die Konjugation essentiell, kann bisher jedoch weder dem Relaxosom noch den Mpf-System zugeordnet werden.

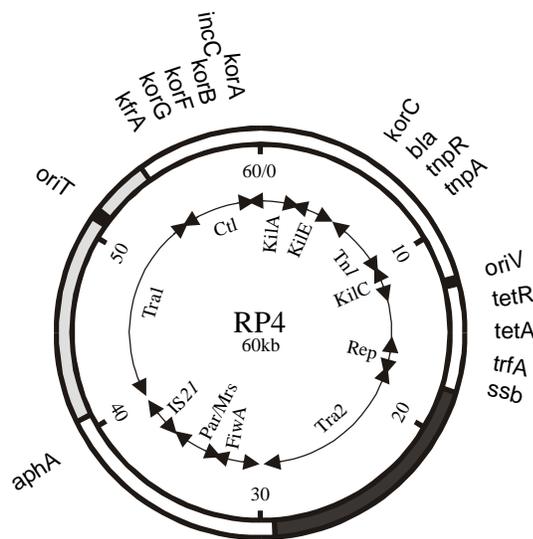


Abb. 1.2 Genetische und physikalische Karte des IncP α -Plasmids RP4. Die verschiedenen funktionellen Regionen sind jeweils durch Pfeile im Inneren der Karte markiert. Die Antibiotikaresistenzgene sind mit *bla* (β -Lactamase; Ampicillinresistenz), *aphA* (Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase, Kanamycinresistenz) sowie *tetA* und *tetR* (Tetracyclinresistenz-Determinante und Tetracyclinrepressor) bezeichnet. Der vegetative Replikationsursprung *oriV* und der Transferursprung *oriT* sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Die Transferregion Tra1 ist als hellgrauer Balken und die Transferregion Tra2 als dunkelgrauer Balken dargestellt. Weitere genetische Loci sind: *kil*, für den Wirt letale bzw. für die Erhaltung des Plasmids störende Funktionen; *kor*, supprimiert *kil*-Effekte; *trfA*, kodiert für zwei Replikationsproteine, eines davon ist essentiell; *Rep*, an der Replikation beteiligte Region; *kfrA*, ein von *korF* reguliertes Gen; *fiwA*, hemmt den Transfer von IncW-Plasmiden; *Par* ist eine an der Partitionierung und damit an der stabilen Vererbung des Plasmids beteiligte Region; *ssb*, kodiert für ein Einzelstrang-bindendes Protein; *tnpA* und *tnpR*, kodieren Transposase und Transposase-Repressor.

Die RP4-Tra1-Region besteht aus drei Operons, dem Primase-, dem Relaxase- und dem *leader*-Operon (Ziegelin *et al.*, 1991). Der *oriT* befindet sich in einer Intergenregion zwischen den Promotoren des Relaxase- und des *leader*-Operons, von denen aus die Transkription in entgegengesetzter Richtung erfolgt. Das *leader*-Operon kodiert für TraK-TraM. Das Relaxase-Operon beinhaltet die Strukturgene *traH-J*. Die Transkription, ausgehend vom Promoter P_{traJ} , geht jedoch möglicherweise in das Primase-Operon hinein, welches für TraA-TraG kodiert (Abb. 1.3). Der P_{traG} -Promotor ermöglicht eine von dem P_{traJ} -Promotor unabhängige Transkription der Gene der Tra1-Region, die nicht an der Ausbildung des Relaxosoms beteiligt sind.

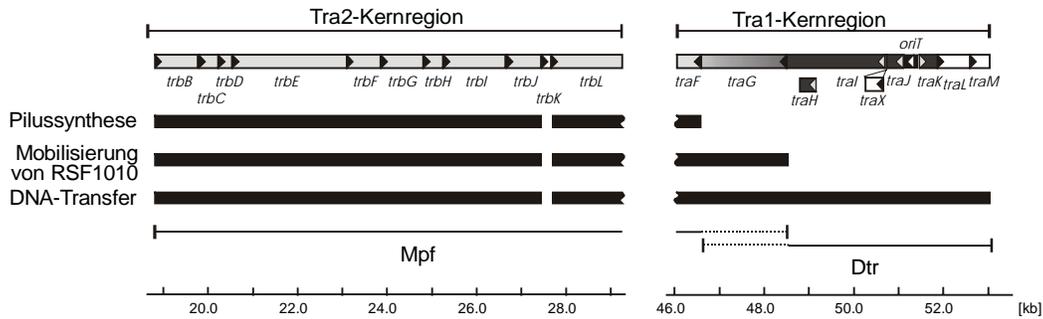


Abb. 1.3 Funktionelle Einteilung der DNA-Transferfunktionen des IncP α -Plasmides RP4. Die physikalische und genetische Karte der RP4-Transferkernregionen mit den RP4-Koordinaten 18,8-30,0 kb (Tra2-Kernregion) und 45,8-53,0 kb (Tra1-Kernregion) sind im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Genstarts sind durch Pfeile markiert. Die Gene der Tra2-Region werden mit *trb*, die der Tra1-Region mit *tra* bezeichnet. Essentielle Funktionen des Mpf-Systems sind hellgrau und des Dtr-Systems sind dunkelgrau dargestellt. Weiße Kästen zeigen nicht-essentielle Funktionen an. Die schwarzen Balken kennzeichnen Bereiche, die für die Ausprägung der jeweiligen links aufgeführten Phänotypen erforderlich sind. Die Zahlenskala gibt die Koordinaten innerhalb von RP4 an.

Die Tra2-Region besteht aus einem einzigen Operon, welches 19 Strukturgene (*trbA-trbP*, *upf13.7*, *fiwA*, *upf32.8*) enthält. Die Transkription des Operons kann an den beiden möglichen Promotoren P_{trbA} und P_{trbB} beginnen (Lessl *et al.*, 1992; Thomson *et al.*, 1993). Somit kodiert *traF* der Tra1-Region für die einzige Mpf-Komponente, die getrennt von den anderen Mpf-Komponenten exprimiert wird. TrbA fungiert als Repressor für alle Promotoren der Tra1- und der Tra2-Region mit Ausnahme von P_{trbA} und koordiniert somit wahrscheinlich die Expression der Gene des Mpf- und des Dtr-Systems (Zatyka *et al.*, 1994; Lessl *et al.*, 1992).

1.3 Der konjugative DNA-Transfer des Plasmides RP4

Der konjugative DNA-Transfer von RP4 läuft in mehreren Teilschritten ab (Abb. 1.4). Teilschritte, für die die Anwesenheit des Rezipienten nicht notwendig ist, ließen sich experimentell entkoppeln und wurden unabhängig voneinander charakterisiert.

TrbC ist das Präpropilin, welches dreifach prozessiert wird. Als erstes spaltet ein unbekanntes wirtskodiertes Enzym am C-terminalen Ende 27 Aminosäuren ab. Eine wirtskodierte Signalpeptidase, wahrscheinlich LepB, spaltet im darauf folgenden Schritt ein 36 Aminosäuren umfassendes N-terminales Signalpeptid ab. Im letzten Schritt werden in einer von RP4 TraF konzertiert katalysierten Reaktion vier weitere Aminosäuren am C-Terminus entfernt und das N-terminale mit dem C-terminalen Ende zu einem Ring verknüpft (Haase & Lanka, 1997; Eisenbrandt *et al.*, 1999). Das so entstandene ringförmige Pilin ist eine Untereinheit des Sex-Piluses. Die Anwesenheit von *trbC* und *traF* in der Zelle ist ausreichend, um das zyklische Pilin an der äußeren Zelloberfläche massenspektrometrisch nachweisen zu können, d.h. sein Transport an die Zelloberfläche läuft unabhängig von den anderen Genprodukten des Mpf-Systemes ab. Wahrscheinlich ist dieser Vorgang *sec(general secretion pathway)*-abhängig.

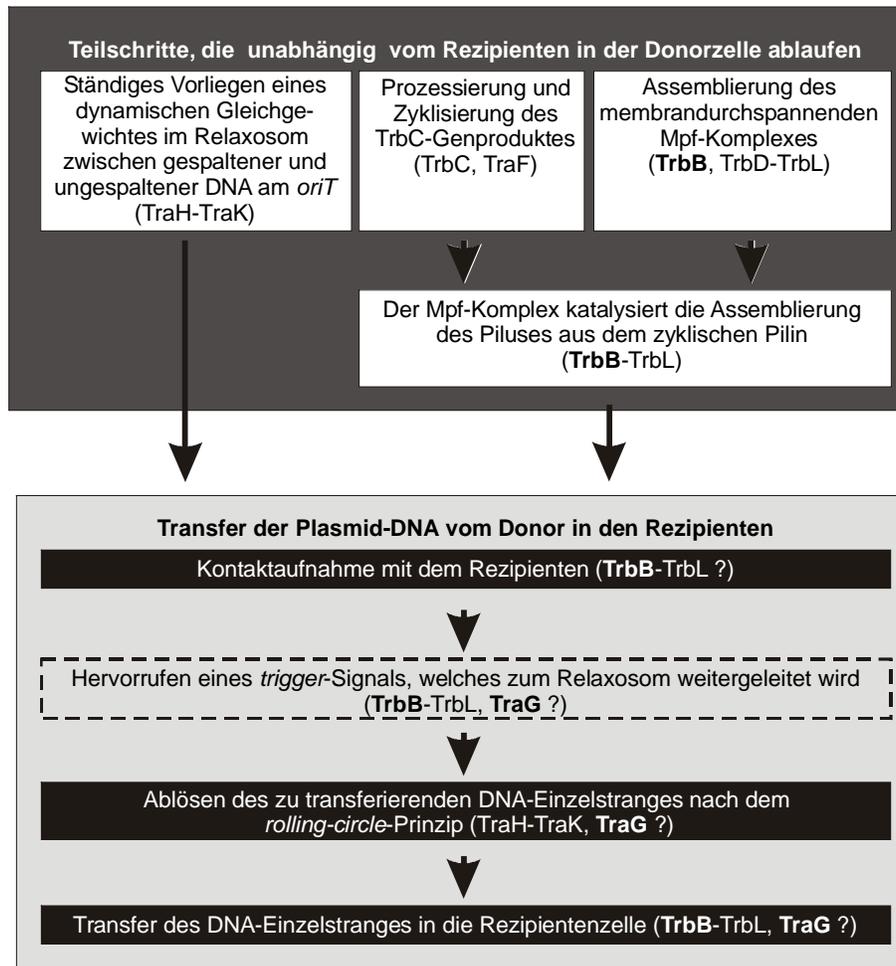


Abb. 1.4 Fließschema über den Ablauf der Konjugation von RP4. Die zeitliche Abfolge der einzelnen Teilschritte der Konjugation ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die im dunkelgrauen Kasten gezeigten Teilschritte laufen unabhängig vom Rezipienten ab, wohingegen für die im hellgrauen Kasten gezeigten Teilschritte der Kontakt zum Rezipienten erforderlich ist. Weiße Kästen: Teilschritte, die sich experimentell voneinander entkoppeln lassen; schwarze Kästen: für die Konjugation postulierte Teilschritte, die experimentell noch nicht charakterisiert wurden; Kasten, der mit einer gestrichelten Linie begrenzt ist: hypothetischer Teilschritt. Die in Klammern aufgeführten Proteine sind plasmidkodierte, essentielle Funktionen für den jeweiligen Teilschritt. Ein Fragezeichen hinter den Proteinen deutet an, daß es sich dabei um eine Vermutung handelt. Fettgedruckte Proteine sind Gegenstand dieser Arbeit.

Die restlichen 10 Proteine des Mpf-Komplexes (TrbB, TrbD-TrbL) bilden wahrscheinlich eine membrandurchspannende Pore in der Zellhülle Gram-negativer Bakterien aus. Dies läßt sich auf Grund von Lokalisierungsexperimenten vermuten, welche zeigten, daß sich all diese Proteine mit Ausnahme von TrbB in ein und derselben Membranfraktion befanden (Grahn *et al.*, 1999). Für TrbG, TrbH, TrbK (Grahn *et al.*, 1999) und TrbJ (Lessl *et al.*, 1993) konnte eine N-terminale Prozessierung durch wirtskodierte Signalpeptidasen nachgewiesen werden, was andeutet, daß diese Proteine unabhängig von anderen Mpf-Komponenten in das Periplasma exportiert werden. Mit Ausnahme von TrbK, welches die *entry exclusion*-Funktion ausübt (Haase *et al.*, 1996), sind alle anderen Proteine des Membrankomplexes für die Ausbildung des Piluses essentiell. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß neun Komponenten des Mpf-Komplexes das zyklische Pilin,

welches sich an der Zelloberfläche befindet, zum funktionellen Pilus assemblieren. Die jeweilige Rolle der neun Proteine während der Pilusassemblierung ist bisher unbekannt.

Während des gesamten Zellzyklus ist das Relaxosom am *oriT* von RP4 ausgebildet (Pansegrau & Lanka, 1996a). Vier Proteine dieses Komplexes (TraH-TraK) sind für die Konjugation essentiell. TraJ und TraK sind *oriT*-bindende Proteine, welche die Bindung der Relaxase TraI an die *nic*-Region des *oriT* ermöglichen. Dieser Nukleoprotein-Komplex wird durch TraH stabilisiert (Pansegrau *et al.*, 1990; Pansegrau *et al.*, 1988; Ziegelin *et al.*, 1989; Fürste *et al.*, 1989; Cole *et al.*, 1993). Die Relaxase (TraI) spaltet in der *nic*-Region des *oriT* orts- und strangspezifisch in einer Transesterifizierung eine Phosphodiester-Bindung. Die katalytisch aktive Aminosäure Tyrosin-22 bleibt kovalent am 5'-Ende des gespaltenen DNA-Stranges gebunden (Pansegrau *et al.*, 1990; Pansegrau *et al.*, 1993). Auf Grund der *cleaving-joining*-Reaktion der Relaxase befindet sich die DNA in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen superhelikaler und relaxierter DNA, die einen Einzelstrangbruch im *oriT* aufweist (Pansegrau & Lanka, 1996b; Pansegrau *et al.*, 1993). *In vivo*-Experimente haben gezeigt, daß TraH-TraK die Relaxation der Plasmid-DNA katalysieren, jedoch nicht die Freisetzung des DNA-Einzelstranges (Pansegrau *et al.*, 1990). Erst der Kontakt des Donors mit dem Rezipienten führt wahrscheinlich zum Ablösen des Einzelstranges vom Plasmid.

Es wird vermutet, daß von dem Kontakt ein *trigger*-Signal ausgeht, welches zum Relaxosom gelangt und dort das Ablösen des zu transferierenden Einzelstranges nach dem *rolling-circle*-Prinzip bewirkt. Da TraG weder dem Relaxosom noch dem Mpf-Komplex zugeordnet werden kann (Lessl *et al.*, 1993; Haase *et al.*, 1995), jedoch für die Konjugation essentiell ist, ist es denkbar, daß TraG am Ablösen des DNA-Einzelstranges beteiligt ist.

Bisher gibt es noch keine experimentellen Hinweise darauf, über welche Transportpore der erzeugte DNA-Einzelstrang in den Rezipienten transportiert wird. Eine Vermutung ist, daß die DNA die Zellhülle mit Hilfe des Mpf-Komplexes passiert. Eine konträre Annahme dazu wäre, daß die DNA einen ganz anderen Transportweg benutzt und das Mpf-System ausschließlich für die Assemblierung des Piluses verantwortlich ist. Weiterhin ist ungeklärt, ob der DNA-Einzelstrang während des Transfers nackt oder als DNA-Protein-Komplex vorliegt. Es wurde beobachtet, daß die Primase TraC, vermutlich als ssDNA-Protein-Komplex, während der Konjugation in das Cytoplasma des Rezipienten transportiert wurde (Rees & Wilkins, 1990). Für den T-DNA-Transfer in *Agrobacterium tumefaciens*, welcher Ähnlichkeiten zur Konjugation von RP4 aufweist, konnte gezeigt werden, daß die T-DNA vom SSB-Protein VirE2 ummantelt wird (Citovsky *et al.*, 1997). Dies scheint jedoch erst in der Pflanzenzelle zu erfolgen, da VirE2 und die T(*transferred*)-DNA unabhängig voneinander transportiert werden können (Stahl & Binns, 1998). Ein Schlüssel zur Aufklärung des Transportkanals könnten wiederum die TraG-ähnlichen Proteine sein. Es ist auch denkbar, daß die TraG-ähnlichen Proteine direkt am Transport des DNA-Einzelstranges beteiligt sind. Interaktionsstudien von TraG mit DNA und Tra(**T**ransfer)-Komponenten könnten Klärung in diese Fragen bringen.

1.3.1 Die Rolle von TraG-ähnlichen Proteinen in der Konjugation

TraG-ähnliche Proteine, benannt nach dem Vertreter des Plasmides RP4 (Lessl *et al.*, 1992), werden fast ausschließlich von konjugativen Plasmiden kodiert. Innerhalb der *cag(cancer associated region)*-Region von *Helicobacter pylori* (Tomb *et al.*, 1997) und der Genome von *Rickettsia prowazekii* (Andersson *et al.*, 1998) und *Legionella pneumophila* (Vogel *et al.*, 1998) konnte jeweils ein Gen identifiziert werden, dessen Produkt auf Grund seiner Primärstruktur den TraG-ähnlichen Proteinen zugeordnet wird (Abb. 4.1). Es ist anzunehmen, daß diese Proteine Bestandteil eines DNA-Transfersystems sind. Für *L. pneumophila* konnte gezeigt werden, daß sein *dot(defective for organelle trafficking)*-kodiertes Transfersystem das nicht-konjugative IncQ-Plasmid RSF1010 mobilisierte (Vogel *et al.*, 1998).

Die TraG-ähnlichen Proteine sind für den DNA-Transfer essentiell, werden jedoch weder für die Ausbildung des Piluses benötigt, noch sind sie an der Erzeugung des Einzelstrangbruchs am *oriT* beteiligt (Lessl *et al.*, 1993; Haase *et al.*, 1995). Daher sind drei mögliche Funktionen der TraG-ähnlichen Proteine während der Konjugation denkbar: (i) sie sind am Ablösen des zu transferierenden DNA-Einzelstranges von der Plasmid-DNA beteiligt, (ii) sie wirken direkt am DNA-Transportvorgang vom Donor in den Rezipienten mit, (iii) sie lösen als Signalprotein den DNA-Transfer aus, indem sie das postulierte *trigger*-Signal, welches einen stabilen Kontakt zu einem Rezipienten anzeigt, zum Relaxosom leiten.

Einen ersten Einblick in die Rolle der TraG-ähnlichen Proteine während der Konjugation geben Untersuchungen über den Transfer nicht-konjugativer aber mobilisierbarer Plasmide. Diese Plasmide kodieren die notwendigen Komponenten, die den Einzelstrangbruch am *oriT* katalysieren. Für ihre Mobilisierung rekrutieren sie ein Mpf-System und ein TraG-ähnliches Protein eines konjugativen Helferplasmides. Dabei sind nicht-konjugative Plasmide promiskuitiv, da sie für ihre Mobilisierung verschiedene Helferplasmide nutzen können. Darüber hinaus ist es nicht zwingend notwendig, daß das TraG-ähnliche Protein und das Mpf-System von ein und demselben Helferplasmid kodiert werden (Cabezón *et al.*, 1994; Cabezón *et al.*, 1997). Das heißt, die Mobilisierung nicht-konjugativer Plasmide wird durch drei Faktoren beeinflusst: dem Relaxosom, dem Mpf-System und dem TraG-ähnlichen Protein. Cabezón *et al.* (1997) haben gezeigt, daß das Beibehalten von zwei dieser Faktoren und das Austauschen des jeweils dritten Faktors immer zu unterschiedlichen Transferfrequenzen führte. So wurde z.B. RSF1010 mit unterschiedlicher Frequenz mobilisiert, wenn die Zelle neben RP4 TraG das Mpf-System von RP4 (IncP) oder F (IncF) oder R388 (IncW) enthielt. Die einzige Schlußfolgerung, die aus den Experimenten von Cabezón *et al.* gezogen werden kann, ist, daß alle drei Faktoren direkt oder indirekt miteinander wechselwirken. Es ist jedoch nicht klar, ob der Mpf-Komplex die DNA-Transportpore darstellt oder ob die DNA einen anderen Transportweg in den Rezipienten benutzt (Abb. 1.5). Wenn angenommen wird, daß das Mpf-System nicht die Transportpore für die DNA bildet, ist die Interaktion zwischen dem Mpf-Komplex und den TraG-ähnlichen Proteinen nicht zwingend notwendig.

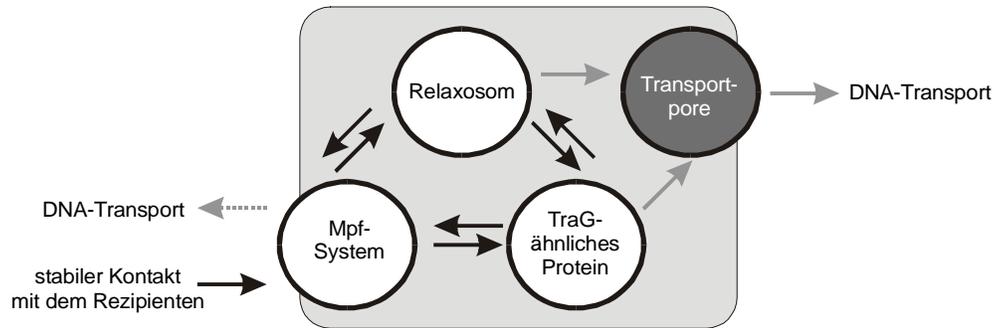


Abb. 1.5 Die Rolle der TraG-ähnlichen Proteine. Der graue Kasten stellt die Donorzelle dar. Die weißen Kreise repräsentieren die drei Faktoren, die die Mobilisierung nicht-konjugativer Plasmide beeinflussen: Relaxosom, Mpf-System und TraG-ähnliches Protein. Die Doppelpfeile zwischen den weißen Kreisen, zeigen die möglichen Wechselwirkungen zwischen den drei Faktoren an. Es gibt zwei denkbare Transportwege für die DNA vom Donor in den Rezipienten: (i) über das Mpf-System (grauer, unterbrochener Pfeil) oder (ii) über eine zelleigene Pore, die als grauer Kreis dargestellt ist (graue Pfeile). Der einzelne schwarze Pfeil zeigt an, daß der stabile Zellkontakt zum Rezipienten durch das Mpf-System etabliert wird.

Bisher wurde über zwei Hinweise auf die Interaktion von TraG-ähnlichen Proteinen mit Komponenten des Relaxosoms berichtet. (i) Das TraG-ähnliche F TraD band an ssDNA-Agarose bzw. ds-DNA-Agarose, was andeutet, daß F TraD unspezifisch sowohl dsDNA als auch ssDNA bindet (Panicker & Minkley, Jr., 1992). (ii) Die gleichzeitige Elution von F TraD und F His₆-TraM von einer Ni-Agarose Säule, die mit His₆-TraM gesättigt und anschließend mit F TraD beladen wurde, weist auf eine Bindung von F TraD an F TraM, welches ein *oriT*-bindendes Protein und möglicherweise Bestandteil des Relaxosoms ist, hin (Disqué-Kochem & Dreiseikelmann, 1997).

Für die Wechselwirkung von TraG-ähnlichen Proteinen mit Komponenten des Mpf-Systems gibt es bisher nur indirekte Hinweise. (i) In Lokalisierungsexperimenten befand sich RP4 TraG in der Zellfraktion, die auch die Komponenten des Mpf-Komplexes enthielt (Grahn *et al.*, 1999). Da diese Fraktion jedoch auch OmpA (Protein der äußeren Membran) als auch LPase (Protein der inneren Membran) enthielt, kann auch ein Umordnen der Zellmembranen durch den Mpf-Komplex zu diesem Ergebnis geführt haben. In RP4-freien *E. coli*-Zellen verhielt sich TraG wie ein Protein der inneren Membran (Grahn *et al.*, 1999). F TraD wurde in der inneren Membranfraktion lokalisiert (Panicker & Minkley, Jr., 1992). Wahrscheinlich integriert TraD über zwei N-terminale transmembranale Helices in die innere Membran, wobei der N- und C-Terminus in das Cytoplasma zeigen und der Bereich, der sich zwischen den beiden Helices befindet, in das Periplasma reicht (persönliche Mitteilung, Dr. B. Traxler, University of Washington, Seattle, USA). (ii) RSF1010 kann in Anwesenheit von Ti VirD4 und den VirB-Komponenten mobilisiert werden. Die Produkte der *vir(virulence)*-Gene des Ti(*tumor inducing*)-Plasmides katalysieren den Transfer der T-DNA von *A. tumefaciens* in Pflanzenzellen. Liegen RSF1010 und ein Ti-Plasmid gleichzeitig in einer Zelle vor, so ist eine Reduktion des T-DNA-Transfers zu beobachten (Ward, Jr. *et al.*, 1991). Dieser Effekt kann durch die Überexpression von Ti VirB9-11 aufgehoben werden (Ward, Jr. *et al.*, 1991). Das heißt, daß das RSF1010-Relaxosom und der T-DNA-Protein-Komplex um die Interaktion mit dem Mpf-Komplex konkurrieren. Wenn diese Interaktion über VirD4 vermittelt wird, dann ist es auch denkbar, daß VirD4 mit VirB9, VirB10 oder VirB11 wechselwirkt. (iii) CloDF13 ist ein nicht-konjugatives

Plasmid, das für sein eigenes TraG-ähnliches Protein (MobB) kodiert. Liegen CloDF13 und RP4 gemeinsam in einer Zelle vor, so wird CloDF13 mobilisiert. Dessen Mobilisierungsfrequenz steigt jedoch um den Faktor 1000, wenn RP4 Δ traG den CloDF13-Transfer bewirkt (Cabezón *et al.*, 1997). Das zeigt, daß im ersten Fall MobB und TraG um die Bindung zu einer Mpf- oder zelleigenen Komponente konkurrieren haben. Dieses Phänomen konnte jedoch bei der Mobilisierung von CloDF13 durch andere konjugative Plasmide nicht beobachtet werden (Cabezón *et al.*, 1997).

1.3.2 TrbB ist Mitglied der PulE-Superfamilie

Die Gene, welche für Mpf-Systeme konjugativer Plasmide der Inkompatibilitätsgruppen IncP, IncN, IncW, Ti(Tra3) und IncX kodieren, sind in gleicher Weise organisiert, wie die Gene im *virB*-Operon von *A. tumefaciens* und im *ptl*(*pertussis toxin liberation*)-Operon des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis*. Darüber hinaus besteht zwischen den einzelnen Genprodukten eine signifikante Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz, was auf eine phylogenetische Verwandtschaft zwischen diesen Transportsystemen hinweist (Abb. 1.6) (Lesl & Lanka, 1994). All diese Transportsysteme werden dem Typ IV-Sekretionssystem zugeordnet (Salmond, 1994). Interessanterweise kodiert das *ptl*-Operon ein Sekretionssystem, das ausschließlich einen Proteinkomplex transportiert. Für die anderen Transportsysteme wäre DNA als zusätzliches Substrat denkbar. Kürzlich wurden im Genom von *H. pylori* Gene entdeckt, die Sequenzähnlichkeiten zu Tra-Proteinen konjugativer Plasmide aufweisen (Tomb *et al.*, 1997). Diese Gene befinden sich in der *cag*-Region der Pathogenitätsinsel von *H. pylori*. Ihre Genprodukte sind an der Auslösung einer entzündlichen Reaktion infizierter ephitaler Zellen des Magens und 12-Fingerdarms beteiligt (Censini *et al.*, 1996). Die Sequenzierung der Genome der intrazellulären pathogenen Keime *R. prowazekii* (Andersson *et al.*, 1998), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Brucella spp.* (Covacci *et al.*, 1999) und *L. pneumophila* (Vogel *et al.*, 1998) zeigte, daß diese ebenfalls für Bestandteile eines Typ IV-Sekretionssystem kodieren (Abb. 1.6).

TrbB und seine homologen Vertreter in den anderen Typ IV-Sekretionssystemen besitzen Sequenzähnlichkeiten zu Vertretern von Typ II-Sekretionssystemen. Sie werden zur PulE-Proteinfamilie (benannt nach dem Vertreter im Pullulanase-Sekretionssystem von *Klebsiella oxytoca*) zusammengefaßt. Darüber hinaus sind Vertreter der PulE-Superfamilie sowohl in Gram-positiven Bakterien als auch in Archaea zu finden (Abb. 1.7). Die Sequenzhomologie erstreckt sich über einen Bereich von ca. 100 Aminosäuren und schließt vier konservierte Motive ein: Typ A-Nukleotidbindungsstelle (NBS), zwei Aspartat-Boxen, und eine Histidin-Box. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind in der Regel hydrophil und besitzen weder transmembranale Helices noch ein N-terminales Exportsignal. RP4 TrbB (Grahn *et al.*, 1999), R388 TrwD (Rivas *et al.*, 1997), Ti VirB11 (Rashkova *et al.*, 1998), *K. oxytoca* PulE (Possot & Pugsley, 1994) und *Vibrio cholerae* EspE (Sandkvist *et al.*, 1995) wurden im Cytoplasma lokalisiert. Es wird vermutet, daß diese Proteine eine schwache Interaktion mit der inneren Membran eingehen.

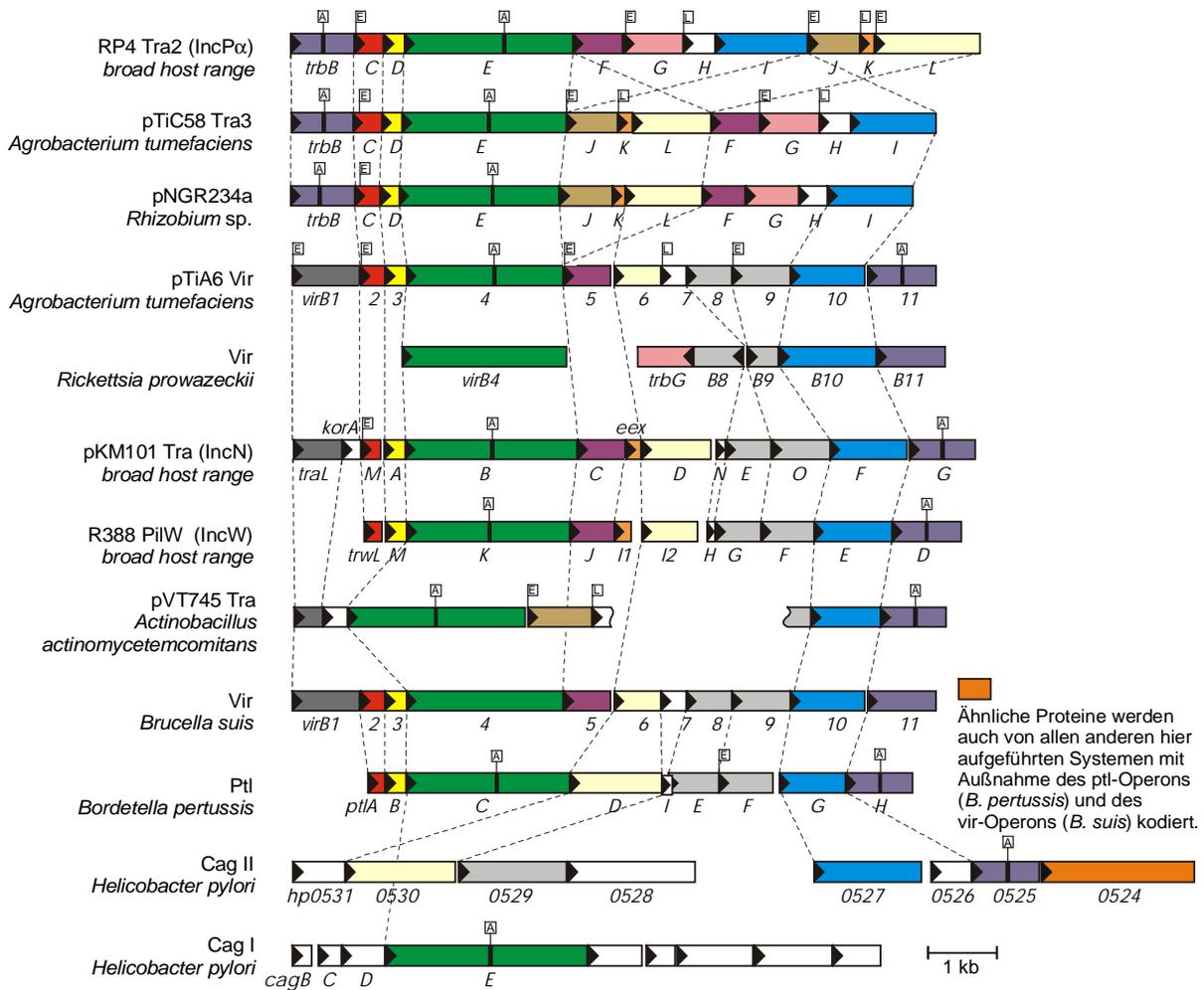


Abb. 1.6 Die konservierte Genorganisation verschiedener Transportsysteme, die zum Typ IV-Sekretions-system zusammengefaßt werden. Gene, die ähnliche Proteine kodieren, sind durch Linien verbunden und mit den gleichen Farben unterlegt worden. Die Genstarts sind durch Pfeile markiert. Eine Markierung mit E kennzeichnet ein N-terminales Exportsignal. Mit L markierte Gene kodieren für Proteine, die am N-Terminus eine Lipoproteinsignatur aufweisen. Mit A ist der Bereich in einem Gen gekennzeichnet, der im entsprechenden Protein für eine Typ A-NBS kodiert.

Vertreter der PUL-E-Superfamilie sind an den unterschiedlichsten Vorgängen wie der Assemblierung konjugativer Pili, der Assemblierung adhäsiver Pili (Typ IV) und dem Export von Proteinen aus der Zelle beteiligt. Im Fall der *twitching motility* werden zwei PUL-E-ähnliche Proteine benötigt. Eines wird für die Assemblierung der Typ IV-Pili benötigt, welche für diese Art von Mobilität zuständig sind. Das zweite PUL-E-ähnliche Protein scheint notwendig für die Depolymerisation der Pili zu sein. Im Fall von *Pseudomonas aeruginosa* besaß eine *PilT*⁻-Mutante Pili, konnte jedoch kein *twitching motility* mehr ausüben (Wall & Kaiser, 1999). Darüber hinaus sind PUL-E-ähnliche Proteine an der Aufnahme von DNA durch natürliche Transformation in Gram-positiven Bakterien beteiligt. Dort sind sie Teil des Komplexes, der die Bindung der DNA an die Zelloberfläche bewerkstelligt (Dubnau, 1997). Das konjugative IncI-Plasmid ColIb-P9 besitzt zwei PUL-E-ähnliche Proteine PilQ und TraJ (Kim & Komano, 1997). Diese Proteine sind an der Assemblierung eines dicken, unflexiblen (TraJ) bzw. eines dünnen, flexiblen (PilQ) Piluses beteiligt. Das Vorhandensein dieser beiden Pili befähigt ColIb-P9 zur

Konjugation sowohl auf festem als auch im flüssigen Medium. Im festen Medium benötigt es dazu nur den dicken, unflexiblen Sex-Pilus. Die zusätzliche Ausbildung des dünnen, flexiblen Piluses, der wahrscheinlich ein Type IV-Pilus ist, ermöglicht die Konjugation im flüssigen Medium.

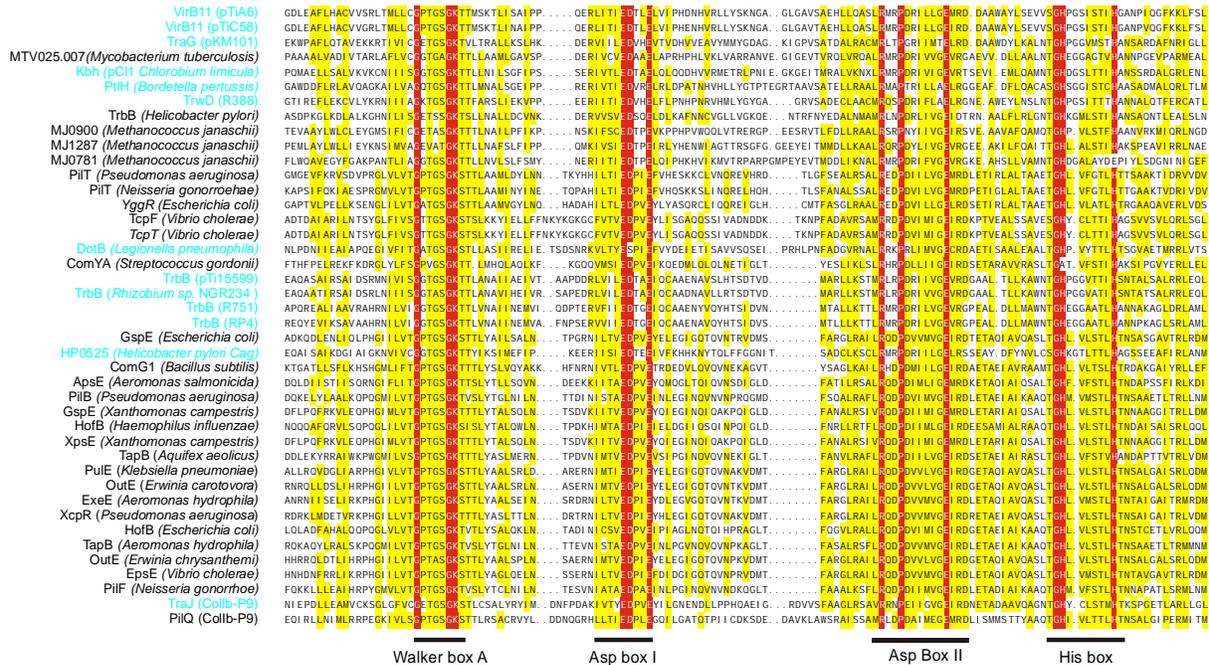


Abb. 1.7 Aminosäuresequenzvergleich von Vertretern der PulE-Superfamilie. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des PILEUP-Programms der GCG program package version 9.1 erstellt. Aminosäurereste, die mindestens zu 95% konserviert sind, sind rot unterlegt und mit weißen Buchstaben dargestellt. 70% Konservierung innerhalb der Aminosäurereste ist durch gelbe Unterlegung gekennzeichnet. Die Lage der vier konservierten Motive ist durch vier horizontale Linien gekennzeichnet. Vertreter der Typ IV-Sekretionssysteme sind in blauen Buchstaben dargestellt. Accession numbers: VirB11 (pTiA6), X06826; VirB11 (pTiC58), P07169; TraG (pKM101), I79275; MTV025.007 (*Mycobacterium tuberculosis*), AL022121; Kbh (pCl1 *Chlorobium limicola*), U77780; PtIH (*Bordetella pertussis*), F47301; TrwD (R388), X81123; TrbB (*Helicobacter pylori*), AE001554; MJ0900 (*Methanococcus janaschii*), Q58310; MJ1287 (*Methanococcus janaschii*), F64460; MJ0781 (*Methanococcus janaschii*), D64412; PiIT (*Pseudomonas aeruginosa*), P24559; PiIT (*Neisseria gonorrhoeae*), Q06581; YggR (*E. coli*), U28377; TcfP (*Vibrio cholerae*), P29488; TcfT (*Vibrio cholerae*), JN0524; DotB (*Legionella pneumophila*), AF026533; ComYA (*Streptococcus gordonii*), U81957; TrbB (pTi15599), P54907; TrbB (*Rhizobium* sp. NGR234), AE000068; TrbB (R751), U67194; TrbB (RP4), M93696; GspE (*Escherichia coli*), U18997; HP0525 (*Helicobacter pylori* Cag), AE00148; ComG1 (*Bacillus subtilis*), M29691; ApsE (*Aeromonas salmonicida*), L38960; PilB (*Pseudomonas aeruginosa*), M32066; GspE (*Xanthomonas campestris*), S17937; HofB (*Haemophilus influenzae*), P44622; XcpR (*Xanthomonas campestris*), P31742; TapB (*Aquifex aeolicus*), AE000766; PulE (*Klebsiella pneumoniae*), P15645; OutE (*Erwinia carotovora*), P31703; ExeE (*Aeromonas hydrophila*), S22669; XpsE (*Pseudomonas aeruginosa*), Q00512; HofB (*Escherichia coli*), P36645; TapB (*Aeromonas hydrophila*), P45792; OutE (*Erwinia chrysanthemi*), C47021; EpsE (*Vibrio cholerae*), P37093; PilF (*Neisseria gonorrhoe*), S32914; TraJ (ColIb-P9), AB021078; PilQ (ColIb-P9), AB021078

Der Austausch konservierter Aminosäuren in einzelnen Vertretern der PulE-Superfamilie zeigte, daß die Typ A-NBS des für die Funktion dieser Proteine innerhalb des Transfervorganges essentiell ist (Tabelle 1.1). Die gleichzeitige Expression von wt(Wildtyp)-Protein und mutiertem Protein in merodiploiden Stämmen ergab, daß einige dieser Mutanten transdominant waren

(Possot & Pugsley, 1994; Sandkvist *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1993; Rivas *et al.*, 1997; Zhou & Christie, 1997), was auf Oligomerenbildung hindeutet. Merodiploide Stämme, die *wt-virB11* und *virB11Δ1-156* enthielten, zeigten einen transdominanten Effekt, wohingegen *virB11Δ185-343* nicht transdominant war. Daher scheint die Oligomerisierungsdomäne von VirB11 im C-Terminus zu sitzen (Rashkova *et al.*, 1998). XcpR hingegen scheint über den N-Terminus zu dimerisieren, wie mittels eines *in vivo*-Testes mit λ cl-Protein gezeigt werden konnte (Turner *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Ausbildung von Homooligomeren eine typische Eigenschaft der PulE-Superfamilie ist.

Typ II- und Typ IV-Sekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien sind von *sec*-Funktionen abhängig. In den *Sec*-unabhängigen Typ I- und Typ III-Sekretionssystemen sind keine Vertreter der PulE-Superfamilie zu finden. Jedoch besitzen auch diese Systeme ein cytosolisches Protein, das mit der inneren Membran assoziiert ist und Nukleotidbindungsmotive besitzt (Salmond, 1994). Dies läßt vermuten, daß die PulE-ähnlichen Proteine eine sehr grundlegende Rolle innerhalb der verschiedenen Transportprozesse spielen.

Tabelle 1.1 Gerichtete Mutagenese innerhalb der PulE-Superfamilie.

Motiv	Protein	Mutation*	Referenz
Typ A-NBS	TrbB	K161A	diese Arbeit
	PulE	G260A K261R	(Possot & Pugsley, 1994)
	EspE	K270A	(Sandkvist <i>et al.</i> , 1995)
	XcpR	G267S	(Turner <i>et al.</i> , 1993)
	PilB	G331S	(Turner <i>et al.</i> , 1993)
	TrwD	K203Q	(Rivas <i>et al.</i> , 1997)
	VirB11	K175A K175R K175Q	(Stephens <i>et al.</i> , 1995), (Rashkova <i>et al.</i> , 1998)
Aspartat-Box I	TrbB	D186A	diese Arbeit
	PulE	D284N	(Possot & Pugsley, 1994)
Aspartat-Box II	TrbB	R217T	diese Arbeit
Histidin-Box	VirB11	H269R	(Zhou & Christie, 1997)

* Alle Mutationen in der Typ A-NBS und in der Histidin-Box führten zur Inaktivierung des Proteins *in vivo*. Die Mutationen in der Aspartat-Box I und II führten zu einer Reduktion der DNA Transferfrequenz bzw. der Pullulanase-Sekretion.

1.4 Aufgabenstellung

Der Mpf-Komplex, welcher wahrscheinlich eine membrandurchspannende Pore darstellt (Grahn *et al.*, 1999), ist für die Assemblierung der konjugativen Pili essentiell (Lessl *et al.*, 1993). Um verstehen zu können, wie der Pilus assembliert wird, ist es notwendig, die Funktion der einzelnen Komponenten des Mpf-Systems zu ermitteln. Bisher konnte drei Komponenten (TraF, TrbC und TrbK) des Mpf-Systems jeweils eine Funktion zugeordnet werden (Haase *et al.*, 1996; Haase &

Lanka, 1997; Eisenbrandt *et al.*, 1999). Ein Ziel dieser Arbeit ist die strukturelle und biochemische Charakterisierung von TrbB, einer weiteren Komponente des Mpf-Systems. Es ist der einzige Bestandteil des Mpf-Systems, welche unter nicht-denaturierenden Bedingungen löslich ist. Somit ist die Reinigung von TrbB unter physiologischen Bedingungen möglich, was eine günstige Voraussetzung für seine enzymatische Charakterisierung ist. TrwD, ein zu TrbB homologes Protein des IncW-Plasmides R388, und das TrbB-Analog HP0525 aus *H. pylori* sollen ebenfalls untersucht werden, um feststellen zu können, ob die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den Proteinen mit einer funktionellen Verwandtschaft einhergeht.

Auf Grund von genetischen Studien über die Mobilisierung nicht-konjugativer Plasmide durch Helferplasmide wurde vermutet, daß TraG-ähnliche Proteine mit Komponenten des Relaxosoms bzw. des Mpf-Systems wechselwirken (Cabezón *et al.*, 1997). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, diese Vermutung durch systematische, biochemische Untersuchungen zu beleuchten. Dazu sollen RP4 TraG und TraD des F-Plasmides gereinigt werden. F TraD wurde ausgewählt, da für dieses Protein bereits über erste Hinweise auf eine Interaktion mit Komponenten des Relaxosoms berichtet wurde (Panicker & Minkley, Jr., 1992; Disqué-Kochem & Dreiseikelmann, 1997). Interaktionsstudien von gereinigtem RP4 TraG und F TraD mit Komponenten des Relaxosoms und des Mpf-Komplexes sollen Interaktionspartner von den TraG-ähnlichen Proteinen mit den beiden Komplexen aufzeigen.