

## **2. Zusammenfassung**

Die Komponenten der Proteintranslokation und -faltung von *Escherichia coli* (*E. coli*) sind bereits intensiv untersucht. Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie trotz des sehr großen Substratspektrums von Faltungs- und Translokationsapparat dennoch eine sehr differenzierte Unterscheidung zwischen zu faltenden und zu translozierenden Proteinen möglich ist. Neben dem theoretischen Interesse an dieser Differenzierungsleistung ist die Kenntnis der Substratanforderungen von Faltungs- und Translokationsapparat für die erfolgreiche Überexpression von Proteinen im Zytoplasma und im Periplasma von *E. coli* auch von praktischem Interesse.

In dieser Arbeit wurde anhand eines homologen Isoenzym-paares, der zytoplasmatischen und der periplasmatischen Trehalase von *E. coli*, untersucht, wie sich die beiden Enzyme hinsichtlich ihrer Funktion, Struktur, Faltungs- und Translokationseigenschaften an ihre unterschiedliche zelluläre Lokalisation angepaßt haben.

Die zytoplasmatische Trehalase TreF von *E. coli* wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals überexprimiert, gereinigt und ihre enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. TreF war als Monomer aktiv. Es hydrolysierte spezifisch das Disaccharid Trehalose zu zwei Molekülen Glukose. Die Substrataffinität betrug 1,9 mM, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit 54 µM Trehalose pro min und mg Protein. Das pH-Optimum dieser Trehalase lag zwischen 6,0 und 7,5. Die Aktivität der Trehalase war nicht von Metallionen abhängig.

Die enzymatischen Eigenschaften von TreF sind damit vergleichbar mit denen der homologen periplasmatischen Trehalase TreA.

Die Sequenzidentität von TreA und TreF ist in einem 478 Aminosäuren langen Kernbereich mit 48,9 Prozent sehr hoch. Die Enden sind nicht homolog. Während TreF am N-Terminus 44 zusätzliche Aminosäuren besitzt, ist der C-Terminus von TreA gegenüber dem von TreF um 45 Aminosäuren verlängert. Die N-terminale Extension von TreF konnte durch limitierte Proteolyse ohne Funktionsverlust abgespalten werden.

Die Aminosäure-Zusammensetzung der ca. 51 % nicht identischen Aminosäuren unterscheidet sich in den beiden Trehalasen deutlich voneinander. TreF enthält mehr geladene Aminosäurereste als TreA, in welchem dagegen mehr polare Reste vorhanden sind.

Da sich herausgestellt hat, daß die beiden Trehalasen sehr ähnliche enzymatische Eigenschaften haben, wurde *in vivo* untersucht, wie sie sich in ihrem Translokations- und Faltungsverhalten unterscheiden.

Als Voraussetzung für diese *in vivo*-Untersuchungen wurde ein Stamm konstruiert, dessen Gene für das Trehalose-Aufnahme- und Abbausystem, *treB/C*, deletiert und dessen Gen für die periplasmatische Trehalase durch Insertion einer Spectomycin-Kassette ausgeschaltet war. Dieser Stamm konnte Trehalose nur dann verstoffwechseln, wenn er eine Plasmid-codierte, aktive Trehalase enthielt.

Die chromosomale Kopie der zytoplasmatischen Trehalase störte die Untersuchungen nicht, da ihre Aktivität mit nur 0,004 U pro mg Zellprotein gegenüber den verwendeten Plasmid-codierten Trehalasen vernachlässigbar war.

In diesen *treA::Spec<sup>R</sup>*,  $\Delta treRBC$  Stamm und seine Derivate wurden Plasmide transformiert, die für TreA, TreF bzw. verschiedene Trehalase-Konstrukte codierten. Die Trehalasen wurden dann mittels Aktivitätstests, Western Blots und kalter osmotischer Schocks hinsichtlich ihrer Expression, Löslichkeit, Aktivität und Lokalisation untersucht und miteinander verglichen.

Zunächst wurde TreF hinter die Signalsequenz von TreA fusioniert. Es konnte so als erstes zelleigenes zytoplasmatisches Protein effizient über die Zytoplasmamembran transloziert werden. Möglicherweise war hierfür die besonders starke Hydrophobizität der Signalsequenz von TreA verantwortlich.

Im Periplasma wurde TreF abgebaut. Es konnte jedoch durch das Ausschalten der periplasmatischen Protease DegP stabilisiert werden und hatte dann die Größe von Wildtyp TreF.

Das translozierte, stabilisierte TreF befand sich in den Sedimenten von kalten osmotischen Schocks und hatte nur sehr geringe enzymatische Aktivität. Diese Befunde wiesen auf einen Faltungsdefekt der zytoplasmatischen Trehalase im Periplasma hin.

Durch geeignete genetische Selektion konnten zwei verschiedene TreF-Mutanten isoliert werden, die im Periplasma eine 3-7-fach erhöhte Trehalase-Aktivität aufwiesen. Diese erhöhten Aktivitäten wurden höchstwahrscheinlich durch die Punktmutationen  $A_{82} \rightarrow T$  bzw.  $T_{172} \rightarrow A$ , ausgelöst.  $T_{172}$  ist in TreF in dem ersten der beiden in allen bekannten Glykosylhydrolasen konservierten Bereich lokalisiert. Der Befund aus kalten osmotischen Schocks, daß die Proteine unlöslich sind, ließ vermuten, daß sich die Mutationen nicht auf die Faltung, sondern direkt auf die Aktivität auswirkten.

Der Faltungsdefekt der zytoplasmatischen Trehalase im Periplasma konnte auch dann nicht aufgehoben werden, wenn TreF anstatt direkt hinter die Signalsequenz an Aminosäure 233 des reifen TreA fusioniert wurde.

Die Polypeptidkette von TreF ließ sich jedoch dann im Periplasma zu einem löslichen, aktiven Protein falten, wenn sie zu ca. 60 % durch TreA-Sequenz ersetzt wurde. Dieses TreA-TreF1-Hybridprotein wurde durch genetische Selektion aus einem Plasmid gewonnen, in welchem die Genfragmente *prä-treA* und *treF* direkt hintereinander kloniert waren. Die Möglichkeit, funktionelle Hybride aus sich ergänzenden Teilen der beiden Trehalasen bilden zu können, sprach für die Konservierung von Sekundär- und Tertiärstruktur.

Ein Hybridprotein mit identischem Fusionspunkt ( $\Delta ssTreA$ -TreF1) wurde aus einer entsprechenden Selektion gewonnen, in der das Selektionsplasmid anstatt für *prä-treA* für *treA* ohne Signalsequenz codierte. Das Fusionsprotein  $\Delta ssTreA$ -TreF1 ist auch im Zytoplasma aktiv. Es verhält sich dort wie TreA, welches ohne Signalsequenz exprimiert wird: Es kann im Zytoplasma unabhängig von periplasmatischen Faltungshelfern eine aktive Konformation einnehmen.

Begünstigt wird die Faltung von TreA im Zytoplasma dadurch, daß das aktive Protein über keine essentiellen Disulfidbrücken verfügt. Neben der Disulfid-Oxido-Reduktase DsbA konnten auch die Prolyl-Peptidyl-*cis-trans*-Isomerasen RotA und SurA ausgeschaltet werden, ohne daß dadurch die Expression und die Aktivität von TreA im Periplasma beeinträchtigt wurden. Da es jedoch im Periplasma neben den getesteten noch weitere Disulfidbrücken- und Peptidyl-*cis-trans*-Isomerasen gibt, konnte nicht unterschieden werden, ob sich TreA unabhängig von diesen Faltungskatalysatoren falten konnte, oder ob deren Funktion von anderen Faltungshelfern übernommen wurde.

Da die Signalsequenz ausreichend war, um die Translokation aller getesteten Trehalasen zu vermitteln, wurde im folgenden untersucht, inwieweit sich die Translokationskompetenz des reifen Teils der Trehalase-Konstrukte unterscheidet.

Die *prlA4*-Mutation in SecY, einer Komponente des Translokationsapparates, erlaubt die Translokation von periplasmatischen Proteinen auch dann, wenn sie ohne Signalsequenz exprimiert werden. Obwohl sich Signalsequenz-loses TreA im Gegensatz zu den bisher untersuchten Proteinen im Zytoplasma effizient falten konnte und die Ausbildung einer Tertiärstruktur die Translokationskompetenz beeinträchtigt, konnte es im *prlA4*-Stamm zu einem großen Teil transloziert werden. Hier schien eine Konkurrenz zwischen zytoplasmatischer Proteinfaltung und Translokation stattzufinden.

Im Fall des TreA-TreF1-Hybridproteins, welches ohne Signalsequenz synthetisiert wurde, schien die Konkurrenz stark zugunsten der Faltung im Zytoplasma verschoben zu sein, denn weder auf Aktivitäts- noch auf Proteinebene ließ sich eine signifikante Zunahme des Trehalase-Hybridproteins im Periplasma nachweisen.

Da die zytoplasmatische Trehalase im Periplasma weder ausreichend Aktivität aufwies noch löslich war, war eine Aussage über die Translokation von TreF im *prlA4*-Stamm nicht möglich. Die Untersuchung wurde zusätzlich dadurch erschwert, daß die Bestimmung periplasmatisch lokalisierter Trehalase möglicherweise durch die Aktivität der zytoplasmatischen Trehalase verfälscht wurde. Diese Überlagerung der periplasmatischen Trehalase-Aktivität durch die Aktivität zytoplasmatisch lokalisierter Trehalase wurde vermutlich durch eine unspezifische Aufnahme von Trehalose ins Zytoplasma ausgelöst. Das Mannose-Phosphotransferase-System sowie die Galaktose Permease sind hierfür prädestinierte Aufnahmesysteme, da diese in *Salmonella typhimurium* Trehalose transportieren können.