

### 3. Einleitung

#### **3.1. Trehalose und ihr Abbau durch Trehalasen**

##### **3.1.1. Trehalose**

Trehalose ist ein nicht-reduzierendes Disaccharid ( $\alpha$ -D-Glukopyranosyl- $\alpha$ -D-Glukopyranosid). Der Zucker wurde 1832 erstmals aus dem Mutterkornpilz des Roggen isoliert. Die Trehalose bekam ihren Namen 1858 von Berthelot, der das Disaccharid aus der Hämolymphe eines Käfers der Gattung *Larinus* reinigte. Die Puppe dieses Käfers heißt "Trehalamanna" (zitiert in Elbein, 1974). Abb. 3.1. zeigt die Struktur der Trehalose:

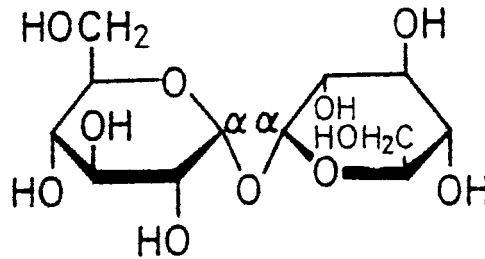


Abb. 3.1.: Struktur der Trehalose

##### **3.1.2. Verbreitung und Bedeutung von Trehalose**

Trehalose ist in der Natur weit verbreitet. Besonders hohe Trehalose-Vorkommen wurden in Hefen, Pilzen, Algen und Insekten beschrieben (Elbein, 1974). Das Disaccharid wurde aber auch in Farnen, Samenpflanzen, Arthropoden, Wirbeltieren und in einer Vielzahl von Bakterien entdeckt (Elbein, 1974; Elslinger, et al., 1993; Oesch und Meier, 1967; Su et al, 1993; Lippert et al. 1993). Trehalose ist also in fast jeder Organismenfamilie zu finden. Sie kann dort vielfältige Funktionen wahrnehmen.

Für viele Organismen ist Trehalose als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle von wichtiger Bedeutung. In zahlreichen Pilz- und Hefesporen ist Trehalose als Energiereserve angereichert (Elbein, 1974).

Trehalose kann auch als Schutzsubstanz gegen verschiedene Arten von Streß wirksam sein. Sie schützt Membranen und Proteine vor den negativen Auswirkungen von Austrocknung, Hitze, Kälte und Osmolarität. Als Schutzmechanismus wird in den meisten Fällen die Wassersubstitution diskutiert. Hierdurch kann dem Dehydrierungsprozeß entgegengewirkt werden, der vielen Streßsituationen zugrunde liegt. Membranen und

Proteine können durch Anlagerung von Trehalose in einem Zustand gehalten werden, der dem ursprünglichen, hydrierten entspricht. (Vergl. Hottiger et al., 1994; Carpenter et al., 1993; Santoro et al., 1992; Herskovitz et al., 1991; Rudolph et al., 1986 und Crowe et al., 1984)

### 3.1.3. Abbau von Trehalose

Für den Abbau von Trehalose sind drei verschiedene Mechanismen bekannt:

Am weitesten verbreitet ist der Abbau von Trehalose durch Trehalasen ( $\alpha$ - $\alpha$ -Trehalose 1-D-Glukohydrolasen). Diese hydrolysieren das Disaccharid Trehalose zu zwei Molekülen Glukose.

Eine andere Möglichkeit der Verstoffwechslung von Trehalose besteht in dem Abbau von Trehalose-6-Phosphat. Hierbei gelangt Trehalose über ein Phosphoenolpyruvat-abhängiges Transportsystem in die Zelle, wobei sie zu Trehalose-6-Phosphat phosphoryliert wird. Dieses wird dann durch eine Phosphotrehalase in Glukose und Glukose-6-Phosphat gespalten (Bhumiratana et al., 1974; Rimmelme und Boos, 1994).

In der Alge *Euglena gracilis* wurde eine Trehalose-Phosphorylase beschrieben, die Trehalose und anorganisches Phosphat zu  $\beta$ -Glykosyl-Phosphat und D-Glukose spaltet (Marechal und Belocopitow 1970 und 1972).

### 3.1.4. Trehalasen

Genau wie die Trehalose sind auch die Trehalasen in der Tier- und Pflanzenwelt weit verbreitet. Trehalasen kommen sowohl in Organismen vor, die selbst Trehalose produzieren, als auch in solchen, für die Trehalose lediglich einen Teil des Nahrungsangebotes darstellt.

Die erste Trehalase wurde 1893 von E. Borquelot in Pilzen beschrieben (zitiert in Elbein, 1974). Inzwischen sind Trehalasen von Pilzen, Hefen und Bakterien hinsichtlich ihrer Funktionen, biochemischen Eigenschaften und verschiedenen Regulationsmechanismen schon gut untersucht. Es gibt membrangebundene und lösliche Formen der Trehalase. Ihre Substrataffinität liegt zwischen 0,4 und 20 mM. Das pH-Optimum der einzelnen Trehalasen variiert stark. Es liegt zwischen pH 3,7 und pH 7,5. (zitiert in Elbein et al., 1974).

In der SwissProt-Datenbank<sup>\*)</sup> waren am 1. Juli 1997 bereits neun Trehalase-Sequenzen aus unterschiedlichen Organismen hinterlegt. Da jede dieser Sequenzen die beiden in Glykosyl-Hydrolasen konservierten Motive PGGRF<sub>x</sub>ExY<sub>x</sub>WD<sub>x</sub>Y und QWD<sub>x</sub>P<sub>x</sub>GAWPAP enthält, wurden Trehalasen als eine Unterfamilie der Glykosyl-Hydrolasen klassifiziert (Henrissat und Bairoch, 1993).

---

<sup>\*)</sup> <http://expasy.hcuge.ch/sprot/sprot-top.html>

Aus dem *gram*-negativen Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) sind zwei Trehalasen bekannt, die periplasmatische Trehalase TreA (Boos et al., 1987) und die zytoplasmatische Trehalase TreF (Sofia et al., 1994). Auf Proteinebene weisen die beiden Trehalasen ca. 47 % Sequenzhomologie auf. Die Vermutung liegt nahe, daß die beiden Trehalasen durch Genduplikation auseinander hervorgegangen sind und daß die Sequenzunterschiede eine Anpassung an die jeweilige zelluläre Funktion und Lokalisation widerspiegeln.

Die beiden homologen Trehalasen mit unterschiedlicher Lokalisation stellen daher ein geeignetes System für die Bearbeitung folgender Fragen dar:

- Wie haben sich die Trehalasen an ihr jeweiliges 'Kompartiment' angepaßt?
- Benötigen die beiden Trehalasen bestimmte 'Kompartiment-spezifische' Faltungshelfer zur Ausbildung ihrer aktiven Konformation?
- Wie wird die korrekte Lokalisation von TreA und TreF gewährleistet?  
Gibt es über die Signalsequenz hinaus Informationen, die über die Lokalisation der Trehalasen entscheiden?

In diesem Zusammenhang sollen in den folgenden Kapiteln die Bedeutung der Trehalose für *E. coli* sowie die Translokations- und Faltungsbedingungen in diesem Bakterium erläutert werden.

### 3.2. Bedeutung der Trehalose für *E. coli*

Als enterisches Bakterium wird *E. coli* in seinem Lebenszyklus mit zwei völlig verschiedenen Lebensräumen konfrontiert. Im Darm warmblütiger Tiere und Menschen, ist *E. coli* bei konstanter Temperatur und zuverlässiger Nährstoffversorgung relativ optimalen Bedingungen ausgesetzt. Da Trehalose einen wesentlichen Nahrungsbestandteil der *E. coli*-Wirte darstellt<sup>\*)</sup>, und da Trehalasen aus den Mikrovilli der Gedärme zahlreicher Säugetiere isoliert wurden (Elbein, 1974, Galand, 1989), kann man davon ausgehen, daß Trehalose dem Bakterium im Darm als Energie- und Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht.

Eine andere Rolle spielt Trehalose, sobald *E. coli* aus dem Darm in die Umwelt, sein alternatives Habitat, ausgeschieden wird. Hier können sich die Lebensbedingungen rasch ändern und das Bakterium muß in der Lage sein, diese Schwankungen zu erkennen und geeignet darauf zu reagieren. *E. coli* synthetisiert und akkumuliert Trehalose hier als Anpassung an hohe Osmolarität, sofern es nicht auf andere, extern vorhandene Osmolyte zurückgreifen kann.

Trehalose ist für *E. coli* also in zweierlei Hinsicht von Bedeutung, zum einen synthetisiert es Trehalose als osmoprotektive Substanz und zum anderen kann es das Disaccharid als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen.

#### 3.2.1. Trehalose als osmoprotektive Substanz

##### 3.2.1.1. Einfluß der Osmolarität auf *E. coli*

*E. coli* hat durch Einlagerung des stabilen Peptidoglykangerüsts eine rigide Zellwand. Diese ist für Wasser, jedoch nicht für geladene Substanzen oder große Moleküle permeabel (Bovell, 1963; Calamita, 1995). Das Bakterium ist daher nicht in der Lage, sein Zellvolumen und die Konzentration gelöster Substanzen unabhängig von der Osmolarität des Außenmediums zu regulieren. Um den für Zellteilung und Wachstum notwendigen nach außen gerichteten Druck von ca. 0,3 MPa aufrecht zu erhalten, muß *E. coli* statt dessen die Zusammensetzung seines Zellinhaltes an die Osmolarität des Mediums anpassen (Stock et al., 1977; Koch, 1984; Meury, 1988; Caylay et al., 1991).

*E. coli* ist durch verschiedene Mechanismen in der Lage, den Turgor in weiten Bereichen der Osmolarität des Außenmediums relativ konstant zu halten. Wird die Osmolarität jedoch so stark erniedrigt, daß der osmotische Druck durch die Öffnung der mechanosensitiven Kanäle (s.u.) nicht ausreichend gemindert wird (hypoosmotischer Schock), dann führt der Wassereinstrom letztlich zum Platzen der Zelle. Erhöht sich die Osmolarität des Mediums (hyperosmotischer Schock), kommt es zu einem Wasserausstrom aus der Zelle und durch die Erniedrigung des Turgors im Zytoplasma im Extrem-

---

<sup>\*)</sup> Nach Semenza hatte Trehalose früher für die menschliche Ernährung eine wichtigere Bedeutung als die Saccharose (Semenza, 1968).

fall zu einer Ablösung der Zytoplasmamembran von der Zellwand (Plasmolyse). (Stock et al., 1977; Koch, 1984)

### 3.2.1.2. Anpassung an hohe Osmolarität

Um bei erhöhter Osmolarität den Turgor aufrecht zu erhalten, muß die Konzentration der löslichen Substanzen im Zytoplasma linear mit der des Außenmediums steigen. Für eine schnelle Anpassung spielt hierbei der Einstrom von K<sup>+</sup>-Ionen eine zentrale Rolle. Er erfolgt in erster Linie durch Aktivierung des konstitutiv exprimierten, niederaffinen Trk-Transportsystems, aber auch durch das hochaffine Kdp-Transportsystem und in geringem Ausmaß durch das Kalium-Aufnahmesystem Kup (vergl. Csonka und Epstein, 1996). Der Kaliumeinstrom führt zu einer Erhöhung der Konzentration an intrazellulären K<sup>+</sup>-Ionen von 140 mM auf maximal 760 mM. Damit wird nicht nur eine Anpassung des Turgors an eine Osmolarität des Außenmediums von bis zu 1020 mOsm, sondern auch die Aktivierung Kalium-abhängiger Enzyme erreicht (Cayley et al., 1991; Giaever et al., 1988; Strom et al., 1986). Kurz nach der Auslösung des Einstroms von K<sup>+</sup>-Ionen kommt es zur Synthese von Glutamat als 'Gegenion' (Tempest, 1970; Dinnbier et al., 1988; McLaggan et al., 1994).

Kaliumglutamat wirkt sich in hohen Konzentrationen jedoch schädlich auf Struktur und Aktivität von Proteinen aus (Yancey et al., 1982; Somero, 1986). Es muß daher für eine längerfristige Anpassung an hochosmolare Bedingungen gegen physiologisch besser verträgliche, osmotisch aktive Substanzen, sogenannte 'compatible solutes', ausgetauscht werden. *E. coli* nimmt bevorzugt die zwitterionischen Verbindungen Prolin und Glycin-Betain aus dem Medium auf<sup>\*)</sup>. Stehen diese Komponenten nicht zur Verfügung, erfolgt die Synthese von Trehalose.

#### Synthese von Trehalose

Trehalose wird als einzige osmotische Schutzsubstanz endogen synthetisiert (Dinnbier et al., 1988; Giaever et al., 1988). Sie reicht aus, um *E. coli* Wachstum in Medium mit einer Osmolarität von bis zu 650 mosM zu ermöglichen. Die dabei maximal erreichten intrazellulären Trehalosekonzentrationen wurden zwischen 40 mM und 400 mM beschrieben. Sie machen bis zu 20 % der Gesamtosmolarität von *E. coli* aus (Larsen, et al., 1987; Cayley et al., 1991; Schleyer et al., 1993).

Die Synthese von Trehalose erfolgt durch zwei Enzyme, die im *otsB/A*-Operon bei 42 min auf dem *E. coli* Chromosom codiert sind (Giaever et al., 1988; Kaasen et al., 1992, Kaasen et al., 1994). Dabei katalysiert die Trehalose-6-Phosphat Synthase, das *otsA*-Genprodukt, die Transferreaktion von UDP-Glukose auf Glukose-6-Phosphat, wobei Trehalose-6-Phosphat entsteht. Dieses Zwischenprodukt wird dann durch die Trehalose-6-Phosphat Phosphatase, dem *otsB*-Genprodukt, zu Trehalose dephosphoryliert. Die Genbezeichnung *ots* steht für 'osmotic trehalose synthesis' und deutet an, daß die Expression der Genprodukte durch hohe Osmolarität induziert wird (Giaever et al., 1988). Die Transkription des *ots*-Operon ist von RpoS, dem alternativen Sigmafaktor

---

<sup>\*)</sup> Eine detaillierte Beschreibung der Akkumulation von 'compatible solutes' ist bei Csonka und Epstein (Csonka und Epstein, 1996) nachzulesen.

den stationären Phase (Hengge-Aronis, 1996), abhängig. Obwohl das *ots*-Operon auch beim Übergang in die stationäre Phase induziert wird, enthalten Zellen der stationären Phase wesentlich weniger Trehalose als osmotisch induzierte Zellen (Hengge-Aronis et al., 1991). Dieser Effekt könnte unter anderem durch die Stimulierung der Aktivität der Trehalose-6-Phosphat Synthase durch Kaliumionen (Giaever et al., 1988) erklärt werden. Bei sehr langsam wachsenden Kulturen konnte eine geringfügige Akkumulation von Trehalose beobachtet werden (Notley und Ferency, 1996).

### 3.2.1.3. Anpassung an verminderte Osmolarität

Eine langfristige Anpassung an niedrigere Osmolarität besteht in der Synthese von periplasmatischen Glukanen, den membrane derived oligosaccharides (MDOs). MDOs sind verzweigt-kettige Moleküle aus 8-10 Glukoseeinheiten, die unterschiedlich modifiziert sind und bis zu 5 negative Ladungen pro Molekül tragen. Sie führen zu einer Erhöhung der Osmolarität im Periplasma und gewährleisten so auch bei geringer Osmolarität des Außenmediums die annähernde Isoosmolarität von Zytoplasma und Periplasma (Kennedy, 1996). Dadurch kann der zytoplasmatische Überdruck zum Teil ausgeglichen und von der Zytoplasmamembran auf die rigidere Außenmembran verlagert werden (Stock et al., 1977).

Bei einem raschem Übergang von hoher zu niedriger Osmolarität kommt es zu einer Erhöhung des Turgors in der Zelle. Um ein Platzen der Zelle zu verhindern, müssen die osmoprotektiven Substanzen aus dem Zellinneren entfernt werden. Dies wird durch kurzfristiges Öffnen drucksensitiver Kanäle erreicht. *E. coli* verfügt über mindestens 5 verschiedene druckempfindliche Kanäle, bei denen die durch die Größe der Öffnung bedingte Leitfähigkeit mit dem zur Öffnung erforderlichen Turgor korreliert. Die Osmolyte werden also je nach Stärke des Überdrucks mehr oder weniger spezifisch aus dem Zellinneren freigesetzt (Csonka und Epstein, 1996). Infolge drastischer Abnahme der Osmolarität des Mediums wurde auch eine Ausschleusung des Osmolyten Trehalose aus der Zelle beobachtet (Styrvold et al., 1991). In diesem Zusammenhang wird die Funktion der periplasmatischen Trehalase TreA (s.u.) als Wiederaufnahme-System diskutiert, das dazu dient, unnötigen Energie- und Kohlenstoffverlust zu vermeiden.

Bei weniger drastischer Senkung der Mediumosmolarität ist zur Beseitigung der intrazellulär akkumulierten Trehalose auch ein energetisch günstigerer Mechanismus denkbar, nämlich der zellinterne Abbau von Trehalose zu Glukose. Die Existenz einer zytoplasmatischen Trehalase wurde bereits 1994 postuliert, da in den Zellextrakten einer *treA*-Nullmutante noch eine Trehalase-spaltende Restaktivität beobachtet wurde (Boos et al., 1990, Rimmelmeier und Boos, 1994). Mutanten mit einer expressionsbedingt erhöhten Aktivität einer zytoplasmatischen Trehalase wurden in unserer Arbeitsgruppe isoliert (Horlacher et al., 1996, R. Horlacher, 1996). Gleichzeitig wurde von Blattner und Mitarbeitern bei 78 min auf dem *E. coli* Chromosom ein Gen sequenziert (Gen Bank, Accession Nr. U00039), dessen Aminosäuresequenz eine hohe Homologie zu der periplasmatischen Trehalase TreA aufweist (Sofia et al., 1994). Dieses Gen wurde als *treF* bezeichnet. Durch Kotransduktion konnte gezeigt werden, daß die Mutationen, die

eine erhöhte Aktivität der zytoplasmatischen Trehalase auslösen, in oder in der Nähe von *treF* liegen.

*treF* wurde in unserer Arbeitsgruppe kloniert und die Regulation seiner Genexpression anhand von *treF-lacZ*-Fusionen studiert. Die Expression von TreF ist nicht essentiell. Sie hängt teilweise von RpoS ab und wird durch hohe Osmolarität im Medium leicht induziert. Während die TreF-Expression von Trehalose im Medium unbeeinflusst ist, wurde eine Repression der Expression beobachtet, wenn die Trehalose-Synthese durch Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) -abhängige Induktion Plasmid-codierter *otsA/B*-Gene unabhängig von erhöhter Osmolarität induziert wurde (R. Horlacher, 1996, Horlacher et al. 1996). Die Eigenschaften von TreF werden in dieser Arbeit untersucht.

### 3.2.2. Trehalose als Kohlenstoffquelle für *E. coli*

*E. coli* kann Trehalose zwar nicht als Osmolyt ungespalten ins Zytoplasma aufnehmen, ist aber dennoch in der Lage, Trehalose als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten. Das Bakterium verfügt über zwei voneinander unabhängige Stoffwechselwege, die es ihm ermöglichen, Trehalose sowohl bei niedriger als auch bei hoher Osmolarität zu verstoffwechseln. Wachstum auf Trehalose ist sogar unter solchen Bedingungen möglich, unter denen die Zelle selbst Trehalose synthetisiert. *E. coli* verhindert dann durch räumliche Trennung der Synthese (Zytoplasma) und des Abbaus (Periplasma) von Trehalose, daß diese gleichzeitig ablaufenden Prozesse nicht in einen Energieverschwendenden Kreislauf münden.

Die verschiedenen Trehalose-Stoffwechselwege von *E. coli* sind in Abb. 3.2. dargestellt.

#### 3.2.2.1. Trehalose-Verstoffwechslung bei niedriger Osmolarität

Sowohl bei hoher als auch bei niedriger Osmolarität gelangt Trehalose über die Außenmembranpore LamB ins Periplasma (Szmelcman und Hofnung, 1975; Klein und Boos, 1993).

Bei niedriger Osmolarität wird Trehalose durch ein Trehalose-spezifisches Phosphotransferase System (PTS), bestehend aus der durch *treB* codierten Trehalose-spezifischen Komponente EIIBC<sup>Tre</sup> und aus EIIA<sup>Glc</sup>, ins Zytoplasma aufgenommen und phosphoryliert (Boos et al., 1990; Klein et al., 1995). Das entstehende Trehalose-6-Phosphat wird dann durch die Trehalose-6-Phosphat Hydrolase, dem Genprodukt von *treC*, zu Glukose und Glukose-6-Phosphat abgebaut (Boos et al., 1990; Rimmel und Boos, 1994). Glukose-6-Phosphat ist direkt und Glukose nach Phosphorylierung durch die Glukokinase Glk der Glykolyse zugänglich.

*treB* und *treC* bilden ein Operon, das bei 96,5 min auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert ist (Boos et al., 1990; Klein et al., 1995). Das *treB/C*-Operon wird durch TreR reguliert, dessen Gen, *treR*, direkt vor *treB* liegt (Klein et al., 1995; Horlacher, 1996). Die Expression der Gene des *treB/C*-Operons wird durch Wachstum auf Trehalose induziert, wodurch sich die Transportrate um den Faktor 100 (Klein, 1995) und die TreC-Aktivität

um den Faktor 50-60 steigert (Rimmele, 1995). Dabei hebt Trehalose-6-Phosphat als Induktor die reprimierende Wirkung von TreR auf (Klein et al., 1991; Klein et al., 1995). Bei erhöhter Osmolarität wird der Induktor Trehalose-6-Phosphat durch die Aktivität des osmoinduzierbaren *otsB*-Genproduktes effizient hydrolysiert. Unter diesen Bedingungen ist daher keine Induktion durch Trehalose nachweisbar (Boos et al., 1990; Klein et al., 1995). In Abwesenheit des Induktors nimmt TreR seine Funktion als Repressor wahr und reprimiert die Expression des *treB/C*-Operons (Klein et al., 1995, Horlacher, 1996). Die Transkription ist zudem cAMP-abhängig und unterliegt somit der Katabolit-Repression (Boos et al., 1990).

### 3.2.2.2. Trehalose-Verstoffwechslung bei hoher Osmolarität: TreA

Bei erhöhter Osmolarität des Mediums wird Trehalose durch eine periplasmatisch lokalisierte Trehalase, TreA, gespalten (Boos et al., 1987). Die dabei entstehende Glukose wird dann über das glukosespezifische PTS aufgenommen (Boos et al., 1990). Während TreA bei normaler Osmolarität nur einen Teil der Trehalose-Verstoffwechslung übernimmt, ist die periplasmatische Trehalase bei hoher Osmolarität für das Wachstum auf Trehalose essentiell, denn unter diesen Bedingungen wird das osmosensitive, Trehalose-spezifische PTS nicht exprimiert (s.o.) (Boos, et al., 1987, Boos et al, 1990). Eine zusätzliche, bereits erwähnte Funktion der Trehalase könnte darin bestehen, die beim Wechsel zu niedriger Mediumosmolarität freigesetzte Trehalose wiederverwertbar zu machen und dadurch den Verlust von Trehalose als Energie- und Kohlenstoffquelle zu verringern (Styrvold et al., 1991).

*treA*, das Gen der periplasmatischen Trehalase, wurde bei 26 min auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert und sequenziert (Boos et al. 1987; Gutierrez et al., 1989). Es codiert für ein 565 Aminosäuren großes Vorläuferprotein, welches bei der Prozessierung um die mit 30 Aminosäuren verhältnismäßig lange Signalsequenz verkürzt wird. Das reife Protein hat ein Molekulargewicht von 58 kD (Gutierrez et al., 1989), eine Substrataffinität von 0,78 mM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 66  $\mu\text{mol}$  Trehalose pro min und mg Protein. Das pH-Optimum liegt bei 5,5 (Tourinho-dos-Santos, 1994).

Die Transkription von *treA* ist durch das Zusammenspiel der Sigmafaktoren RpoS und RpoD komplex reguliert. Die Expression von *treA* wird durch erhöhte Osmolarität 10-fach stimuliert (Boos et al., 1987; Gutierrez et al., 1989). Bei nicht-permissiver Temperatur einer Temperatur-sensitiven *rpoD* Mutante ist diese Osmoinduktion jedoch deutlich verringert. In niederosmolarem Medium wird die Expression der Trehalase von dem Histon-ähnlichen DNA-Bindeprotein HNS reprimiert (Repolia und Gutierrez, 1991). Die Transkription von *treA* wird induziert, wenn der Gehalt an zellulärem RpoS beim Übergang in die stationäre Phase oder bei erhöhter Osmolarität ansteigt (Hengge-Aronis, 1991; Lange und Hengge-Aronis, 1994). Die Expression von TreA wird nicht durch Trehalose stimuliert (Boos et al., 1987).



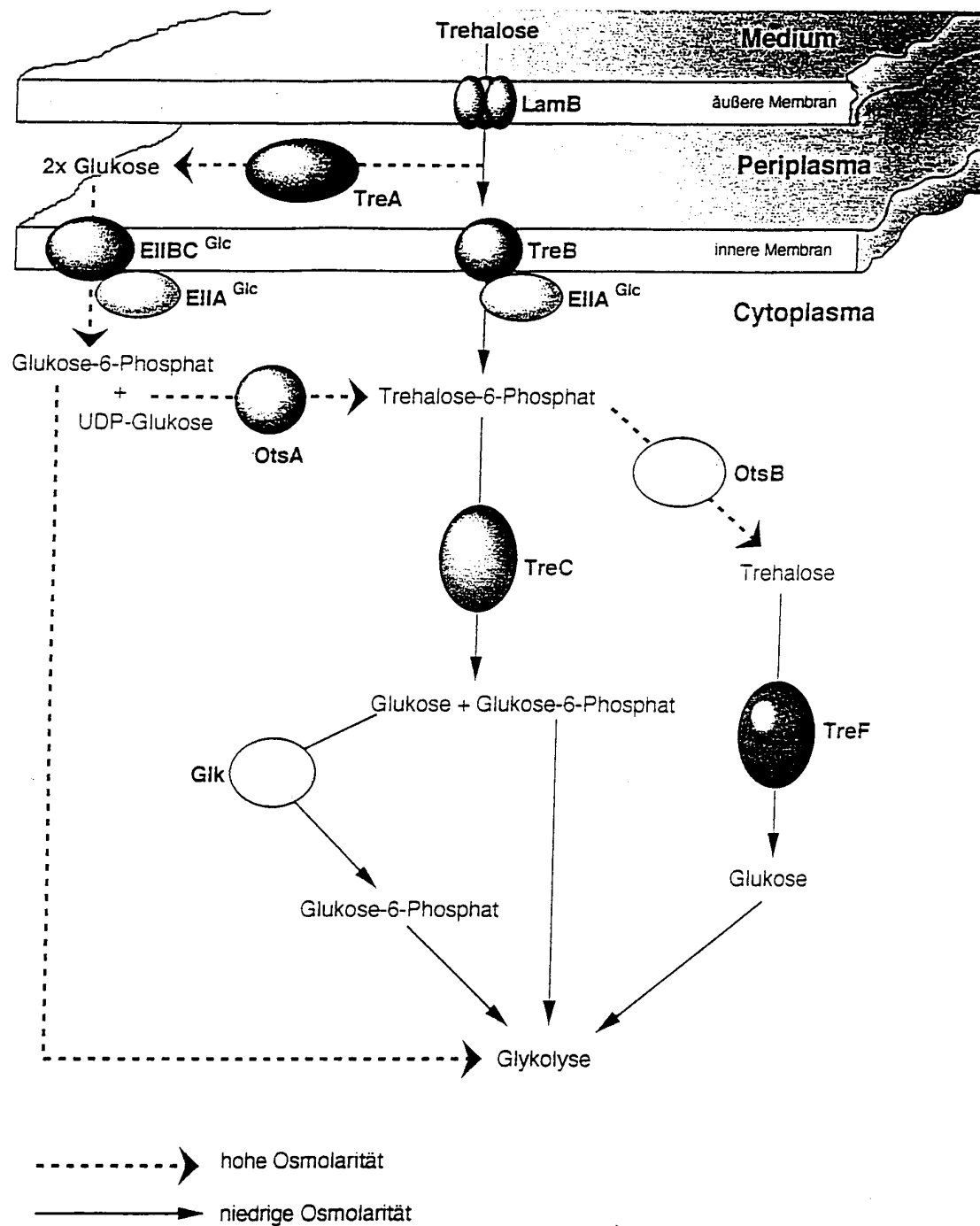


Abb. 3.2.: Trehalose-Stoffwechsel von *E. coli*

Abb. 3.2. veranschaulicht die Trehalose-Synthese und -Abbauwege von *E. coli* bei niedriger und hoher Osmolarität. Diese Abbildung wurde mir freundlicherweise von Reinhold Horlacher zur Verfügung gestellt.

### 3.3. Proteintranslokation in *Escherichia coli*

Das Überleben aller Organismen hängt von der korrekten Lokalisation ihrer Proteine ab. Für ein *gram*-negatives Bakterium, wie *E. coli*, beinhaltet diese den Transport von Proteinen in die Zytoplasmamembran, in den periplasmatischen Raum und in die Außenmembran. Die Translokation der Proteine erfolgt über einen generellen Sekretionsweg. In *E. coli* sind daran die Komponenten SecA, SecE, SecF, SecG, SecY und in vielen Fällen auch SecB beteiligt. Bis auf SecG wurden alle Sec-Proteine von *E. coli* durch verschiedene genetische Selektionen mit LacZ-Hybridproteinen identifiziert (Schatz und Beckwith, 1990).

Homologe zu SecE und SecY wurden auch in Eukaryonten gefunden. Man geht davon aus, daß sie eine Schlüsselrolle bei der Proteintranslokation spielen (Hartmann et al., 1994).

Die Proteintranslokation wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht und von Pugsley (Pugsley, 1993) und Murphy und Beckwith (Murphy und Beckwith, 1996) ausführlich beschrieben. Das heute gängige Modell wird hier in groben Zügen wiedergegeben.

#### 3.3.1. Ablauf der Proteintranslokation

Die erste Sec-Komponente, mit der ein entstehendes Zellhüllprotein interagieren kann, ist das molekulare Chaperon SecB. Dieses nicht essentielle Protein hält eine Auswahl der Zellhüllproteine in einer translokationskompetenten Konformation (Kumamoto et al., 1993, Collier et al., 1988). Im Gegensatz zu SecB ist SecA ein essentielles Protein. Es erkennt Präproteine unabhängig von deren Bindung an ein molekulares Chaperon und transferiert diese an die Membran (Hartl et al., 1990). Durch Interaktion des SecA-Präprotein-Komplexes mit den sauren Phospholipiden der Membran wird die ATPase-Aktivität von SecA stimuliert (Lill et al., 1990; Hendrick und Wickner, 1991; Breukink et al., 1992). Aktiviertes SecA vermittelt dann durch wiederholte Bindung und Freisetzung an den SecE/SecY-Komplex schrittweise den Transfer von jeweils ca. 30 Aminosäuren des zu translozierenden Proteins über die Membran (Basilana und Wickner, 1993; Bieker-Brady und Silhavy, 1992). Die Translokation wird durch ATP-Hydrolyse und durch das elektrochemische Potential an der Zytoplasmamembran energetisiert (Driessen, 1992).

SecE und SecY bilden wahrscheinlich einen Kanal aus, durch den die Translokation der Zellhüllproteine erfolgt (Simon und Blobel, 1992; Joly und Wickner, 1993). An einem späteren Prozeß der Translokation sind außerdem SecD und SecF beteiligt. Diese nicht-essentiellen Membranproteine mit großen periplasmatischen Domänen erleichtern die Translokation auf bisher unbekannte Art und Weise (Gardel et al., 1990; Pogliano und Beckwith, 1994a und b).

*In vitro* wird die Translokationseffizienz durch das mit SecE und SecY assoziiert vorliegende integrale Membranprotein SecG (auch p12 oder band1 genannt) drastisch erhöht (Nishiyama et al., 1993). *In vivo* ist SecG jedoch nicht essentiell (Nishiyama et al., 1994).

Die Signalpeptidase vervollständigt den Proteinexport, indem sie die Signalsequenz des translozierten Proteins abspaltet und dieses ins Periplasma freisetzt (Dalbey und von Heijne, 1992).

### **3.3.2. Die Proteintranslokation in *E. coli* ist in den meisten Fällen nicht an die Proteinsynthese gekoppelt**

Im endoplasmatischen Reticulum von Säugern führen die Inhibition der Präprotein-Synthese im Zytosol durch das 'Signal-Recognition-Particle' (SRP) und die Aufhebung dieser Blockierung durch das 'docking protein' an der Membran zu einer Kopplung von Translation und Translokation (Walter et al., 1984). Dadurch ist es möglich, Proteine als gestreckte Polypeptidketten ohne vorherige Faltung im Zytoplasma zu translozieren.

In *E. coli* wurden Ffh und 4,5S RNA als Homologe zum SRP und FtsY als Homologes zum 'docking protein' identifiziert. Ffh, 4,5S RNA sowie FtsY sind *in vivo* essentiell. Ffh und 4,5S RNA können die Funktion von SRP *in vitro* funktionell ersetzen. Weder die Depletion von Ffh noch die der 4,5S RNA führen jedoch zu einer ausgeprägten Vorläufer-Akkumulation, lediglich Prä- $\beta$ -Lactamase reichert sich deutlich im Zytoplasma an (zitiert in Murphy und Beckwith, 1996).

Neuere Arbeiten deuten darauf hin, daß Ffh, 4,5 S RNA und FtsY für die Insertion einiger Membranproteine erforderlich sind (Ulbrandt et al., 1997).

Mit Ausnahme dieser Proteine der Zytoplasmamembran ist die Proteintranslokation in *E. coli* nicht an die Proteinsynthese gekoppelt (Verner und Schatz, 1988). Vielmehr setzt die Translokation erst ein, nachdem bereits ein Großteil des Vorläufers oder das gesamte Protein translatiert wurden (Josefsson und Randall, 1981). In *E. coli* scheinen demnach sowohl ko- als auch posttranslationaler Export zu existieren.

Die Faltung von Proteinen über die Sekundärstruktur hinaus beeinträchtigt deren Exportfähigkeit (Randall und Hardy, 1986). Um die Translokationskompetenz von Zellhüllproteinen im Zytoplasma aufrecht zu erhalten, muß die Faltung daher verlangsamt oder unterbunden werden.

### 3.3.3. Eigenschaften, die die Translokationskompetenz eines Proteins beeinflussen

#### 3.3.3.1. Aufbau und Funktion der Signalsequenz

Das wichtigste topogene Signal für die Translokation eines Proteins ist seine Signalsequenz. Signalsequenzen von *E. coli* sind zwischen 18 und 30 Aminosäuren lang. Sie teilen keine Sequenzhomologie, lassen sich aber über ihre Zusammensetzung aus drei typischen Segmenten beschreiben. Dies sind der N-Terminus mit mindestens einer positiven Ladung, ein Bereich von 7-10 hydrophoben Aminosäuren sowie ein polarer C-Terminus. Der C-Terminus beginnt oft mit einer Helix-brechenden Aminosäure und enthält eine Schnittstelle für die Signalpeptidase. Dieser Schnittstelle gehen in den meisten Fällen Aminosäuren mit kleinen Resten an den Positionen -3 und -1 voraus, wobei an Position -1 fast immer ein Alanin sitzt (von Heijne, 1990).

Für die Signalsequenz werden vielfältige Funktionen diskutiert:

- Die positive Ladung am N-Terminus der Signalsequenz ist für die Effizienz der Translokation wichtig. Man nimmt an, daß sie die Orientierung der Signalsequenz bestimmt, indem sie sich - in Verbindung mit SecA - an die sauren Phospholipide im Inneren der Zytoplasmamembran anlagert (Phoenix et al., 1993; Sasaki et al., 1990). Das hydrophobe Segment hat eine starke Tendenz, in der unpolaren Umgebung der Zytoplasmamembran eine  $\alpha$ -Helix auszubilden. Es trägt möglicherweise dazu bei, den polaren C-Terminus der Signalsequenz in die Zytoplasmamembran zu ziehen, wo dann die Prozessierung durch die Signalpeptidase stattfinden kann.
- In *in vitro* Studien kann die Signalsequenz die Ausbildung des Translokationskanals stimulieren (Simon und Blobel, 1992).
- Die Signalsequenz erniedrigt *in vitro* die Faltungsrate von  $\beta$ -Lactamase, Maltose- und Ribose-Bindeprotein ca. um den Faktor drei (Lamiet und Plückthun, 1989; Liu et al., 1989). Man nimmt an, daß diese Zellhüllproteine dadurch länger in einer translokationskompetenten Konformation gehalten werden.
- Die Signalsequenz wird des Weiteren von dem Chaperon SecB erkannt (Watanabe und Blobel, 1989), ist aber nicht für eine Interaktion mit SecB notwendig (Derman et al., 1993a; Randall et al., 1990).

#### 3.3.3.2. *prl*-Mutanten

*prl*-Mutanten wurden in einer genetischen Selektion als Suppressoren von Signalsequenzdefekten isoliert. (*prl* steht für 'protein localization'.) Die Suppressormutationen traten vorwiegend in den Genen *secY* (*prlA*), *secA* (*prlD*) und *secE* (*prlG*) auf und zeigen, daß Änderungen in den Komponenten des normalen Translokationsapparates die Erkennung und Translokation von Proteinen mit defekter Signalsequenz zulassen können (Schatz und Beckwith, 1990). Für die Proteine alkalische Phosphatase, Maltose-Bindeprotein, LamB und  $\beta$ -Lactamase konnte gezeigt werden, daß sie im *prlA*-Stamm selbst dann transloziert werden, wenn sie ohne ihre Signalsequenz exprimiert werden (Derman et al., 1993a; Bowden et al., 1992; Flower et al., 1994). Während die Translokation der Wildtyp-alkalischen Phosphatase unabhängig von SecB erfolgt, hängt

die der Signalsequenz-los exprimierten alkalischen Phosphatase von SecB ab (Derman et al., 1993a).

Die Translokation ohne Signalsequenz exprimierter Proteine erfolgt zwar langsamer als die Translokation der entsprechenden Vorläuferproteine, mit einem Export von bis zu 40 % des exprimierten Proteins ist sie dennoch verhältnismäßig effizient. In einem Wildtyp-Stamm werden nur maximal 1 - 2 % der Signalsequenz-los exprimierten Proteine in der Zellhülle gefunden (Flower et al., 1994).

Würden zytoplasmatische Proteine im *prlA*-Stamm genauso effizient transloziert werden wie Zellhüllproteine ohne Signalsequenz, dann wären *prlA*-Stämme wegen Überlastung des Translokationsapparates vermutlich nicht lebensfähig. Bei einem Vergleich zweidimensionaler Gele von Sphäroplastenfraktionen eines *prlA*-Mutanten und eines *prlA*-Wildtypstammes konnten keine Unterschiede festgestellt werden (D. Boyd, persönliche Mitteilung, Derman et al., 1993). Die bisher getesteten zelleigenen zytoplasmatischen Proteine können selbst dann nicht effizient über die Zytoplasmamembran transportiert werden, wenn an ihren N-Terminus eine Signalsequenz fusioniert ist (Lee et al., 1989). Der Translokationsapparat scheint also unabhängig von der Signalsequenz in der Lage zu sein, zwischen zytoplasmatischen Proteinen und Proteinen der Zellhülle zu differenzieren. Die Tatsache, daß eine weitere Signalsequenz-Suppressormutation, *prlC*, nicht in einem der *sec*-Gene, sondern in der Ausschaltung einer Oligopeptidase besteht (Conlin et al., 1992), ist ein Hinweis dafür, daß eine kinetische Konkurrenz zwischen der Rate der Translokation und der des Abbaus stattfindet.

### **3.3.3.3. Einfluß der Sequenz des reifen Teils eines Proteins auf seine Translokationskompetenz**

Wie aus der Eigenschaft der *prl*-Mutanten, Zellhüllproteine auch ohne Signalsequenz zu erkennen und zu translozieren sowie aus der geringen Effizienz der Translokation zytoplasmatischer Proteine mit Signalsequenz hervorgeht, muß es neben der Signalsequenz auch innerhalb des reifen Teils eines Proteins Informationen geben, welche über seine Translokationsfähigkeit entscheiden.

Beliebige Regionen der Gene der beiden Außenmembranproteine OmpA und PhoE können deletiert werden, ohne daß ihre Genprodukte die Translokationsfähigkeit verlieren. Diese Experimente sowie der Befund, daß weitaus weniger Mutationen im reifen Teil eines Proteins als in der Signalsequenz zu einer Hemmung der Translokation führen, sprechen dafür, daß der reife Teil eines Proteins nicht über positive Exportsignale verfügt. Im Gegensatz dazu gibt es einige Eigenschaften, die die Translokation von Proteinen über die Zytoplasmamembran beeinträchtigen oder unterbinden. Dazu gehören positive Ladungen direkt C-terminal zur Schnittstelle der Signalpeptidase sowie lange hydrophobe Bereiche, die sich wie Stop-Transfer-Signale in Proteinen der Zytoplasmamembran auswirken (MacIntyre und Henning, 1990).

#### 3.3.3.4. Einfluß der Faltungsgeschwindigkeit auf die Translokationskompetenz eines Proteins

Die Flexibilität der Polypeptidkette ist eine Voraussetzung für ihre erfolgreiche Translokation. Anhand des Maltose-Bindeproteins konnte gezeigt werden, daß ein Zusammenhang zwischen der Exportkompetenz und der Abwesenheit einer Tertiärstruktur besteht (Randall und Hardy, 1986). Mutationen, die die Faltung von Maltose- bzw. Ribose-Bindeprotein verlangsamen, können Translokationsdefekte supprimieren, die sowohl durch Signalsequenz-Mutationen als auch durch fehlendes SecB hervorgerufen werden (Collier und Bassford, 1989; Cover et al., 1987; Liu et al., 1988; Teschke et al., 1991).

Wenn der Faltungszustand eines Proteins tatsächlich die entscheidende Rolle für die Translokation spielt, müßten sich Zellhüllproteine im Zytoplasma langsamer falten als zytoplasmatische Proteine. Neben dem oben erwähnten Einfluß von Signalsequenzen auf die Faltung von Proteinen könnten auch intrinsische Faltungseigenschaften eines Proteins oder die Beteiligung von Chaperonen für die verschiedenen Faltungsgeschwindigkeiten verantwortlich sein.

#### 3.3.3.5. Einfluß von molekularen Chaperonen auf die Translokationskompetenz eines Proteins

Molekulare Chaperone wurden ursprünglich als Proteine definiert, die bei der korrekten Zusammensetzung oligomerer Proteine assistieren. Der Begriff ist inzwischen unter anderem um Proteine erweitert worden, die die Vorläufer sekretorischer Polypeptidketten in einer exportkompetenten Konformation halten (Ellis und Henningsen, 1989). (Molekulare Chaperone werden im folgenden Kapitel erläutert. Hier soll lediglich ihre Rolle in der Translokation behandelt werden.)

*E. coli* verfügt über ein molekulares Chaperon, SecB, welches für die Proteintranslokation spezialisiert ist. SecB bindet *in vitro* unspezifisch ungefaltete Proteine. *In vivo* dagegen ist es hoch selektiv und beschränkt seinen Einfluß auf eine Gruppe von Zellhüllproteinen. Dazu gehören z.B. die Vorläufer vom Maltose-Bindeprotein, OmpA, LamB, OmpF sowie dem periplasmatischen Oligopeptid-Bindeprotein. Für alkalische Phosphatase, Ribose-Bindeprotein, TEM- $\beta$ -Lactamase und das Braunsche Lipoprotein konnte dagegen eine SecB unabhängige Translokation nachgewiesen werden (Kumamoto und Francetic, 1993; Randall und Hardy, 1995).

In Peptid-Bindungs-Experimenten wurden Peptide mit positiver Ladung und flexibler Konformation als beste Substrate für SecB ermittelt. Die Bindung solcher geladener Substrate bewirkt eine Konformationsänderung in SecB, durch die seine hydrophoben Bindestellen dem Substrat zugänglich werden (Randall, 1992). Im Vorläufer des Maltose-Bindeproteins konnten drei vorwiegend positiv geladene Bereiche bestimmt werden, welche an SecB binden. Sie sind jeweils von hydrophoben Sequenzen flankiert (Topping und Randall, 1994). Aus diesen Befunden postulierten Randall und Mitarbeiter eine zweistufige Substraterkennung durch SecB. Diese soll das molekulare Chaperon in die Lage versetzen, zuverlässig zwischen gefalteten und ungefalteten Proteinen zu unterscheiden, denn nur in ungefalteten Proteinen ist die anfängliche Interaktion mit positiven

Ladungen von einer Wechselwirkung mit hydrophoben exponierten Domänen gefolgt (Randall, 1992; Topping und Randall, 1994).

Während mit diesem Modell erklärt werden kann, wie SecB zwischen gefalteten und ungefalteten Proteinen unterscheiden kann, bleibt unklar, wie die Differenzierung zwischen Zellhüll- und zytoplasmatischen Proteinen erfolgt. Die für Exportproteine charakteristische Signalsequenz verfügt eindeutig über die beiden Strukturmerkmale, positive Ladung gefolgt von einer hydrophoben Sequenz, die zur Interaktion mit SecB führt (vonHeijne, 1990). Für eine erfolgreiche Translokation ist jedoch auch die Interaktion von SecB mit dem reifen Teil der Polypeptidkette erforderlich. Die Signalsequenz vermittelt hier möglicherweise indirekt die Bindung mit SecB, indem sie die spontane Faltung der Polypeptidkette verzögert. Unabhängig von der Signalsequenz führt auch eine Verlangsamung der Faltung *in vitro* zu einer verstärkten Bindung an SecB. Generell scheint also eine kinetische Konkurrenz zwischen der Faltung und der Assoziation mit SecB bzw. einem anderen molekularen Chaperon darüber zu entscheiden, ob ein Protein im Zytoplasma bleibt oder dem Translokationsapparat zugeführt wird (Hardy und Randall, 1991).

Im Gegensatz zu anderen Chaperonen des Zytoplasmas (s.u.) hat SecB keine ATPase-Aktivität. SecB interagiert jedoch mit SecA, dessen ATPase-Aktivität an der Membran induziert wird, die Translokation über die Membran energetisiert und damit auch für eine wohlgeordnete Freisetzung des Vorläuferproteins von SecB bewirkt (s.o.).

Da SecB selektiv nur die Translokation bestimmter Proteine vermittelt, ist zu vermuten, daß SecB-unabhängige Proteine auf andere molekulare Chaperone angewiesen sind. Über die Rolle, die die Chaperone HtpG, DnaK/J und GroEL/S bei der Translokation spielen, ist nur wenig bekannt. So beeinträchtigen Mutationen in Genen von GroEL und GroES z.B. die Translokation von  $\beta$ -Lactamase (Kusakawa et al., 1989). Da DnaK und DnaJ in einigen Stämmen SecB funktionell ersetzen können (Wild et al., 1992) und die Entfernung molekularer Chaperone zu einer erhöhten Expression von SecB führt (Müller, 1996), vermutet man, daß molekulare Chaperone bei der Proteintranslokation synergistisch wirken könnten.

### 3.4. Proteinfaltung in *E. coli*

Aus seinen Rückfaltungsstudien mit Ribonuklease A schloß Anfinsen, daß die gesamte Information für die Ausbildung der nativen Struktur eines Proteins in seiner Aminosäuresequenz enthalten ist (Anfinsen, 1973). Bei niedrigerer Temperatur, geringer Proteinkonzentration und geeignetem Puffer ist die Rückfaltung kleiner globulärer Proteine in der Tat ein spontaner Prozeß. Durch hydrophobe Wechselwirkungen kollabiert die gestreckte Polypeptidkette innerhalb weniger Millisekunden zu einem kompakten Zwischenprodukt (*molten globule*) und faltet sich dann zur nativen Konformation. Letzterer Schritt kann mehrere Faltungs-Zwischenstufen beinhalten und dauert gewöhnlich Sekunden bis Minuten. Bei hoher Proteinkonzentration und erhöhter Temperatur konkurriert die langsame Faltung jedoch mit einer irreversiblen Aggregation

der Polypeptidkette. Anhand der aus Zellvolumen und Ribosomenzahl angenommenen Ribosomenkonzentration in der Zelle wird die Konzentration an sich faltenden Polypeptidketten im Zytoplasma auf ca. 50  $\mu\text{M}$  geschätzt (Darnell et al., 1986). Die Konzentration liegt damit um ein Vielfaches über der in Rückfaltungsexperimenten tolerierten.

Im Gegensatz zur *in vivo*-Situation liegt bei der Rückfaltung von gereinigtem Protein von Anfang an die gesamte Polypeptidkette vor. Aggregation könnte *in vivo* durch eine vektorielle Proteinfaltung verhindert werden, die sofort eintritt, sobald das Protein aus dem Ribosom ins Zytoplasma oder aus dem Translokationsapparat ins Periplasma gelangt. Es gilt jedoch als gesichert, daß die Faltung einzelner Domänen kooperativ verläuft. Bevor die Faltung stattfindet, sollte deshalb mindestens die Sequenz einer Domäne synthetisiert bzw. transloziert sein. Die noch ungefaltete Polypeptidkette wird dann mit den Bedingungen von Zytoplasma bzw. Periplasma konfrontiert. (Mayhew und Hartl, 1996)

Da diese äußeren Bedingungen eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Proteinfaltung spielen, sollen sie kurz für die beiden *E. coli*-Kompartimente Zytoplasma und Periplasma beschrieben werden.

### 3.4.1. Faltungsbedingungen im Zytoplasma und im Periplasma von *E. coli*

Wie *in vitro*-Experimente zeigen, ist die Proteinkonzentration für eine erfolgreiche Faltung von entscheidender Bedeutung. Für das Zytoplasma von *E. coli* wird eine Gesamtkonzentration an Proteinen und Ribosomen von 340 mg/ml angenommen. Makromoleküle in diesen Konzentrationen nehmen einen signifikanten Teil des Zellvolumens ein. Sie bewirken, daß die effektive Konzentration entstehender Polypeptidketten noch höher ist als die aufgrund der Ribosomenzahl und des Zellvolumen angenommenen Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (‘molecular crowding’-Effekt) (Zimmermann und Minton, 1993). Da die Ribosomen zudem noch oft dicht in Polysomen aufgereiht sind, muß man davon ausgehen, daß die neusynthetisierten Polypeptidketten miteinander in Wechselwirkung treten, wenn ihre Interaktion nicht durch molekulare Chaperone (s.u.) verhindert wird.

Verschiedene Methoden zur Volumenbestimmung des periplasmatischen Raumes liefern unterschiedliche Ergebnisse, nach denen das Periplasma zwischen 8 und 40 % des *E. coli*-Gesamtvolumen ausmacht. Bei einem angenommenen Volumen von 20 % würde das Maltose-Bindeprotein 40 % des periplasmatischen Raumes ausfüllen (vanWielink und Duine, 1990). Auch wenn diese Berechnung nur auf groben Schätzungen beruht, läßt sie darauf schließen, daß die Proteine im periplasmatischen Raum dicht gedrängt vorliegen und daß ein hochviskoses Milieu mit wenig frei verfügbarem Wasser vorherrscht. Dieser Gel-artige Zustand des Periplasma steht in Einklang mit der geringen Proteimbeweglichkeit, die in diesem Kompartiment anhand des lateralen Diffusionskoeffizienten bestimmt wurde. Sie ist im Periplasma 100 mal niedriger als im Zytoplasma und dort 10 mal niedriger als in Wasser (Brass et al., 1986). Der Gel-artige Zustand des Periplasmas erklärt auch, daß das Periplasma bei nieder-osmolaren Bedingungen auch



dann nicht komprimiert wird, wenn die Synthese der membrane-derived oligosaccharides (MDO) unterbleibt (Oliver, 1996).

Wie bereits in Kapitel 3.2.1. erwähnt, variiert die Osmolarität innerhalb der Zelle in weiten Bereichen. Im Zytoplasma werden bei hoher Osmolarität bevorzugt physiologisch verträgliche Osmolyte angereichert, wodurch u.a. die Störung der Faltung gering gehalten werden soll (vergl. Kapitel 3.2.1.2.).

Der pH-Wert beeinflusst den Protonierungsgrad eines Proteins und wirkt sich dadurch auch auf die Wechselwirkungen einer Polypeptidkette während der Faltung aus. Im Zytoplasma erhält *E. coli* in einem externen pH-Bereich von pH 5-9 seinen internen pH-Wert mit pH 7,4 - 7,8 relativ konstant (Slonczewski und Foster, 1996). Der pH-Wert des Periplasmas hängt von der aeroben Atmung, dem Donnan-Potential und über die Porine auch vom pH-Wert des Außenmediums ab (Stock et al., 1977). Um einen positiven Beitrag zum Protonenpotential und damit auch zur Atmungsketten-Phosphorylierung zu leisten, müßte der pH-Wert des Periplasmas unter dem des Zytoplasmas liegen.

Das Redox-Gleichgewicht wird im Zytoplasma von *E. coli* hauptsächlich durch das Cystein-haltige Tripeptid Glutathion gepuffert, dessen intrazelluläre Konzentration ca. 5 mM beträgt (Kosower und Kosower, 1978). Mit einem Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion zwischen 50 : 1 und 200 : 1 herrscht im Zytoplasma ein reduzierendes Milieu vor (Hwang et al., 1992). Dieses wird durch die Aktivität des Flavoproteins Glutathion Reduktase aufrecht erhalten, welches oxidiertes Glutathion in einem NADPH-abhängigen Mechanismus reduziert. Glutathion reduziert seinerseits die Glutaredoxine 1, 2 und 3 (Holmgren et al., 1979). Diese Disulfid-Oxido-Reduktasen haben ein Redoxpotential zwischen -233 und -198 mV (Aslund et al., 1996). Thioredoxin, eine weitere Disulfid-Oxido-Reduktase im Zytoplasma von *E. coli*, hat mit -270 mV ein niedrigeres Redoxpotential (Krause et al., 1991). Zumindest *in vitro* ist es damit in der Lage, die Disulfidbrücken vieler Proteine effizient zu reduzieren (Aslund et al., 1996). Das redoxaktive Disulfid von Thioredoxin wird direkt durch das NADPH-abhängige Flavoprotein Thioredoxin Reduktase reduziert (Holmgren, 1989).

Thioredoxin und die Glutaredoxine werden in *E. coli* benötigt um zytoplasmatische Proteine, wie z.B. die Ribonukleotid Reduktase und die Methionin Reduktase, zu reduzieren und damit ihren katalytischen Zyklus zu schließen (Holmgren, 1989). Möglicherweise reduzieren sie auch nicht native Disulfidbrücken zytoplasmatischer Proteine (Prinz et al., 1997).

Im Gegensatz zu zytoplasmatischen Proteinen enthalten periplasmatische Proteine häufig Disulfidbrücken. Das Redoxpotential im Periplasma ist mit -0,089 V oxidierend. Die Disulfidbrücken-Bildung kann durch zwei verschiedene Disulfid-Oxido-Reduktasen, DsbA und DsbC, katalysiert werden (Bardwell et al., 1991; Missiakas, 1994). Während DsbA für die Oxidation von Disulfidbrücken verantwortlich ist (Bardwell et al., 1991), übernimmt DsbC vorwiegend die Isomerisierung von Disulfidbrücken (Rietsch et al., 1996). DsbA wird durch das integrale Membranprotein DsbB reoxidiert (Bardwell et al., 1993). Für die Reoxidation von DsbC wird eine Beteiligung des Membranproteins DipZ (DsbC) und des zytoplasmatischen Thioredoxins vorgeschlagen (Rietsch et al., 1996).

Neben diesen Disulfidbrücken-Oxidasen und -Isomerasen sind in *E. coli* als weitere Faltungskatalysatoren noch die Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen bekannt. Sie kommen sowohl im Zytoplasma (PpiB und Trigger-Faktor) (Hayano et al., 1991; Callebaut und Mornon, 1995; Hesterkamp et al., 1996), als auch im Periplasma vor (RotA, SurA und FkpA) (Liu und Walsh, 1990; Tormo, 1990; Lazar und Kolter, 1996, Missiakas et al., 1996; Wülfling et al., 1994).

Diese Faltungskatalysatoren sind notwendig, um Faltungsschritte zu beschleunigen, die *in vitro* oft Stunden oder sogar Tage erfordern (Gilbert, 1993).

Die Bedingungen, mit denen ein neu synthetisiertes bzw. transloziertes Protein *in vivo* konfrontiert wird, unterscheiden sich drastisch von den optimalen Faltungsbedingungen *in vitro*. Eine erfolgreiche Faltung *in vivo* wäre nicht möglich, wenn die Wechselwirkungen zwischen den Polypeptidketten nicht kontrolliert würden. Diese Aufgabe übernehmen molekulare Chaperone (Mayhew und Hartl, 1996).

### 3.4.2. Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone vermitteln die korrekte Faltung von Polypeptidketten, stellen selbst aber keine Komponenten der funktionellen Endstruktur dar (Ellis, 1989). Sie beeinflussen den Faltungszustand des Proteins ohne chemische Modifikation (Hubbard et al., 1991) und unterscheiden sich dadurch von den oben beschriebenen Katalysatoren der Proteinfaltung, den Disulfid-Oxido-Reduktasen und den Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen.

#### 3.4.2.1. Beteiligung zytoplasmatischer Chaperone an der *de-novo*-Proteinfaltung

Zu den bekannten Chaperonen im Zytoplasma von *E. coli* gehören das bereits erwähnte translokationsspezifische SecB und die Hitzeschock-Proteine DnaK, DnaJ und GroEL.

Die Struktur von DnaK ist gut untersucht. Dieses Mitglied der Hsp70-Familie besteht aus einer ATPase-Domäne und einer substratbindenden Domäne. Die Stärke der Polypeptidbindung durch DnaK wird durch die Besetzung der Nukleotidbindestelle in der ATPase-Domäne mit ATP bzw. ADP beeinflusst. Der Nukleotid-Bindezustand von DnaK wird durch das molekulare Chaperon DnaJ (Hsp40) und GrpE, ein Hitzeschockprotein ohne Chaperon-Funktion, moduliert (Mayhew und Hartl, 1996). Hartl und Kollegen schlagen folgendes Modell für die Wirkungsweise von DnaK, DnaJ und GrpE bei der *de-novo*-Proteinfaltung vor:

DnaJ bindet die ungefaltete Polypeptidkette sobald sie aus dem Ribosom austritt und präsentiert sie DnaK im `ATP-beladenen` Zustand. DnaJ aktiviert gleichzeitig die ATP-Hydrolyse durch DnaK und sorgt so dafür, daß DnaK in den `ADP-beladenen` Zustand übergeht, in dem das Substratpeptid stärker gebunden wird. Der Komplex aus DnaK, DnaJ und dem Substratpeptid wird durch die Beteiligung von GrpE gelockert, welches die Dissoziation von ADP von DnaK katalysiert. Erneute ATP-Bindung setzt dann das Polypeptid frei. In diesem Stadium kann sich das Polypeptid falten, wiederholt an DnaK

und DnaJ binden oder an GroEL transferiert werden (Langer et al., 1992; Szabo et al., 1994).

GroEL ist ein Mitglied der Hsp60-Familie. Zusammen mit seinem Regulator GroES ist dieses essentielle Protein für die *de-novo*-Synthese einer Vielzahl von Proteinen notwendig (Horwich et al., 1994). Es vermittelt außerdem die Proteindegradation und ist an der Assemblierung von Multiproteinkomplexen beteiligt (Goloubinoff et al., 1989). GroEL hat schwache ATPase-Aktivität und seine Interaktion mit ungefaltetem Protein wird - ebenso wie die von DnaK - durch ATP-Bindung und -Hydrolyse reguliert. GroES koppelt die ATP-Hydrolyse durch GroEL mit produktiver Proteinfaltung (Mayhew und Hartl, 1996).

#### 3.4.2.2. Potentielle generelle Chaperone im Periplasma

Im Gegensatz zu den gut studierten Chaperonsystemen im Zytoplasma von *E. coli* ist nur wenig über generelle Chaperone bekannt, die die Faltung translozierter Proteine in der Zellhülle assistieren. Da im Periplasma keine Energie in Form von Nukleosidtriphosphaten verfügbar ist, kommen ATP-abhängige Chaperonmechanismen, wie sie im Zytoplasma zu finden sind, in diesem 'Kompartiment' nicht in Frage. Die Chaperone müssen in ihrer Wirkungsweise auch von dem ATP-unabhängigen SecB verschieden sein, denn im Gegensatz zur Anti-Faltungsfunktion von SecB sollen sie ja die Ausbildung der nativen Konformation fördern.

Mehrere Studien an  $\beta$ -Lactamase und Maltose-Bindeprotein zeigen, daß eine Freisetzung der Proteine ins Periplasma nur dann erfolgt, wenn diese in einer korrekt gefalteten Konformation vorliegen (Fitts et al., 1987; Minsky et al., 1986; Ito und Beckwith, 1981). Auch alkalische Phosphatase, die nicht in der Lage ist, korrekte Disulfidbrücken auszubilden, kann nicht vom Translokationsapparat freigesetzt werden (Kamitani et al., 1992). Zumindest ein Teil der Proteinfaltung im Periplasma findet also statt, solange das Protein noch mit der Membran in Verbindung ist. Es ist anzunehmen, daß Faltung und Freisetzung von Chaperonen vermittelt wird. Die Identität der Chaperone ist jedoch unbekannt.

Da die Behandlung von Sphäroplasten mit Anti-SecD-Antikörpern die Freisetzung von Maltose-Bindeprotein (MBP) verzögert und diese in einem nicht nativen Zustand verbleiben, wurde spekuliert, daß SecD an der Faltung und Freisetzung dieses periplasmatischen Proteins beteiligt sein könnte (Matsuyama et al., 1993). Die beiden Befunde, daß der letzte Faltungsschritt von MBP - gekennzeichnet durch Erlangung der Trypsin-Resistenz - vom Membranpotential abhängt (Gardel et al., 1990), und daß SecD zur Aufrechterhaltung desgleichen erforderlich ist (Arkowitz und Wickner, 1994), unterstützen diese Vermutung.

Ein weiteres potentiell Chaperon der Zellhülle ist Skp. Dieses periplasmatische Protein bindet hochselektiv an Außenmembranproteine. In einer *skp*-Mutante sind deutlich weniger Porine in der Außenmembran enthalten als in einem *skp*-Wildtypstamm (Thomae und Müller, 1991; Chen und Henning, 1996). In *skp*-Mutanten ist außerdem das *rpoE* Regulon induziert (Missiakas et al., 1996), welches spezifisch auf falsch gefaltete

Proteine im Periplasma reagiert (Raina et al., 1995). Skp unterstützt also möglicherweise speziell die Biogenese von Außenmembranproteinen.

Die periplasmatischen Protease DegP (HtrA), deren Expression ebenfalls durch RpoE kontrolliert wird (Lipinska et al., 1988), stellt einen weiteren potentiellen Kandidaten für ein periplasmatisches Chaperon dar. Bass et al. (Bass et al., 1996) postulieren, daß DegP möglicherweise neu translozierte bzw. denaturierte Proteine bindet, welchen sie dann - gemäß den zytoplasmatischen Chaperonen GroEL/S und DnaK/J - durch wiederholte Bindung und Freisetzung zur richtigen Faltung verhelfen könnte. Ist eine effiziente Faltung dieser Proteine nicht möglich, würden sie durch die Serin-Protease-Aktivität von DegP abgebaut werden. Diese Hypothese gründet im Wesentlichen auf der Entdeckung eines Mitglieds der HtrA-Familie aus *Rickettsia tsutsugamushi* (RKR47kDA\_1), bei dem alle drei Aminosäurereste des proteolytisch aktiven Zentrums ausgetauscht sind (Bass et al., 1996).

### 3.4.2.3. Substraterkennung durch molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone erkennen ihre Substrate nicht über spezifische Erkennungssequenzen, sondern anhand von Strukturmerkmalen. Um die Eigenschaften herauszufinden, die ein Substrat haben muß um mit Mitgliedern der Hsp70-Familie zu interagieren, wurden aus einem Gemisch von 'Zufallspeptiden' solche herausselektioniert, die die ATPase-Aktivität von BiP, dem Hsp70-Homologen aus dem Endoplasmatischen Reticulum von Säugerzellen, stimulieren. Die Peptide waren vorwiegend hydrophob und 7 Aminosäuren lang (Flynn et al., 1991). In einem weiteren Experiment wurde die Sequenz von Octa- bzw. Decapeptiden ermittelt, die gut an Bip binden, wenn sie in Phagen exponiert sind. In diesen Peptiden ist jede zweite Position mit einer aromatischen oder hydrophoben Aminosäure besetzt. Dieser Befund spricht für eine Bindung an Hsp70 in einer gestreckten Konformation (Blond-Elguindi, 1993). NMR-Studien an DnaK stützen diese Vermutung (Landry, 1992).

GroEL interagiert mit den hydrophoben Oberflächen von Polypeptiden, die in einer kompakten aber flexiblen Konformation ('molten globule') vorliegen (Martin et al., 1991). Es erkennt sowohl  $\alpha$ -Helix- (Landry und Gierasch, 1991), als auch  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (Schmidt und Buchner, 1992) und unterscheidet sich dadurch von DnaK, welches bevorzugt mit Polypeptiden ohne Sekundärstruktur interagiert.

Ebenso wie GroEL interagiert aber auch SecB mit Proteinen, die zwar Sekundärstrukturen aber keine Tertiärstruktur ausgebildet haben. Wie translozierte von zytoplasmatischen Proteinen unterschieden werden ist trotz intensiver Untersuchung der molekularen Chaperone unklar.

`We dance in a circle and suppose,  
but the secret sits in the middle and knows.`

### 3.5. Aufgabenstellung

Natürlich vorkommende Isoenzyme, die in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert sind, stellen ein besonders geeignetes System dar, um die Anpassung von Proteinen an die zelluläre Lokalisation zu untersuchen. Mit der Identifizierung von TreF von *E. coli* (Sofia et al., 1994) wurde ein homologes Enzym paar mit Vertretern im Zytoplasma und im Periplasma bekannt.

Die Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Trehalase TreF und die der periplasmatischen Trehalase TreA weisen ca. 47 % Sequenzidentität auf. Sie sind vermutlich durch Genduplikation auseinander hervorgegangen. Die seitdem entstandenen Sequenzunterschiede der beiden Trehalasen könnten sich auf die enzymatischen Eigenschaften einerseits und auf die Translokations- und Faltungseigenschaften andererseits auswirken.

Um die enzymatischen Eigenschaften der beiden Trehalasen zu vergleichen, sollte die zytoplasmatische Trehalase zunächst gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Zu den enzymatischen Eigenschaften von TreA lagen bereits Daten von Tourinho-dos-Santos vor (Tourinho-dos-Santos et al., 1994).

Anschließend sollte *in vivo* untersucht werden, inwieweit die Trehalasen hinsichtlich ihrer Translokations- und Faltungseigenschaften auf ihr Kompartiment spezialisiert sind. Das Ziel war, herauszufinden, ob die Signalsequenz allein ausreicht, um das Translokationsverhalten der Trehalasen zu verändern. Außerdem sollte das Faltungsverhalten der Trehalasen in den ihnen jeweils fremden Kompartimenten studiert werden.

Für diese Untersuchungen war die Klonierung zweier verschiedener Trehalase-Konstrukte, TreA ohne und TreF mit Signalsequenz, erforderlich. Diese Konstrukte sollten in geeigneten Teststämmen mittels Western Blots, Trehalase-Aktivitätstests und kalten osmotischen Schocks auf ihre Expression, Löslichkeit, Aktivität und Lokalisation überprüft und mit dem Verhalten der Wildtyp-Trehalasen verglichen werden.

Um die Translokationseigenschaften unabhängig von der Signalsequenz zu untersuchen, sollte getestet werden, ob sich die Trehalasen ohne Signalsequenz in einem *prlA4*-Stamm translozieren lassen.

Wenn möglich, sollten diese Untersuchungen durch Hybride aus TreA und TreF ergänzt werden.