

## **6. Diskussion**

Die hohe Homologie von TreA und TreF legt nahe, daß die beiden Trehalasen durch Genduplikation auseinander hervorgegangen sind. Für die Untersuchung des Enzympaars ergaben sich daraus die drei Fragestellungen:

- Wie sind die Trehalasen an ihr jeweiliges 'Kompartiment' angepaßt?
- Benötigen die 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?

Im folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit im Rahmen dieser Fragen diskutiert werden:

### **6.1. Wie sind die Trehalasen an ihr jeweiliges 'Kompartiment' angepaßt?**

#### **6.1.1. Gibt es eine funktionelle Anpassung der Trehalasen an ihr jeweiliges Kompartiment?**

##### **6.1.1.1. Die enzymatischen Eigenschaften von TreA und TreF unterscheiden sich nicht erheblich voneinander**

Für zwei zu 47 % identische Proteine ist anzunehmen, daß sie sehr ähnliche enzymatische Eigenschaften aufweisen. Um einen Vergleich der enzymatischen Eigenschaften von TreA und TreF zu ermöglichen, wurde TreF im Rahmen dieser Arbeit überexprimiert, gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die 63,703 kDa große Trehalase liegt im Zytoplasma als Monomer vor. Sie hydrolysiert spezifisch Trehalose. Die Substrataffinität für diese Reaktion beträgt 1,9 mM, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit 54 µM Trehalose pro min und mg Protein. Die Trehalase hat ein weites pH-Optimum im neutralen Bereich. ihre Aktivität ist nicht von divalenten Kationen abhängig (vergl. Kapitel 5.1.2.).

Zum Vergleich der beiden Trehalasen sind in Tabelle 6.1. den enzymatischen Eigenschaften von TreF die von TreA gegenübergestellt.

Tabelle 6.1.: Vergleich der enzymatischen Eigenschaften von TreA und TreF

	TreF	TreA <sup>1)</sup>
$K_m$ [mM]	1,9	0,78
$V_{max}$ [U / mg ]	54	87,8
pH-Optimum	6,0 - 7,0	5,5
Substrat	ausschließlich Trehalose	ausschließlich Trehalose
isoelektrischer Punkt <sup>2)</sup>	4,91	5,36

<sup>1)</sup> Bei der Auflistung der Eigenschaften von TreA wurden die Daten von Tourinho-dos-Santos (Tourinho-dos-Santos et al., 1994) herangezogen.

<sup>2)</sup> Die isoelektrischen Punkte wurden mit dem Programm Prot Param tool (Appel et al., 1994; <http://expasy.hcuge.ch/sprot/param.html>) berechnet.

Der Vergleich der beiden Trehalasen zeigt, daß in den verschiedenen Kompartimenten keine starke Divergenz der enzymatischen Eigenschaften stattgefunden hat. Sowohl die Substrataffinität, als auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der beiden Enzyme liegen nah beieinander. Das pH-Optimum von TreF liegt im physiologischen Bereich des Zytoplasmas. Das pH-Optimum von TreA ist gegenüber dem von TreF enger und leicht in den sauren Bereich verschoben (Tourinho-dos-Santos et al., 1994).

### 6.1.1.2. Vergleich der zellulären Bedeutung von TreA und TreF

Die Kapazität der enzymatischen Aktivität von TreF ist *in vivo* mit 0,004 Units pro mg Zellprotein weitaus geringer als die von TreA. Die TreF-Aktivität konnte lediglich als Hintergrundsaktivität in *treA*<sup>-</sup> Mutanten beobachtet werden (Boos et al., 1990, Rimmele und Boos, 1994).

Bei hoher Osmolarität werden im Zytoplasma von *E. coli* große Mengen an Trehalose synthetisiert (Giaver et al., 1988). Die *zytoplasmatische* Trehalase könnte hier benötigt werden, um den zytoplasmatischen Gehalt an Trehalose zu reduzieren, wenn die interne Trehalose-Produktion zu stark wird. Dazu müßte die Trehalase-Aktivität mit steigendem Substrat-Gehalt in der Zelle erhöht werden. Eine solche Regulation scheint jedoch nicht zu existieren, denn erstens liegt der im Rahmen in dieser Arbeit ermittelte  $K_m$ -Wert von 1,9 mM zu niedrig, als daß eine Regulation der Trehalase-Aktivität durch die interne Trehalose-Konzentration, welche bei hoher Osmolarität des Mediums 40 - 400 mM Trehalose beträgt, möglich wäre. Die Substratsättigung scheint vielmehr bald nach dem Einsetzen der Trehalose-Synthese erreicht zu sein. Zweitens konnte kein Trehalase-Inhibitor gefunden werden, der die Aktivität unter verschiedenen osmolaren Bedingungen regulieren würde (Kapitel 5.1.2.6.). Die Expression der Trehalase wird außerdem auch nicht durch Trehalose stimuliert (Horlacher et al., 1996).

Die Funktion von TreF könnte eher im Abbau und in der Verwertung intern akkumulierter Trehalose beim Wechsel von hochosmolaren zu niederosmolaren Be-

dingungen liegen. Die enzymatische Aktivität ist gering genug, um die Anreicherung von Trehalose bei hoher Osmolarität zu gewähren und hoch genug, um die Trehalose in angemessener Zeit verstoffwechselfähig zu machen, sobald die Trehalose-Synthese im niederosmolaren Medium unterbleibt.

Für die *periplasmatische* Trehalase TreA werden zwei verschiedene Funktionen diskutiert (vergl. Kapitel 3.2.1.3. und 3.2.2.2.). Zum einen könnte es bei hoher Osmolarität des Mediums der Zelle Trehalose aus dem Medium als Energie- und Kohlenstoffquelle zugänglich machen, wenn die Aufnahme von Trehalose über das Trehalose-spezifische Phospho-Transferase-System TreB/C reprimiert ist. Zum anderen könnte TreA als 'Wiederaufnahme-System' dazu dienen, einen unnötigen Energie- und Kohlenstoffverlust zu vermeiden, wenn infolge einer drastischen Abnahme der Osmolarität des Mediums der Osmolyt Trehalose aus dem Zytoplasma geschleust wird.

Die zelluläre Bedeutung der beiden Trehalasen könnte also in der Verwertung von Trehalose beim Übergang von hoher zu niedriger Osmolarität des Mediums liegen. Dabei würde TreA bei einer drastischen und TreF bei einer weniger drastischen Verminderung der Osmolarität eine wichtigere Rolle zukommen. In der Verwertung von Trehalose aus dem Medium geht die Funktion von TreA über die von TreF hinaus.

## 6.1.2. Gibt es eine *strukturelle* Anpassung der Trehalasen an die verschiedenen Kompartimente?

### 6.1.2.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen von TreA und TreF

Die periplasmatische Trehalase TreA besteht aus 535, die zytoplasmatische Trehalase aus 549 Aminosäuren. Über einen 478 Aminosäuren langen Kernbereich weisen die beiden Trehalasen 48,9 % Sequenzidentität auf (vergl. Kapitel 5.1.3.). Diese Sequenzidentität spiegelt sich sowohl in einer sehr ähnlichen vorausgesagten Sekundärstruktur (Kapitel 5.1.2.3.), als auch in einer engen Korrelation im Kyte-Doolittle-Plot wider (vergl. Horlacher et al., 1996).

Obwohl die Kernregion von TreA eine Aminosäure mehr enthält als die von TreF, ist ihr Molekulargewicht um 1065 Da geringer. Die ca. 51 % nicht identischen Aminosäuren von TreA sind also tendenziell kleiner als die von TreF. TreF enthält mehr saure und basische Aminosäuren als TreA<sup>\*)</sup>, welches im Gegenzug mehr polare Aminosäuren aufweist (Horlacher et al., 1996). Da sich der Überschuss an positiven und negativen Ladungen in TreF ausgleicht, haben die homologen Kernregionen von TreA und TreF mit 5,48 und 5,37 beinahe identische isoelektrische Punkte.

---

<sup>\*)</sup> Aminosäuren mit sauren Resten: TreF: 16 Asp + 23 Glu, TreA: 12 Asp + 14 Glu  
 Aminosäuren mit basischen Resten: TreF: 23 Arg + 12 Lys, TreA: 7 Arg + 20 Lys

Die beiden Trehalase-Sequenzen haben sich in der Evolution sehr wahrscheinlich aus einer gemeinsamen Ursprungs-Sequenz entwickelt. Da die Unterschiede in der Aminosäure-Zusammensetzung der nicht identischen Sequenzen von TreA und TreF höchstens geringe Auswirkungen auf die enzymatischen Eigenschaften der Trehalasen haben (vergl. voriges Kapitel), könnte das vermehrte Vorkommen geladener Aminosäurereste in der zytoplasmatischen bzw. das verminderte Vorkommen geladener Aminosäurereste in der periplasmatischen Trehalase eine evolutionäre Anpassung an die Translokations- und Faltungsbedingungen der verschiedenen Kompartimente sein.

Von Heijne stellte für die Verteilung basischer Aminosäuren innerhalb von Proteinen der Zytoplasmamembran eine ähnliche Tendenz fest, wie sie in TreA und TreF beobachtet wurde. Die Aminosäuren Lysin und Arginin kommen mit 5 % in periplasmatischen Bereichen deutlich seltener vor als in zytoplasmatischen Bereichen, in denen sie 15 % ausmachen. Die daraus abgeleitete 'positive-inside-rule' läßt sich jedoch nur auf Schleifen von weniger als 60 Aminosäuren Länge anwenden, also nicht auf Polypeptidketten mit der Länge periplasmatischer Proteine (von Heijne, 1986, von Heijne, 1988). Für sekretorische Proteine beobachtete von Heijne, daß die N-terminalen 20 Aminosäuren weniger Arginine und Lysine enthalten als andere Bereiche dieser Proteine (von Heijne, 1984). Zumindest in bestimmten Bereichen periplasmatischer Polypeptidketten scheint also ein Selektionsdruck gegen positiv geladene Aminosäuren wirksam zu sein. Inwieweit sich die Aminosäure-Zusammensetzung zytoplasmatischer und sekretorischer Proteine *generell* unterscheidet, wurde bisher nicht untersucht\*).

---

\*) Die Kenntnis von 41 Isoenzympaaren mit unterschiedlicher Lokalisation im Reich der Tiere erlaubte die Bearbeitung einer vergleichbaren Fragestellung an Kern-codierten mitochondrialen Enzymen und ihren homologen zytoplasmatischen Isoenzymen. Die isoelektrischen Punkte von beiden, mitochondrialen und zytoplasmatischen Proteinen variieren beträchtlich. Vergleicht man jedoch die Werte der isoelektrischen Punkte der einzelnen Isoenzympaare, so findet man, daß sie im Mitochondrium im Durchschnitt um 1,3 höher liegen, als im Zytoplasma. Die Unterschiede sind hierbei auf mehr positive oder weniger negative Aminosäuren (oder beides) in den mitochondrialen Isoenzymen zurückzuführen (Jaussi, 1995, Hartmann et al., 1991a). Diese Ergebnisse sprechen für eine evolutionäre Selektion für positive Aminosäuren in mitochondrialen Isoenzymen. Sie könnten einerseits den Import ins Mitochondrium erleichtern oder andererseits eine Anpassung an die mitochondrialen Bedingungen sein. Interessanterweise wird der Vorläufer der Aspartat Amino Transferase vier mal schneller ins Mitochondrium transportiert, als das weniger basische, homologe zytoplasmatische Isoenzym, welches an die gleiche Signalsequenz fusioniert ist (Hartmann et al., 1991b). Ob die Ladung die Ursache für den besseren Import ist, ist nicht bekannt. Die Beobachtung, daß die Signalsequenz einen um so höheren positiven Beitrag zum isoelektrischen Punkt des Vorläuferproteins leistet, je niedriger der isoelektrische Punkt des reifen Proteins liegt, spricht für die Bedeutung der Ladung für den Proteinimport in Mitochondrien (Jaussi, 1995).

Im gesamten *E. coli*-Chromosom wurden 1345 Proteine identifiziert, die über eine Länge von 60 % der Polypeptidkette eine Sequenzidentität von mindestens 30 % zu einem anderen *E. coli*-Protein aufweisen (Blattner et al., 1997). Da davon auszugehen ist, daß sich darunter auch Proteinpaare mit unterschiedlicher Lokalisation befinden, sollte die Bearbeitung der Fragestellung, ob sich die Aminosäure-Zusammensetzung zytoplasmatischer und sekretorischer Proteine *generell* unterscheiden läßt, auch für *E. coli* möglich sein.

Die Homologie der beiden Trehalasen geht an beiden Enden verloren. Während TreF am N-Terminus über 61 zusätzliche Aminosäuren verfügt, hat TreF am C-Terminus eine Extension von 41 Aminosäuren. 45 der 61 N-terminalen Aminosäuren von TreF können ohne Funktionsverlust durch Thermolysin abgespalten werden\*).

Der Bereich N-terminal zur homologen Kernregion zeichnet sich in beiden Trehalasen durch zahlreiche Reste mit negativer Ladung aus. Bei TreA kommen 3 negative Aminosäurereste auf 16 Aminosäuren. In den ersten 60 Aminosäuren von TreF sind 16 negative und 3 positive Aminosäurereste enthalten. Der Unterschied im isoelektrischen Punkt der Gesamtproteine von 0,45 ist durch die basische C-terminale Extension von TreA bedingt.

### **6.1.2.2. Die Sekundärstruktur von TreA und TreF ist so stark konserviert, daß funktionelle Hybride aus beiden Trehalasen gebildet werden können**

In dieser Arbeit wurden die Sekundärstrukturen für TreA und TreF mit Hilfe des PHD<sup>\*\*)</sup> Programms ermittelt. Dieses Programm basiert auf der Annahme, daß die Konformation von Proteinen während der Evolution stärker erhalten geblieben ist als die Primärstruktur (Rost und Sander, 1994b). Es liefert dementsprechend sehr ähnliche Vorhersagen für die beiden Trehalasen (Kapitel 5.1.3.2.).

Die Möglichkeit, funktionelle Hybride aus sich ergänzenden Teilen der beiden Trehalasen bilden zu können (vergl. Kapitel 5.2.3.), erhärtet die Annahme der Konservierung von Sekundär- und Tertiärstruktur experimentell.

Die Fusionspunkte der Trehalase-Hybride TreA`-`TreF8 und TreA`-`TreF10 liegen innerhalb von  $\alpha$ -Helices, die mit großer Bestimmtheit vorausgesagt wurden. Der Fusionspunkt von TreA`-`TreF1 bzw.  $\Delta$ ssTreA`-`TreF1 geht einer  $\alpha$ -Helix unmittelbar voraus.

Die Fusionen TreA`-`TreF1 und  $\Delta$ ssTreA`-`TreF1 wurden in getrennten Selektionen isoliert. Der Fusionspunkt von TreA`-`TreF10, einem weiteren funktionellen Trehalase-Hybrid, liegt nur 10 Aminosäuren C-terminal zu dem von TreA`-`TreF1. Von den 6 sequenzierten Trehalase-Hybriden lag der Fusionspunkt 5 mal an Position 304 von reifem TreA bzw. Position 349 von TreF bzw. eng daneben (vergl. Kapitel 5.2.3.4.). Das Hybridprotein TreA`-`TreF8 mit seinem Fusionspunkt 95 Aminosäuren weiter N-terminal ist zumindest im Periplasma nicht aktiv. Abb. 5.16 zeigt, daß die Sequenzidentität von *treA* und *treF* in dem Bereich des Fusionspunktes von *treA`-`treF1* und *treA`-`treF10* nicht höher ist als in den umliegenden Regionen. Eine bessere homologe

---

\*) Die Thermolysin-Schnittstelle in TreF liegt genau im gleichen Abstand von der homologen Kernregion wie die Schnittstelle für die Signalpeptidase von TreA. Die 16 N-terminalen Aminosäuren bis zur homologen Kernregion könnten also von struktureller Bedeutung sein. Die TreF-Sequenz enthält andererseits jedoch von Aminosäure 45 bis zum Einsetzen des homologen Bereichs keine weitere bevorzugte Thermolysin-Schnittstelle. Möglicherweise könnten andere Proteasen die gesamte N-terminale Extension abspalten.

\*\*\*) <http://www.public.iastate.edu/~pedro/pprotein-query.html>

Rekombination an dieser Stelle scheint demnach als Erklärung für das gehäufte Auftreten der Fusionspunkte in der Region um bp 1010 von *treA* bzw. bp 1050 von *treF* auszuscheiden. Entweder sind die Fusionspunkte zufällig so gehäuft verteilt, oder aber andere Regionen sind für die Ausbildung *aktiver* Trehalase-Hybride ungeeignet.

### **6.1.2.3. Die konservierten Motive PGGRFxExYxWDxY und QWDxPxGAWPAP liegen vermutlich innerhalb einer Domäne**

Die Proteolyse von gereinigtem TreF führte bei allen getesteten Proteasen schon bei niedrigen Konzentrationen zu einer Verkürzung des Proteins um ca. 5 kDa. Die N-terminale Sequenzierung der Proteolyse-Produkte der Thermolysin- und Proteinase K-Verdau ergab, daß TreF um 45 bzw. 122 Aminosäuren verkürzt worden war (Kapitel 5.1.3.4.). Die beiden Schnittstellen lagen in Bereichen, die von dem Programm PHD<sup>\*)</sup> als exponiert eingestuft worden waren (Abb. 5.7.).

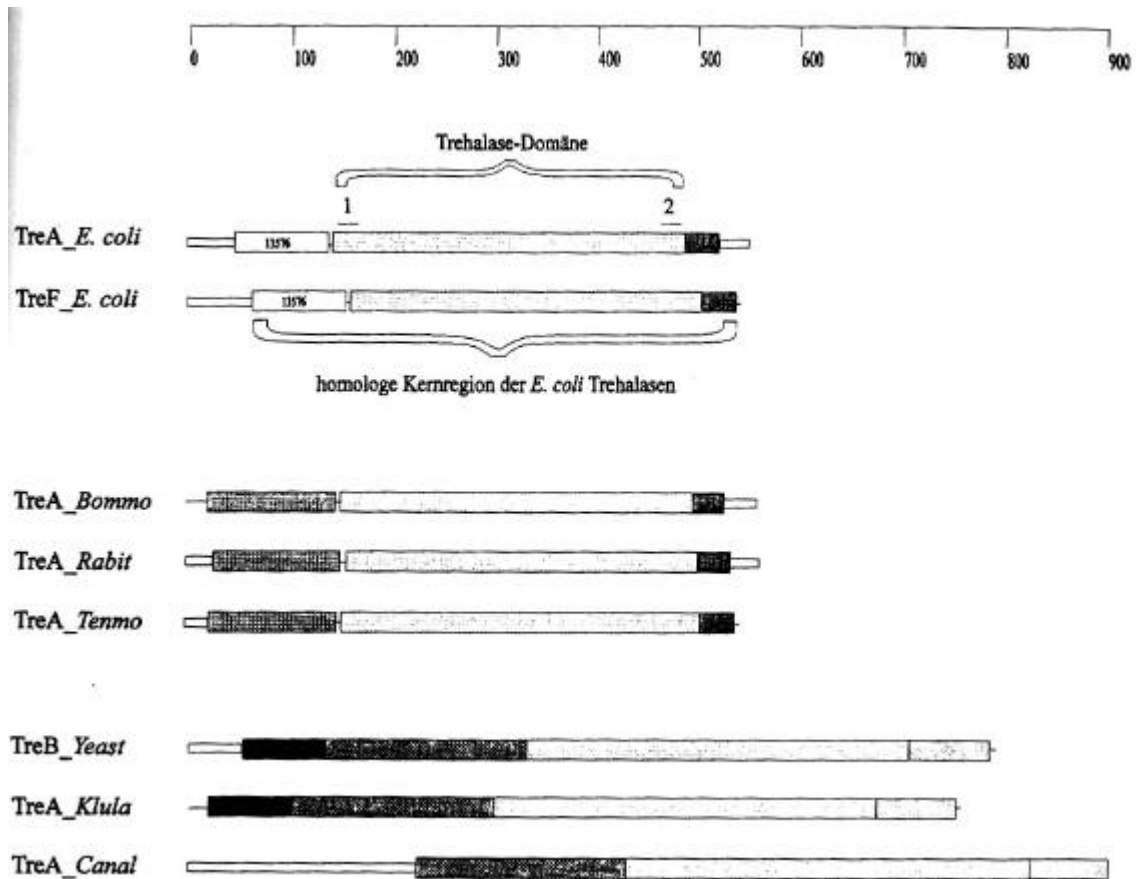
Innerhalb des homologen Kernbereichs von TreA und TreF<sup>\*\*)</sup> konnten mittels limitierter Proteolyse keine Domänen ermittelt werden (Kapitel 5.1.3.4.). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Analyse der Domänenstruktur durch das Programm ProDom<sup>\*\*\*)</sup>. Dieses Programm ermittelt Domänen aufgrund von Sequenzhomologien (Sonnhammer und Kahn, 1994) und identifizierte eine Trehalase-spezifische Domäne, die sich von Aminosäure 145 - 495 von TreA und Aminosäure 168 - 508 von TreF erstreckt. Die durch das Programm ProDom ermittelten Domänen der Trehalasen mit bekannter Sequenz sind in Abb. 6.1. dargestellt.

---

<sup>\*)</sup> <http://www.public.iastate.edu/~pedro/pprotein-query.html>

<sup>\*\*)</sup> Dieser homologe Bereich beginnt bei Aminosäure 61 von TreF bzw. Aminosäure 17 von TreA und endet mit Aminosäure 539 von TreF bzw. Aminosäure 495 von TreA.

<sup>\*\*\*)</sup> <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>



**Abb. 6.1.: Domänenstrukturen von Trehalasen**

Die verschiedenen Domänen der Trehalasen sind durch Balken in unterschiedlichen Grautönen dargestellt. Die Skala oberhalb der Trehalasen gibt die Aminosäureposition beginnend am N-Terminus an. Die in allen Trehalasen vorkommende Domäne mit den konservierten Motiven 1 und 2 sowie die homologe Kernregion der beiden *E. coli*-Trehalasen sind eingezeichnet. Die Organismennamen sind wie folgt abgekürzt: *yeast* = *saccharomyces cerevisiae*, *canal* = *candida albicans*, *klula* = *kluveromyces lactis*, *bommo* = *bombyx mori*, *tenmo* = *tenebrio molitor*, *rabit* = *oryctolagus cuniculus*

Für TreA von *Saccharomyces cerevisiae* wurde die gleiche Domänenstruktur ermittelt wie für TreB.

Abb. 6.1. zeigt die Lage der gemeinsamen Domäne in allen Trehalasen. Sie veranschaulicht zusätzlich, inwiefern sich die beiden *E. coli*-Trehalasen von denen anderer Organismen unterscheiden. TreA und TreF haben direkt N-terminal zu dem PGGRF<sub>x</sub>ExY<sub>x</sub>WD<sub>x</sub>Y-Motiv einen mit `13576` gekennzeichneten Bereich, an dessen Stelle die Trehalasen anderer Organismen andere konservierte Sequenzmotive aufweisen. Dieser Bereich ergibt zusammen mit der Trehalase-spezifischen Domäne und einer kurzen C-terminalen Domäne die oben erwähnte homologe Kernregion.

Die anderen konservierten Sequenzmotive könnten z.B. in *Saccharomyces cerevisiae*, *candida albicans* und *kluveromyces lactis* u.a. regulatorische Funktion haben, da für TreA aus *Saccharomyces cerevisiae* eine reversible Aktivierung durch Phosphorylierung mittels einer cAMP-abhängigen Proteinkinase beschrieben wurde (Panek et al., 1988).

*Die funktionellen Abweichungen der beiden Trehalasen sind minimal. In der Aminosäure-Zusammensetzung hat jedoch eine Auseinanderentwicklung der beiden Trehalasen stattgefunden. Diese Unterschiede in der Primärstruktur scheinen sich aber höchstens geringfügig auf die Sekundär- und Tertiärstruktur der Trehalasen auszuwirken.*

## **6.2. Benötigen die beiden Trehalasen `Kompartiment-spezifische` Faltungshelfer zur Ausbildung ihrer Konformation?**

Die Untersuchung der Faltung Kompartiment-fremder Proteine ermöglicht Einblicke darüber, inwieweit sich die Faltungshelfer unterschiedlicher Kompartimente gegenseitig ersetzen können.

Um die Abhängigkeit der beiden Trehalasen von Kompartiment-spezifischen Faltungshelfern *in vivo* zu untersuchen, wurden die Lokalisationen der Trehalasen `ausgetauscht`. Durch Deletion der Signalsequenz kam TreA im Zytoplasma zu liegen. Die Fusionierung der Signalsequenz von TreA an den N-Terminus von TreF sorgte für eine periplasmatische Lokalisation dieses Proteins (vergl. Kapitel 6.3.). Im folgenden wird das Verhalten der Trehalasen in den ihnen jeweils fremden Kompartimenten diskutiert.

### **6.2.1. TreF kann sich im Periplasma nicht zu seiner aktiven Konformation falten**

Die zytoplasmatische Trehalase TreF kann zwar ins Periplasma transloziert werden (Kapitel 5.2.1.1.), sie wird dort jedoch abgebaut und aggregiert, wenn die Degradation durch das Ausschalten der periplasmatischen Protease DegP verhindert wird (vergl. Kapitel 5.2.1.2. und 5.2.1.4.). TreF ist nicht in der Lage, sich im Periplasma effizient zu einem löslichen, aktiven Enzym zu falten. Periplasmatische Faltungshelfer scheinen die Faltung von TreF nicht vermitteln zu können.



### 6.2.1.1. Die Mutationen, die die Aktivität von TreF im Periplasma erhöhen, sorgen nicht für eine bessere Löslichkeit der Proteine

Um Bereiche in TreF zu identifizieren, die mit der Faltung von TreF im Periplasma interferieren, wurde in dieser Arbeit eine Mutagenese durchgeführt. Dabei wurden die beiden TreF-Mutationen TreF<sub>A82->T</sub> und TreF<sub>T172->I</sub>, identifiziert, die eine ca. drei- bis siebenfache Erhöhung der Enzymaktivität bewirken. Da diese Mutationen die Aggregation von TreF nicht verhindern können (Daten nicht gezeigt), und da die Mutation in TreF<sub>T172->I</sub> zudem in einem in Glykosylhydrolasen konservierten Bereich lokalisiert ist (vergl. Abb. 5.12.), kann man davon ausgehen, daß die Mutationen nicht die Faltung, sondern direkt die Aktivität der Trehalasen betreffen.

Interessant wäre es, zu untersuchen, ob die Aktivität der TreF-Mutanten auch im Zytoplasma gegenüber der von Wildtyp TreF erhöht ist. Bis auf TreF weisen alle bereits sequenzierten Trehalasen - darunter auch zytoplasmatische - an der der Aminosäure 172 von TreF entsprechenden Position eine hydrophobe Aminosäure auf (Abb. 5.12.). Daher ist zumindest für TreF<sub>T172->I</sub> anzunehmen, daß die Mutation unabhängig von der zellulären Lokalisation zu einer Erhöhung der Aktivität führt. Möglicherweise wurde der polare Aminosäurerest an Position 172 von TreF selektioniert, weil eine niedrigere Trehalase-Aktivität im Zytoplasma für *E. coli* von Vorteil ist.

### 6.2.1.2. Für die *in vivo*-Faltung von TreF könnte ein molekulares Chaperon erforderlich sein

*In vitro*-Rückfaltungsexperimente haben gezeigt, daß sich gereinigtes, denaturiertes, TreF unabhängig von einem molekularen Chaperon zurückfalten kann. Die Rückfaltungseffizienz läßt jedoch mit steigenden Proteinkonzentrationen rasch nach und die Polypeptidkette aggregiert (Kapitel 5.1.3.7.).

Diese Beobachtung und die, daß sich TreF im Periplasma nicht zu einem löslichen Protein falten läßt, lassen vermuten, daß die Faltung von TreF *in vitro* bei hohen Proteinkonzentrationen und *in vivo* von einem zytoplasmatischen molekularen Chaperon abhängig ist.

Daß das gereinigte TreF geringe Spuren an DnaK enthielt (Kapitel 5.1.3.6.), könnte als Hinweis auf eine Interaktion dieses molekularen Chaperons mit TreF interpretiert werden. Berücksichtigt man jedoch, daß die isoelektrischen Punkte von TreF und DnaK sehr eng beieinander liegen ( $pK_{i,TreF} = 4,91$ ,  $pK_{i,DnaK} = 4,83$ ), so läßt sich die gemeinsame Reinigung auch über ein ähnliches Elutionsverhalten der beiden Proteine in der Anionen-Austauscher-Chromatographie erklären.

Bei der Überproduktion von TreF ist weder eine Induktion von DnaK noch von GroEL feststellbar (vergl. Abb. 5.1.). Es gibt daher keinen direkten Hinweis auf die Notwendigkeit eines molekularen Chaperons für die Faltung von TreF\*).

Durch gleichzeitige Überexpression der Disulfid-Oxidoreduktase DsbA und Induktion der Hitzeschockantwort bei niedriger Temperatur konnten sich T-Zell-Rezeptor-Fragmente im Periplasma von *E. coli* produktiv falten, anstatt zu aggregieren. Dieses Ergebnis sprach für die Existenz eines Hitze-induzierbaren Faltungshelfers im Periplasma (Wülfling und Plückthun, 1994). Es wäre nicht auszuschließen, daß auch die Aggregation eines zytoplasmatischen Proteins durch die Induktion eines solchen Chaperons vermindert werden kann.

---

\*) Für den Fall, daß TreF zur Ausbildung seiner aktiven Konformation *in vivo* ein molekulares Chaperon benötigt, drängen sich viele interessante Fragen auf, deren Beantwortung Rückschlüsse auf die Substraterkennung von molekularen Chaperonen zulassen könnte: Werden die beiden homologen Trehalasen TreA und TreF vom gleichen Chaperon erkannt? Wie wird in diesem Fall die unterschiedliche Freisetzung - an den Translokationsapparat oder zur Faltung ins Zytoplasma - gewährleistet? Oder sind an der Faltung bzw. Freisetzung der beiden homologen Trehalasen verschiedene Chaperone beteiligt? Wie können die Chaperone in diesem Fall die hoch homologen Enzyme unterscheiden?

Daß molekulare Chaperone zu einer Differenzierung in der Erkennung und Freisetzung von hoch homologen Proteinen fähig sind, zeigen Untersuchungen an den zu ca. 50 % homologen mitochondrialen und zytoplasmatischen Formen der Aspartat Aminotransferase.

Während der Vorläufer und die reife Form der *mitochondrialen* Aspartat Aminotransferase während der Translokation mit Hsp70 interagieren, wenn sie entweder im Kaninchen Retikulozyten Lysat oder im Weizenkeim Extrakt synthetisiert werden, findet *keine* Interaktion zwischen der *zytosolischen* Form der Aspartat-Aminotransferase und diesem Hitzeschock Protein statt (Lain et al., 1995).

Auch GroEL zeigt eine unterschiedliche Affinität zu den beiden homologen Isoenzymen. Guanidinhydrochlorid-denaturierte, gereinigte *mitochondriale* Aspartat Aminotransferase bindet in einem Temperaturbereich von 0°C - 45°C fest an GroEL. Die Bindung des *zytosolischen* Isoenzyms ist dagegen von der Temperatur abhängig. Bei 0°C wird die Rückfaltung dieses Enzyms durch GroEL nur verlangsamt, bei 30°C ist es fest an das Chaperon gebunden. Während für die Freisetzung der *mitochondrialen* Form die Zugabe von MgATP und GroES notwendig ist, genügt MgATP, um die Freisetzung der *zytoplasmatischen* Form zu vermitteln (Mattingly et al., 1994).

Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch die Untersuchung an zytosolischer und mitochondrialer Malat Dehydrogenase. Während die *zytosolische* Form durch die Zugabe von MgATP von dem Chaperonin cpn60 freigesetzt werden konnte, benötigte die *mitochondriale* Form MgATP und cpn10 (Staniforth et al., 1994).

### 6.2.2. Im Gegensatz zu TreF kann sich das TreA`-`TreF1-Hybrid im Periplasma zu einem löslichen, aktiven Protein falten

Die Hybridproteine TreA`-`TreF und TreA`-`TreF8 verhalten sich im Periplasma vergleichbar wie TreF. Sie können sich nicht zu löslichen, aktiven Proteinen falten. Das Trehalase-Hybrid TreA`-`TreF1 scheint ebenfalls einen Faltungsdefekt zu haben, denn während bereits gefaltetes TreA`-`TreF im Zellextrakt gegenüber DegP resistent ist (Daten nicht gezeigt), wird die translozierte Polypeptidkette in einem *degP*<sup>+</sup> Stamm abgebaut. In einem *degP*<sup>-</sup> Stamm ist TreA`-`TreF1 jedoch - im Gegensatz zu den oben genannten Trehalase-Konstrukten - in der Lage, eine aktive, lösliche Konformation einzunehmen (Kapitel 5.2.3.6.-5.2.3.8.).

Die Ursache für die Fähigkeit dieses Hybridproteins, sich in eine lösliche, aktive Konformation zu falten, ist nicht bekannt. Von den Trehalase-Konstrukten TreF, TreA`-`TreF, TreA`-`TreF1 und TreA`-`TreF8 ist TreA`-`TreF1 dasjenige mit dem geringsten Anteil an zytoplasmatischer Sequenz. Die Beeinträchtigung der Faltung durch diesen geringen TreF-Anteil könnte gering genug sein, um eine Faltung im Periplasma zu ermöglichen. Andererseits könnte auch die lange TreA-Sequenz die Faltung dieses Hybridproteins so weit vorantreiben, daß die Ausbildung der löslichen, aktiven Konformation ungeachtet der Herkunft der nachfolgenden Sequenz abläuft.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, zu untersuchen, ob sich das Hybrid TreA`-`TreF8 im Zytoplasma zu einem löslichen aktiven Protein falten kann. Dadurch wäre eine Unterscheidung möglich, ob dieses Hybridprotein durch eine ungeeignete Position des Fusionspunktes überhaupt nicht in der Lage ist, sich effizient zu falten, oder ob durch einen zu großen Anteil an *zytoplasmatischer* Sequenz lediglich die Faltung im Periplasma gestört ist. In letzterem Fall müßte der Bereich von 95 Aminosäuren, der TreA`-`TreF8 von TreA`-`TreF1 unterscheidet, über die Faltungs-Kompetenz im Periplasma entscheiden.

Geht man von der Annahme aus, daß für die Faltung von TreF im Zytoplasma ein molekulares Chaperon erforderlich ist, dann könnte der geringe Anteil an TreF-Sequenz in TreA`-`TreF1 der Grund für die Fähigkeit dieses Hybrides sein, sich im Periplasma unabhängig von einem zytoplasmatischen molekularen Chaperon zu falten.

### 6.2.3. Die Ausbildung von Disulfidbrücken könnte die Faltung von TreF im Periplasma verhindern

Neben der Ausstattung an molekularen Chaperonen ist der Redoxzustand der Kompartimente ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Periplasma und Zytoplasma.

Die Ausbildung falscher Disulfidbrücken könnte die korrekte Faltung von TreF im Periplasma verhindern und zur Aggregation führen. Die Ausbildung falscher Disulfidbrücken wäre auch eine denkbare Erklärung dafür, daß sich das Hybridprotein TreA`-`TreF1 im Gegensatz zu TreF und TreA`-TreF zu einem löslichen Protein falten kann: Während in TreF und TreA`-TreF je drei Cysteine vorkommen, enthält TreA`-`TreF1 kein Cystein, das durch Ausbildung falscher Disulfidbrücken zur Aggregation führen könnte.

Wie die Rückfaltungs- und *in vivo*-Experimente unter reduzierenden Bedingungen gezeigt haben (Kapitel 5.1.3.7. und 5.2.1.5.), scheint eine Ausbildung von Disulfidbrücken durch die Disulfid-Oxido-Reduktase DsbA jedoch zumindest nicht der einzige Grund für die Aggregation von TreF zu sein.

### 6.2.4. TreA kann sich im Zytoplasma falten

Eine effiziente Faltung periplasmatischer Proteine im Zytoplasma ist nicht zu erwarten, denn die Ausbildung der Tertiärstruktur würde die Translokationskompetenz beeinträchtigen.

Die Faltung periplasmatischer Proteine im Zytoplasma von *E. coli* wurde bereits an den Beispielen  $\beta$ -Lactamase (Bowden et al., 1992), MalS (Spieß, 1995) und alkalische Phosphatase (Derman et al., 1993; Derman und Beckwith, 1991; Derman und Beckwith, 1995) untersucht. Alle drei Enzyme verhalten sich im Zytoplasma verschieden:

Bei 37°C bilden MalS und  $\beta$ -Lactamase im Zytoplasma inaktive Aggregate aus. Die Erniedrigung der Wachstumstemperatur auf 23 °C ermöglicht im Fall von  $\beta$ -Lactamase die Faltung einer beträchtlichen Menge an löslichem Enzym. Die häufig in Topologie-studien als Reporterprotein eingesetzte alkalische Phosphatase ist im Zytoplasma inaktiv und wird abgebaut (Manoil und Beckwith, 1986). Für die Aktivität dieses Enzyms ist die Ausbildung von Disulfidbrücken erforderlich. Diese ist im Zytoplasma einer Thioredoxin Reduktase Mutante möglich, wo bei niedriger Temperatur bis zu 25 % der ohne Signalsequenz exprimierten alkalischen Phosphatase aktiv werden können (Derman et al., 1993).

Die periplasmatische Trehalase TreA unterscheidet sich von diesen bisher untersuchten Proteinen. Sie kann sich im Zytoplasma effizient zu einem aktiven Enzym falten, wenn sie ohne Signalsequenz exprimiert wird (vergl. Kapitel 5.2.2.2.). Periplasmatische Faltungshelfer scheint sie zur Ausbildung ihrer aktiven Konformation nicht zu benötigen. Ob die Faltung der Trehalase Chaperon-unabhängig verläuft, oder ob sie durch zytoplasmatische Chaperone vermittelt wird, kann mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht unterschieden werden.

Da für die Aktivität von TreA keine Disulfidbrücken erforderlich sind (vergl. Kapitel 5.2.2.1.), wird die Ausbildung der aktiven Konformation von TreA nicht durch das reduzierende Milieu des Zytoplasmas erschwert.

*In vitro* erfolgt die Faltung zahlreicher Signalsequenz-loser Proteine schneller als die ihrer Vorläufer-Proteine (z.B. Laminet und Plückthun, 1989, Park et al., 1988). Eine aufgrund der Deletion der Signalsequenz beschleunigte Faltung von TreA gegenüber Vorläufer-TreA *in vivo* wäre eine mögliche Erklärung dafür, daß sich die periplasmatische Trehalase im Zytoplasma effizient faltet, während Vorläufer-TreA eine translokations-kompetente Struktur aufrecht erhält. Die Faltung von Signalsequenzlosem TreA scheint jedoch nicht so schnell zu sein, daß sie eine Translokation im *prlA4*-Stamm vollständig verhindern würde (s.u.).

*Die periplasmatische Trehalase kann sich auch im Zytoplasma zu einem aktiven löslichen Protein falten. Ob die Faltung unabhängig von einem molekularen Chaperon abläuft, oder ob sie durch ein zytoplasmatisches Chaperon vermittelt wird, ist unklar. TreF kann sich außerhalb des Zytoplasmas nur unter bestimmten Voraussetzungen zu einem löslichen aktiven Protein falten. Diese sind im Periplasma nicht erfüllt. Periplasmatische Faltungshelfer reichen nicht aus, um die Faltung des normalerweise zytoplasmatischen Proteins zu assistieren.*

### **6.3. Wie wird die korrekte Lokalisation von TreA und TreF gewährleistet?**

#### **Gibt es über die Signalsequenz hinaus Informationen, die über die Lokalisation der Trehalasen entscheiden?**

##### **6.3.1. TreF wird als erstes zytoplasmatisches Protein effizient ins Periplasma transloziert**

Um sowohl zelleigene, als auch rekombinante Proteine aus *E. coli* zu reinigen, ist eine Translokation ins Periplasma von Vorteil. Aufgrund der geringeren Proteinviefalt in diesem Kompartiment lassen sich die Proteine einfacher isolieren. Sofern eine rasche Translokation gewährleistet ist, stören sie auch weniger den Zellstoffwechsel, wodurch z.B. bei regulatorisch wirksamen Proteinen eine stärkere Überexpression möglich ist. Die Untersuchung der Translokation zytoplasmatischer Proteine hat also neben dem theoretischen auch praktisches Interesse.

TreF wurde in dieser Arbeit hinter die Signalsequenz und die ersten beiden Aminosäuren von reifem TreA fusioniert und konnte so ins Periplasma transloziert werden (Kapitel 5.2.1.1.). Dieses Ergebnis war überraschend, denn bislang galt die Translokation zelleigener zytoplasmatischer Proteine, die an die Signalsequenz oder die Signalsequenz und den N-Terminus eines Exportproteins fusioniert wurden, als ineffizient.

$\beta$ -Galaktosidase - ebenso wie die Dihydrofolat Reduktase der Maus - konnten nur dann erfolgreich transloziert werden, wenn sie in sehr geringen Mengen exprimiert wurden (Freudl et al., 1988). Die Autoren machen die Transportrate für die Export-Kompatibilität verantwortlich. Bei überlasteter Translokations-Maschinerie ist der Aufenthalt im Zytoplasma so lang, daß die zytoplasmatischen Proteine sich zu falten beginnen und damit ihre Translokations-Kompetenz verlieren. Von dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* konnten nur 7 % im Periplasma nachgewiesen werden, wenn es als MBP<sup>-</sup>-Klenow Fragment Hybridprotein exprimiert wurde (Bedouelle und Duplay, 1988).

Die Translokation rekombinanter zytoplasmatischer Proteine scheint einfacher zu sein. Das M13-Phagenprotein G5P sowie das Schwanzfaser-Fragment des Phagen T4 können z.B. sehr effizient ins Periplasma transloziert werden, wenn sie an den C-Terminus von MBP bzw. OmpA fusioniert sind (Blondel und Bedouelle, 1990; MacIntyre et al., 1987). Für den erfolgreichen Transport eines Fusionsproteins aus der Signalsequenz der  $\beta$ -Lactamase und der Triosephosphat-Isomerase aus Mäusemuskeln ist lediglich ein konservativer Aminosäureaustausch (Arginin gegen Lysin) am N-Terminus des reifen Proteins erforderlich (Summers et al., 1989). Möglicherweise sind die Faltungsbedingungen für diese Proteine im Zytoplasma von *E. coli* ungeeignet, so daß die Translokationsfähigkeit länger aufrecht erhalten bleibt.

Wie aber unterscheidet sich Prä-TreF von den zelleigenen zytoplasmatischen Vorläuferproteinen, die nicht transloziert werden? Faltet TreF sich im Zytoplasma auch langsamer, weil es als Abkömmling eines ursprünglich periplasmatischen Proteins noch nicht vollständig an die Faltungsbedingungen angepaßt ist?

Eine weniger spekulative Erklärungsmöglichkeit wäre die, daß die Signalsequenz von TreA sehr effizient ist. Sie ist mit 30 Aminosäuren vergleichsweise lang und ausgesprochen hydrophob. Ein Vergleich verschiedener Signalsequenzen in Tabelle 6.2. zeigt, daß die Hydrophobizität der Signalsequenz von TreA von den untersuchten Signalsequenzen\*) die höchsten Werte erreicht, und daß sie sich über den längsten Bereich erstreckt.

Rusch und Kendall konnten zeigen, daß hoch hydrophobe Signalpeptide den Transport von Proteinen ermöglichen können, die normalerweise nicht translokationskompetent sind (Rusch und Kendall, 1994). Desweiteren ermöglichen Mutationen, die die Hydrophobizität der Signalsequenz von SecB-abhängigen MBP-Mutanten erhöhen, deren Translokation in *secB*<sup>-</sup> Stämmen (Collier und Bassford, 1989). Durch Optimierung der Hydrophobizität der Signalsequenz eines OmpA-NukleaseA-Fusionsproteins konnte die Geschwindigkeit der Prozessierung der OmpA-Signalsequenz von der NucleaseA von *Staphylococcus aureus* in *E. coli* verdoppelt werden (Goldstein et al., 1990).

Die hydrophobe Signalsequenz von TreA könnte den Transport von TreF durch die Translokations-Maschinerie so beschleunigen oder die Faltung im Zytoplasma so verlangsamen, daß die Ausbildung der Tertiärstruktur unterbleibt.

Zusätzlich zur stark hydrophoben Signalsequenz im Prä-TreF-Konstrukt scheint auch der N-Terminus des reifen Proteins für die Translokation geeignet, denn die vielen Aminosäuren mit sauren Seitengruppen sollten in der Lage sein, den inhibitorischen Effekt zu kompensieren, den das Lysin an Position 9 des Prä-TreF-Konstruktes auf den Translokationsprozeß ausüben könnte. Eine solche Kompensation wurde für Exportmutanten der alkalischen Phosphatase gezeigt. Die durch zwei positive Ladungen am N-Terminus des reifen Proteins reduzierte Translokation der Exportmutanten konnte durch das Einfügen einer wohl positionierten negativen Ladung ca. 8-fach gesteigert werden (Li et al., 1988).

Die in Kapitel 6.1.2.1. diskutierten Unterschiede in der Zusammensetzung der nicht homologen Aminosäuren scheinen sich auf die Translokation zumindest nicht so negativ auszuwirken, daß die Translokation vollständig unterbunden wird.

---

\*) Dazu gehören die Signalpeptide von OmpA und MBP, die einerseits die Translokation der zytoplasmatischen Proteine  $\beta$ -Galaktosidase (OmpA) und Klenow-Fragment (MBP) nicht effizient vermitteln konnten, andererseits aber den rekombinanten zytoplasmatischen Proteinen G5P (MBP) und T4 Schwanzfaser-Fragment (OmpA) zur erfolgreichen Translokation verhalfen.

Tabelle 6.2.: Vergleich der Hydrophobizität verschiedener Signalsequenzen

Position	TreA		Bla		MBP		OmpA		PhoA	
	AS	Hydr.	AS	Hydr.	AS	Hydr.	AS	Hydr.	AS	Hydr.
1	M	-	M	-	M	-	M	-	M	-
2	K	-	F	-	K	-	K	-	K	-
3	S	-	K	-	I	-	K	-	Q	-
4	P	-0,83	T	0,47	K	-1,63	T	-1,53	S	-0,92
5	A	-1,36	T	0,18	T	-2,08	A	-0,69	T	-0,10
6	P	-1,72	L	0,97	G	-2,37	I	1,17	I	1,34
7	S	-2,11	C	2,07	A	-1,40	A	2,15	A	2,00
8	R	-3,30	A	2,38	R	-0,40	I	2,27	L	2,32
9	P	-3,87	L	2,22	I	-0,22	A	2,24	A	2,18
10	Q	-3,48	L	2,10	L	-0,15	V	2,22	L	2,00
11	K	-2,14	I	1,95	A	0,93	A	2,04	L	2,10
12	M	-0,61	T	1,70	L	2,06	L	2,04	P	2,28
13	A	-0,01	A	1,36	S	1,90	A	2,13	L	2,32
14	L	1,18	S	1,41	A	1,73	G	2,02	L	1,93
15	I	1,93	C	1,62	L	1,75	F	1,97	F	1,92
16	P	1,94	S	1,70	T	2,03	A	1,95	T	2,02
17	A	2,14	T	1,60	T	2,44	T	1,53	P	0,92
18	C	2,19	F	1,03	M	2,43	V	0,93	V	-0,23
19	I	2,35	A	0,67	M	2,28	A	0,75	T	-1,53
20	F	2,71			F	2,27	Q	0,78	K	-3,66
21	L	2,85			S	2,07	A	0,58	A	-4,78
22	C	2,69			A	1,87				
23	F	2,49			S	1,64				
24	A	2,23			A	0,68				
25	A	2,10			L	0,03				
26	L	1,50			A	-0,58				
27	S	0,85								
28	V	0,03								
29	Q	-1,70								
30	A	-2,57								

In Tabelle 6.2. sind die Signalsequenzen der Zellhüllproteine TreA,  $\beta$ -Lactamase (Bla), Maltose Bindeprotein (MBP), OmpA und alkalische Phosphatase (PhoA) verglichen. Die Sequenzen wurden aus der SwissProt Datenbank bezogen. Neben den Aminosäuren im Einbuchstaben-Code (AS) sind die Werte für die Hydrophobizitäten (Hydr.) an den jeweiligen Positionen angegeben. Je positiver die Werte, desto hydrophober ist die Region. Die Hydrophobizitäten wurden mit dem TopPred-Programm (von Heijne, 1992) errechnet. Dabei wurde die Skala von Goldman, Engelmann und Seitz (Engelmann et al., 1986) verwendet.

Aufgrund der zur Berechnung der Hydrophobizität ausgewählten Ausschnitte von 7 (full window) und 5 (core window) wurden für die drei N-Terminalen Aminosäuren keine Werte berechnet.



### 6.3.2. TreA wird auch ohne Signalsequenz im *prlA4*-Stamm transloziert

Wie jedes bisher untersuchte periplasmatische Protein von *E. coli*, welches ohne Signalsequenz synthetisiert wurde (vergl. Kapitel 3.3.3.2.), wird auch Signalsequenz-loses TreA in einem *prlA4*-Stamm teilweise ins Periplasma transloziert (vergl. Kapitel 5.2.4.1.). Abb. 5.22. und Tabelle 5.8. zeigen, daß die Translokation sogar sehr effizient ist. TreA scheint also nicht nur durch seine besonders hydrophobe Signalsequenz (vergl. Tabelle 6.2.) an die Translokation angepaßt zu sein, sondern auch durch den reifen Teil des Proteins.

Da sich Signalsequenz-loses TreA im Zytoplasma auch effizient falten kann, ist anzunehmen, daß eine Kompetition zwischen der Faltung und der Translokation dieses Enzyms stattfindet.

### 6.3.3. Das Trehalase-Hybrid TreA`-`TreF1 wird zwar mit Signalsequenz transloziert, aber nicht dann, wenn es ohne Signalsequenz im *prlA4*-Stamm exprimiert wird

Obwohl das Trehalase-Hybrid TreA`-`TreF1 im Periplasma einer *degP*-Nullmutante löslich und aktiv ist, lassen sich in *prlA*-Stamm gegenüber dem *secY*-Wildtypstamm weder erhöhte Trehalase-Mengen im Überstand von kalten osmotischen Schocks noch signifikant erhöhte Trehalase-Aktivitäten an ganzen Zellen feststellen (vergl. Kapitel (5.2.4.2.)). TreA`-`TreF1 ist damit das erste Protein, für das gezeigt wurde, daß es sich im *prlA4*-Stammhintergrund nicht translozieren läßt, obwohl es translokationskompetent ist, wenn es als Vorläuferprotein exprimiert wird.

Dieses Ergebnis ist auf den ersten Blick erstaunlich, denn für ein Hybridprotein wäre zu erwarten, daß seine Faltung weniger optimiert und damit langsamer verläuft als die eines Wildtyp Proteins. Die Translokationskompetenz von TreA`-`TreF1 sollte daher länger aufrecht erhalten bleiben als die von TreA.

Gerade der N-Terminus des reifen Proteins, der ja z.B. im Fall der Aspartat Amino-transferase über die Translokation zu entscheiden scheint (Lain et al., 1995), ist in dem Hybridprotein durch periplasmatische Sequenz repräsentiert. Die N-terminalen 60 % der Polypeptidkette sind identisch mit Signalsequenz-losem TreA. Da dieses im *prlA*-Stamm transloziert werden kann, wäre zu erwarten, daß es auch die Translokation des Hybrids vermitteln kann.

Wie ließe sich dann erklären, daß TreA`-`TreF1 translokationskompetent ist, wenn es mit Signalsequenz synthetisiert wird, nicht aber dann, wenn es im *prlA*-Stamm ohne Signalsequenz exprimiert wird?

Die Signalsequenz könnte als eine Erklärungsmöglichkeit herangezogen werden. Wie bereits in Kapitel 6.3.1. diskutiert wurde, ist die Signalsequenz von TreA ausgesprochen hydrophob und könnte daher auch die Translokation dieses `normalerweise` nicht translokationskompetenten Proteins vermitteln.

Außerdem ist von der Signalsequenz-losen alkalischen Phosphatase bekannt, daß ihre Translokation im *prlA*-Stamm langsam und posttranslational erfolgt. Der Translokations-

mechanismus verändert sich gegenüber dem von Wildtyp alkalischer Phosphatase. Er wird SecB-abhängig (Derman et al., 1993). Verhält sich TreA-TreF1 analog zur alkalischen Phosphatase, dann wäre bereits das gesamte Hybridprotein synthetisiert, bevor seine Translokation einsetzen würde. Der TreF-Teil, der das Hybridprotein ja von dem teilweise translokationskompetenten Signalsequenz-losen TreA unterscheidet, könnte dann durch Assoziation mit einem molekularen Chaperon oder durch beschleunigte Faltung für die Verhinderung der Translokation verantwortlich sein.

TreA und TreA-TreF1 unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur mit Signalsequenz lediglich um ca. 20, ohne Signalsequenz um ca. 27 %. Die Differenzen in ihren Sekundär- und Tertiärstrukturen dürften noch geringer sein. Dennoch zeigen die beiden Proteine *in vivo* beträchtliche Unterschiede in ihrem Faltungs- und Translokationsverhalten. Während TreA sich im Periplasma problemlos faltet und im Zytoplasma eines *prlA4*-Stammes zum großen Teil translokationskompetent bleibt, wenn es ohne Signalsequenz exprimiert wird, wird TreA-TreF1 im Periplasma in Anwesenheit der Protease DegP abgebaut und verliert im Zytoplasma eines *prlA4*-Stammes seine Translokationskompetenz, wenn es ohne Signalsequenz exprimiert wird. Obwohl sowohl der Faltungs-, als auch der Translokationsapparat ein sehr weites Spektrum an unterschiedlichen Substraten haben, scheinen sie in der Lage zu sein, auf so geringe Abweichungen wie 20 % der Primärstruktur unterschiedlich zu reagieren.

*TreA ist sowohl durch seine starke Signalsequenz, als auch in seinem reifen Teil an die Translokation angepaßt. TreF und alle anderen in dieser Arbeit untersuchten Trehalase-Konstrukte konnten mit Hilfe der stark hydrophoben Signalsequenz von TreA transloziert werden.*

*Offenbar gibt es jedoch in der TreF-Sequenz Bereiche, die sich auf die Translokation störend auswirken, denn das TreA-TreF1-Hybrid wird im *prlA4*-Stamm nicht transloziert, wenn es ohne Signalsequenz exprimiert wird.*

*TreA-TreF1 ist ein Hybridprotein und damit ein Sonderfall. Dies macht die Interpretation schwierig. Die Kenntnis des Verhaltens der zytoplasmatischen Trehalase im *prlA4*-Stamm wäre daher wünschenswert.*

### 6.3.4. Ausblick: Wird TreF im *prlA4*-Stamm transloziert?

Die Beobachtung, daß *prlA*-Stämme gegenüber *secY*-Wildtyp-Stämmen keinen erkennbaren Wachstumsdefekt haben, spricht dafür, daß die Translokation in *prlA*-Stämmen trotz der Mutation im Sekretionsapparat geordnet abläuft. Die Translokation zytoplasmatischer Proteine im *prlA*-Stamm wurde bisher lediglich durch den Vergleich von zwei-dimensionalen Gelen von Sphäroplasten-Fractionen eines *prlA*-Stammes mit denen eines *secY*-Wildtyp-Stammes untersucht. Auf den Gelen konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Derman et al., 1993). Daraus könnte man schließen, daß die *prlA*-Mutation die Translokation zytoplasmatischer Proteine nicht ermöglicht.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, daß TreF im Periplasma abgebaut wird oder aggregiert, aber in keinem Fall als lösliches Protein vorliegt (Kapitel 5.2.1.), macht jedoch auf die Problematik der Interpretation dieses Experiments aufmerksam. Translozierte aggregierte oder abgebaute zytoplasmatische Proteine sind in der Sphäroplasten-Fraktion nicht enthalten und können deshalb auf den Gelen nicht identifiziert werden.

Die Translokation einzelner zytoplasmatischer Proteine wurde bislang noch nicht untersucht. Sie wäre für TreF besonders interessant, denn im Fall der Translokationsinkompetenz von TreF im *prlA4*-Stamm ließe der Vergleich mit dem zu ca. 47 % identischen TreA möglicherweise die Merkmale eingrenzen, die die Translokation verhindern.

Da TreF im Periplasma nicht löslich ist und nur äußerst geringe Aktivität aufweist, konnten keine Aussagen zu der Translokation von TreF im *prlA4*-Stamm gemacht werden (Kapitel 5.2.4.3.).

Dafür, daß TreF im Periplasma nur sehr geringe Aktivität aufweist (vergl. Kapitel 5.2.1.3.), war die an ganzen Zellen von KU101pBADtreF<sup>\*</sup>) bestimmte Trehalase-Aktivität unerwartet hoch. Die Aktivität lag außerdem nicht signifikant unter der des *degP*<sup>-</sup> Stammes KU104pBADtreF<sup>\*\*</sup>), obwohl in Kapitel 5.2.1.2. gezeigt wurde, daß durch das Ausschalten der periplasmatischen Trehalase eine Stabilisierung von TreF im Periplasma erfolgt. Diese Ergebnisse gaben Anlaß zu der Spekulation, daß die Werte der Trehalase-Aktivität an ganzen Zellen sowie auch das Wachstum des *treA*::Spec<sup>R</sup>, *DtreRBC*-Stammes auf Trehalose nicht die Aktivität periplasmatisch lokalisierter Trehalase widerspiegeln, sondern durch die Trehalase-Aktivität im Zytoplasma verfälscht werden. Diese Überlagerung der periplasmatischen Aktivität durch zytoplasmatische Aktivität erschwert die Untersuchung der Translokation von TreF im *prlA*-Stamm zusätzlich.

Eine Voraussetzung für die Untersuchung der Translokation von TreF im *prlA4*-Stamm wäre die, daß es sich im Periplasma nachweisen ließe. Für den Nachweis über die Trehalase-Aktivität könnten durch Veränderungen am Testsystem geeignete Voraussetzungen geschaffen werden:

\*) KU101 = *treA*::Spec<sup>R</sup>, *DtreRBC*, *Dara714...leu*<sup>+</sup>

Das Plasmid pBADtreF codiert für Wildtyp TreF unter Kontrolle des Arabinose-Promotors.

\*\*\*) KU104 = *treA*::Spec<sup>R</sup>, *DtreRBC*, *Dara714...leu*<sup>+</sup>, *degP*::Tet<sup>R</sup>

1. Anstatt von Wildtyp TreF könnten die in dieser Arbeit isolierten TreF-Mutanten mit erhöhter Aktivität im Periplasma (vergl. Kapitel 5.2.1.12.) verwendet werden. Die erhöhten Aktivitäten sollten sich leichter nachweisen lassen. Da es unwahrscheinlich ist, daß die einzelnen Aminosäureaustausche die Translokationskompetenz der Trehalase-Mutanten gegenüber Wildtyp TreF verändern, sollte das Ergebnis durch die Verwendung dieser Mutanten nicht verfälscht werden.
2. Sowohl das Wachstum auf Trehalose, als auch die hohe, an ganzen Zellen gemessene Trehalase-Aktivität von KU101pBADtreF könnten durch eine unspezifische Aufnahme von Trehalose ins Zytoplasma ausgelöst werden. Wenn diese Hypothese stimmt, dann sollten sich die durch die Aktivität zytoplasmatischer Trehalase ausgelösten Artefakte durch das Ausschalten dieser hypothetischen Transportsysteme beseitigen lassen.

Das MalEFG-Transportsystem (Silhavy et al., 1979) kann als Auslöser des Artefaktes bereits ausgeschlossen werden, den die in dieser Arbeit verwendeten Stämme enthalten kein *malF* (Boyd et al., 1987) und damit auch kein intaktes MalEFG-Transportsystem. Daß die Trehalose durch das Maltose und Glukose transportierende MalX aufgenommen wird, ist unwahrscheinlich, denn eine Induktion dieses Transportsystems durch das Ausschalten des Repressors MalI (*malI::Tn10*) (Reindl und Boos, 1991) führte in KU101*malI::Tn10*pBADtreF nicht zu einer Erhöhung der an ganzen Zellen gemessenen Trehalase-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Potentielle Kandidaten für die Trehalose-Aufnahme scheinen jedoch das Mannose-PTS und im induzierten Zustand auch die Galaktose-Permease GalP zu sein, denn diese Transportsysteme können in *Salmonella typhimurium* Trehalose transportieren (Postma et al, 1986).

Wenn nach Ausschalten von *ptsLM* (Erni und Zanolari, 1985) und *galP* (Macpherson et al, 1983) immernoch eine unspezifische Trehalose-Aufnahme erfolgt, dann könnte das dafür zuständige hypothetische Transportsystem durch Transposon-Insertions-Mutagenese an KU101*ptsLM galP* pBADtreF identifiziert und gleichzeitig ausgeschaltet werden. Wird die Aufnahme von Trehalose ins Zytoplasma dieses Stammes unterbunden, so sollte die Mutante auf Glukose, nicht aber auf Trehalose wachsen.

In dem Fall, daß TreF im *prlA4*-Hintergrund nicht transloziert wird, könnte in den Stamm, der Trehalose nicht über die Zytoplasmamembran transportieren kann, die *prlA4*-Mutation transduziert werden. Der daraus resultierende Stamm könnte zur Selektion von translokationskompetenten TreF-, TreFT<sub>172</sub>->A bzw. TreA`-TreF1-Mutanten herangezogen werden. Damit könnten vielleicht Eigenschaften ermittelt werden, die die Translokation zytoplasmatischer Proteine im *prlA4*-Hintergrund verhindern.