

Biochemische und genetische Charakterisierung der Trehalasen TreA und TreF von *Escherichia coli*

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Universität Konstanz
Fakultät für Biologie

vorgelegt von
Kerstin Uhland

Konstanz
im Oktober 1997

| | |
|--|---------|
| 1. Inhaltsverzeichnis | I - VII |
| 1. Inhaltsverzeichnis | I |
| 1.1. Verzeichnis der Tabellen | VI |
| 1.2. Verzeichnis der Abbildungen | VII |
| 2. Zusammenfassung | 1 - 3 |
| 3. Einleitung | 4 - 24 |
| 3.1. Trehalose und ihr Abbau durch Trehalasen | 4 |
| 3.1.1. Trehalose | |
| 3.1.2. Verbreitung und Bedeutung von Trehalose | 4 |
| 3.1.3. Abbau von Trehalose | 5 |
| 3.1.4. Trehalasen | 5 |
| 3.2. Bedeutung der Trehalose für <i>E. coli</i> | 7 |
| 3.2.1. Trehalose als osmoprotektive Substanz | 7 |
| 3.2.1.1. Einfluß der Osmolarität auf <i>E. coli</i> | 7 |
| 3.2.1.2. Anpassung an hohe Osmolarität | 8 |
| 3.2.1.3. Anpassung an verminderte Osmolarität | 9 |
| 3.2.2. Trehalose als Kohlenstoffquelle für <i>E. coli</i> | 10 |
| 3.2.2.1. Trehalose-Verstoffwechslung bei niedriger Osmolarität | 10 |
| 3.2.2.2. Trehalose-Verstoffwechslung bei hoher Osmolarität: TreA | 12 |
| 3.3. Proteintranslokation in <i>E. coli</i> | 13 |
| 3.3.1. Ablauf der Proteintranslokation | 13 |
| 3.3.2. Die Proteintranslokation in <i>E. coli</i> ist in den meisten Fällen nicht an die Proteinsynthese gekoppelt | 14 |
| 3.3.3. Eigenschaften, die die Translokationskompetenz eines Proteins beeinflussen | 15 |
| 3.3.3.1. Aufbau und Funktion der Signalsequenz | 15 |
| 3.3.3.2. <i>prl</i> -Mutanten | 15 |
| 3.3.3.3. Einfluß der Sequenz des reifen Teils eines Proteins auf seine Translokationskompetenz | 16 |
| 3.3.3.4. Einfluß der Faltungsgeschwindigkeit auf die Translokationskompetenz eines Proteins | 17 |
| 3.3.3.5. Einfluß von molekularen Chaperonen auf die Translokationskompetenz eines Proteins | 17 |
| 3.4. Proteinfaltung in <i>E. coli</i> | 18 |
| 3.4.1. Faltungsbedingungen im Zytoplasma und im Periplasma von <i>E. coli</i> | 19 |
| 3.4.2. Molekulare Chaperone | 21 |
| 3.4.2.1. Beteiligung zytoplasmatischer Chaperone an der <i>de-novo</i> -Proteinfaltung | 21 |
| 3.4.2.2. Potentielle generelle Chaperone im Periplasma | 22 |
| 3.4.2.3. Substraterkennung durch molekulare Chaperone | 23 |
| 3.5. Aufgabenstellung | 24 |

| | |
|--|---------|
| 4. Material und Methoden | 25 - 44 |
| 4.1. Abkürzungen | 25 |
| 4.2. Materialien | 25 |
| 4.2.1. Chemikalien, Kits und deren Bezugsquellen | 25 |
| 4.2.2. Medien | 26 |
| 4.2.3. Bakterienstämme | 26 |
| 4.2.4. Plasmide | 28 |
| 4.2.5. Bakteriophagen | 29 |
| 4.3. Mikrobiologische Methoden | 29 |
| 4.3.1. Allgemeine Techniken | 29 |
| 4.3.1.1. Sterilisation | 29 |
| 4.3.1.2. Wachstumsbedingungen | 29 |
| 4.3.1.3. Aufbewahrung der Zellen | 29 |
| 4.3.1.4. Bestimmung der Zelldichte | 29 |
| 4.3.2. Stammkonstruktionen | 30 |
| 4.3.3. Plasmidkonstruktionen | 31 |
| 4.3.3.1. Konstruktion von p Δ streA | 31 |
| 4.3.3.2. Konstruktion von pBADtreF | 32 |
| 4.3.3.3. Konstruktion von Plasmiden für die Selektion von Trehalase-Hybriden | 32 |
| 4.3.3.4. Konstruktion von ptreA`-treF | 32 |
| 4.3.3.5. Konstruktion von psstreF | 33 |
| 4.3.4. Herstellung von P1-Lysaten und P1-Transduktion | 33 |
| 4.3.5. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation | 34 |
| 4.3.6. Positive Selektion auf den Verlust der Tetracyclinresistenz | 34 |
| 4.3.7. 2-Aminopurin-Mutagenese | 35 |
| 4.4. Biochemische Methoden | 35 |
| 4.4.1. Bestimmungen enzymatischer Aktivitäten | 35 |
| 4.4.1.1. Bestimmung der Glukose-Konzentration | 35 |
| 4.4.1.2. Bestimmung der Trehalase-Aktivität | 35 |
| 4.4.1.3. Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase | 36 |
| 4.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration | 36 |
| 4.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 37 |
| 4.4.3.1. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 37 |
| 4.4.4. Immunoblot Analyse (Western Blot) | 38 |
| 4.4.5. Dünnschichtchromotographie | 38 |
| 4.4.6. Reinigung von TreF | 38 |
| 4.4.7. Gelfiltration | 39 |
| 4.4.8. Gewinnung von TreF-Antiserum | 40 |
| 4.4.8.1. Aufbereitung der Serums des immunisierten Kaninchens | 40 |
| 4.4.9. Probenaufarbeitung zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz | 40 |
| 4.4.10. Limitierte Proteolyse | 40 |
| 4.4.11. Kalte osmotische Schocks | 41 |

| | |
|---|----------|
| 4.5. Molekularbiologische Methoden | 42 |
| 4.5.1. Präparation von Plasmid-DNA | 42 |
| 4.5.2. Restriktionsanalysen und Klonierung | 42 |
| 4.5.3. Einfügen von Restriktionsschnittstellen und Amplifizierung eines DNA-Fragments mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 42 |
| 4.5.4. DNA-Sequenzierung | 43 |
| | |
| 4.6. Computeranalysen und Homologieuntersuchungen von DNA- und Aminosäuresequenzen | 44 |
| | |
| 5. Ergebnisse | 45 - 106 |
| | |
| 5.1. Reinigung und biochemische Charakterisierung von TreF | 45 |
| 5.1.1. Reinigung von TreF | 45 |
| 5.1.1.1. Überexpression von TreF | 45 |
| 5.1.1.2. Reinigung von TreF | 45 |
| 5.1.1.3. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz von TreF | 47 |
| 5.1.2. Biochemische Charakterisierung von TreF | 47 |
| 5.1.2.1. Die K_m von TreF beträgt 1,9 mM, die v_{max} 54 Units pro mg Protein | 47 |
| 5.1.2.2. TreF spaltet spezifisch Trehalose | 49 |
| 5.1.2.3. TreF hat ein breites pH-Optimum im neutralen Bereich | 50 |
| 5.1.2.4. Die Trehalase-Aktivität wird nicht durch divalente Kationen stimuliert | 51 |
| 5.1.2.5. TreF wird durch hohe Salzkonzentrationen in seiner Aktivität gehemmt | 52 |
| 5.1.2.6. <i>In vivo</i> ist die TreF-Aktivität unter hochosmolaren Bedingungen erhöht | 54 |
| 5.1.2.7. Produktion und Charakterisierung von TreF-Antiserum | 54 |
| 5.1.3. Strukturelle Untersuchungen von Trehalasen | 55 |
| 5.1.3.1. Homologie der Trehalasen von <i>E. coli</i> | 55 |
| 5.1.3.2. Sekundärstrukturanalysen von Trehalasen | 57 |
| 5.1.3.3. TreF liegt als Monomer vor | 61 |
| 5.1.3.4. Der N-Terminus von TreF ist Proteasen frei zugänglich | 62 |
| 5.1.3.5. Die N-terminalen 45 Aminosäuren sind nicht für die Trehalase-Aktivität erforderlich | 62 |
| 5.1.3.6. Durch limitierte Proteolyse an gereinigtem TreF läßt sich keine Domänenstruktur ermitteln | 63 |
| 5.1.3.7. Unter geeigneten Bedingungen kann TreF bis zu 74,2 % renaturiert werden | 65 |
| | |
| 5.2. Vergleich der Translokations- und Faltungseigenschaften von TreA und TreF <i>in vivo</i> | 68 |
| 5.2.1. Untersuchungen an Vorläufer-TreF | 68 |
| 5.2.1.1. TreF ist translokationskompetent, wenn es als Vorläuferprotein synthetisiert wird | 68 |
| 5.2.1.2. Als Vorläuferprotein synthetisiertes TreF wird im <i>degP</i> ⁻ Stamm stabilisiert | 68 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 5.2.1.3. | TreF weist im Periplasma nur sehr geringe Aktivität auf | 69 |
| 5.2.1.4. | Prozessiertes TreF ist im Periplasma aggregiert | 70 |
| 5.2.1.5. | Die Ausbildung von Disulfidbrücken durch DsbA ist nicht der ausschließliche Grund für die Aggregation von TreF im Periplasma | 72 |
| 5.2.1.6. | Das Verhalten von TreF verändert sich nicht, wenn es statt an die Signalsequenz an den N-Terminus des reifen TreA fusioniert ist | 72 |
| 5.2.1.7. | TreA`-TreF wird im Periplasma abgebaut und in einer <i>degP</i> -Null-Mutante stabilisiert | 72 |
| 5.2.1.8. | TreA`-TreF hat im Periplasma nur geringe Aktivität | 73 |
| 5.2.1.9. | Selektion für prozessiertes TreF mit höherer Aktivität | 73 |
| 5.2.1.10. | Plasmid-codierte Mutationen lösen erhöhte Trehalase-Aktivität aus | 75 |
| 5.2.1.11. | Die erhöhte Aktivität von TreF24 und TreF25 im Periplasma wird durch verschiedene Punktmutationen ausgelöst | 75 |
| 5.2.1.12. | In den Mutanten ist die Trehalase-Aktivität 4-7-fach erhöht | 77 |
| 5.2.1.13. | Die Expression der TreF-Mutanten unterscheidet sich nicht von der des TreF im Periplasma | 77 |
| 5.2.1.14. | Die Mutationen von TreFA ₈₂ ->T und TreFT ₁₇₂ ->I verhindern die Aggregation im Periplasma nicht | 78 |
| 5.2.2. | Faltung von TreA | 79 |
| 5.2.2.1. | TreA benötigt die Faltungskatalysatoren DsbA, RotA und SurA nicht zur Ausbildung ihrer aktiven Konformation <i>in vivo</i> | 79 |
| 5.2.2.2. | TreA ist im Zytoplasma aktiv, wenn es ohne Signalsequenz exprimiert wird | 81 |
| 5.2.2.3. | Die Substrataffinität von TreA ist im Zytoplasma vergleichbar mit der im Periplasma | 83 |
| 5.2.3. | Selektion und Charakterisierung von Trehalase-Hybriden aus TreA und TreF | 83 |
| 5.2.3.1. | Das Selektionssystem für Trehalase-Hybride | 83 |
| 5.2.3.2. | Durchführung der genetischen Selektion | 85 |
| 5.2.3.3. | Alle aktiven Trehalasen sind durch Deletionen von ca. 750 bp entstanden | 86 |
| 5.2.3.4. | Fusionspunkte der TreA`-TreF-Hybride | 86 |
| 5.2.3.5. | Die TreA`-TreF-Hybride werden entsprechend der erwarteten Größe exprimiert | 91 |
| 5.2.3.6. | TreA`-TreF1 und TreA`-TreF8 werden im <i>degP</i> -Stamm stabilisiert | 94 |
| 5.2.3.7. | Die Trehalase-Aktivitäten der Trehalase-Hybride TreA`-TreF1 und Δ ssTreA`-TreF1 sind mit denen der Wildtyp Trehalasen vergleichbar | 94 |
| 5.2.3.8. | TreA`-TreF1 liegt im Periplasma als lösliches Protein vor, TreA`-TreF8 ist größtenteils aggregiert | 96 |
| 5.2.3.9. | Die Substrataffinität der Trehalase-Hybride ist mit der von TreA vergleichbar | 97 |
| 5.2.4. | Untersuchung der Translokationseigenschaften der Trehalasen unabhängig von der Signalsequenz | 100 |
| 5.2.4.1. | Δ ssTreA wird im <i>prlA4</i> -Stamm transloziert | 104 |
| 5.2.4.2. | Δ ssTreA`-TreF1 wird im <i>prlA4</i> -Stamm nicht transloziert | 104 |
| 5.2.4.3. | Lokalisation von TreF | 105 |
| 5.2.4.4. | Die <i>prlA4</i> -Mutation hat keinen Einfluß auf die Translokation von Trehalasen, die als Vorläuferproteine synthetisiert werden | 106 |

| | |
|--|-----------|
| 6. Diskussion | 107 - 127 |
| 6.1. Wie sind die Trehalasen an ihr jeweiliges `Kompartiment` angepaßt? | 107 |
| 6.1.1. Gibt es eine <i>funktionelle</i> Anpassung der Trehalasen an ihr jeweiliges Kompartiment? | 107 |
| 6.1.1.1. Die enzymatischen Eigenschaften von TreA und TreF unterscheiden sich nicht erheblich voneinander | 107 |
| 6.1.1.2. Vergleich der zellulären Bedeutung von TreA und TreF | 108 |
| 6.1.2. Gibt es eine <i>strukturelle</i> Anpassung der Trehalasen an die verschiedenen Kompartimente? | 109 |
| 6.1.2.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen von TreA und TreF | 109 |
| 6.1.2.2. Die Sekundärstruktur von TreA und TreF ist so stark konserviert, daß funktionelle Hybride aus beiden Trehalasen gebildet werden können | 111 |
| 6.1.2.3. Die konservierten Motive PGGRF _x ExY _x WD _x Y und QWD _x P _x GAWPAP liegen vermutlich innerhalb der selben Domäne | 112 |
| 6.2. Benötigen die beiden Trehalasen `Kompartiment-spezifische` Faltungshelfer zur Ausbildung ihrer Konformation? | 114 |
| 6.2.1. TreF kann sich im Periplasma nicht zu seiner aktiven Konformation falten | 114 |
| 6.2.1.1. Mutationen, die die Aktivität von TreF im Periplasma erhöhen, sorgen nicht für eine bessere Löslichkeit der Proteine | 115 |
| 6.2.1.2. Für die <i>in vivo</i> Faltung von TreF könnte ein molekulares Chaperon erforderlich sein | 115 |
| 6.2.2. Im Gegensatz zu TreF kann sich das TreA`-`TreF-Hybrid im Periplasma zu einem löslichen, aktiven Protein falten | 117 |
| 6.2.3. Die Ausbildung von Disulfidbrücken könnte die Faltung von TreF im Periplasma verhindern | 118 |
| 6.2.4. TreA kann sich im Zytoplasma falten | 118 |
| 6.3. Wie wird die korrekte Lokalisation von TreA und TreF gewährleistet? Gibt es über die Signalsequenz hinaus Informationen, die über die Lokalisation entscheiden? | 119 |
| 6.3.1. TreF wird als erstes zelleigenes zytoplasmatisches Protein effizient ins Periplasma transloziert | 119 |
| 6.3.2. TreA wird auch ohne Signalsequenz im <i>prlA4</i> -Stamm transloziert | 123 |
| 6.3.3. Das Trehalase-Hybrid TreA`-`TreF1 wird zwar mit Signalsequenz transloziert, aber nicht dann, wenn es ohne Signalsequenz im <i>prlA4</i> -Stamm exprimiert wird | 123 |
| 6.3.4. Ausblick: Wird TreF im <i>prlA4</i> -Stamm transloziert? | 125 |
| 7. Literatur | 127 - 140 |

1.1. Verzeichnis der Tabellen

| | |
|---|-----|
| Tab. 4.1. Bakterienstämme | 26 |
| Tab. 4.2. Plasmide | 28 |
| Tab. 4.3. Reaktionsbedingungen für die limitierte Proteolyse | 41 |
| Tab. 5.1. Reinigung von TreF | 46 |
| Tab. 5.2. Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität von TreF | 51 |
| Tab. 5.3. Einfluß verschiedener Ionen auf die TreF-Aktivität | 52 |
| Tab. 5.4. Renaturierung von TreF | 65 |
| Tab. 5.5. Trehalase-Aktivität von TreF und TreA`-TreF im Periplasma | 69 |
| Tab. 5.6. Aktivität der TreF-Mutanten | 77 |
| Tab. 5.7. Einfluß von Faltungshelfer-Mutationen auf die Aktivität von TreA | 79 |
| Tab. 5.8. Vergleich der Trehalase-Aktivitäten im Periplasma und im Zytoplasma | 82 |
| Tab. 5.9. Aktivität der Trehalase-Hybride | 95 |
| Tab. 5.10. K_m -Werte verschiedener Trehalasen | 100 |
| Tab. 5.11. Einfluß der <i>prlA4</i> -Mutation auf die Aktivität verschiedener Trehalasen und Trehalase-Konstrukte | 101 |
| Tab. 6.1. Vergleich der enzymatischen Eigenschaften von TreA und TreF | 108 |
| Tab. 6.2. Vergleich der Hydrophobizität verschiedener Signalsequenzen | 122 |

1.3. Verzeichnis der Abbildungen

| | |
|--|-----|
| Abb. 3.1. Struktur der Trehalose | 4 |
| Abb. 3.2. Trehalosestoffwechsel von <i>E. coli</i> | 12 |
| Abb. 5.1. Überproduktion und Reinigung von TreF | 46 |
| Abb. 5.2. Bestimmung der kinetischen Parameter von TreF | 48 |
| Abb. 5.3. Substratspezifität von TreF | 49 |
| Abb. 5.4. Hemmung der TreF-Aktivität durch hohe Salzkonzentrationen | 53 |
| Abb. 5.5. Spezifität des TreF-Antiserums | 55 |
| Abb. 5.6. Sequenzvergleich von TreA und TreF | 56 |
| Abb. 5.7. Vorhersage von Sekundärstruktur und Lösungsmittelzugänglichkeit für Trehalasen | 58 |
| Abb. 5.8. Molekulargewichtsbestimmung von TreF | 61 |
| Abb. 5.9. Limitierte Proteolyse von TreF | 64 |
| Abb. 5.10. Aggregation von TreF und TreA`-TreF im Periplasma eines <i>degP</i> ⁻ Stammes | 71 |
| Abb. 5.11. Selektionsprinzip für aktive Trehalasen im Periplasma | 74 |
| Abb. 5.12. Konsensussequenzen der Trehalasen im ersten in Glykosylhydrolasen konservierten Bereich | 76 |
| Abb. 5.13. Expression von prozessiertem TreF und TreF-Mutanten und Stabilisierung im <i>degP</i> ⁻ Stamm | 78 |
| Abb. 5.14. Einfluß verschiedener Faltungshelfer-Mutationen auf die Expression von TreA | 81 |
| Abb. 5.15. Selektionsprinzip für Trehalase-Hybride | 85 |
| Abb. 5.16. Homologievergleich von <i>treA</i> und <i>treF</i> und Lokalisation der Fusionspunkte der Trehalase-Hybride | 87 |
| Abb. 5.17. Expression der verschiedenen Trehalase-Konstrukte | 92 |
| Abb. 5.18. Wildtyp-Trehalasen, Trehalase-Konstrukte und Trehalase-Hybride | 93 |
| Abb. 5.19. Stabilisierung der Trehalase-Hybride im <i>degP</i> ⁻ Stamm | 94 |
| Abb. 5.20. Löslichkeit der Trehalase-Hybride | 97 |
| Abb. 5.21. Substrataffinitäten verschiedener Trehalasen | 99 |
| Abb. 5.22. Lokalisation der ohne Signalsequenz exprimierten Trehalasen | 103 |
| Abb. 6.1. Domänenstrukturen von Trehalasen | 113 |