

5. Ergebnisse:

5.1. Reinigung und biochemische Charakterisierung von TreF

5.1.1. Reinigung von TreF

5.1.1.1. Überexpression von TreF

Um die zytoplasmatische Trehalase TreF für eine effiziente Reinigung überexprimieren zu können, wurde das Plasmid pBADtreF konstruiert (siehe Plasmidkonstruktionen, Kapitel 4.3.3.), in dem die Expression von TreF unter Kontrolle des Arabinose-Promotors liegt. Das Plasmid wurde in KU68, einen *treA*-Stamm, der Arabinose nicht verstoffwechseln kann, transformiert. Durch Zugabe von L-Arabinose zum Medium konnte die TreF-Expression induziert werden.

Um die optimalen Expressionsbedingungen für die zytoplasmatische Trehalase zu ermitteln, wurden verschiedene Parameter, wie z.B. das Wachstumsmedium, der Zeitpunkt der Induktion sowie die Konzentration an Arabinose, variiert. Die Überexpression wurde dann anhand von Comassie Blau-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen überprüft. (Daten nicht gezeigt.) Eine optimale Überexpression konnte durch Zugabe von 1 mM L-Arabinose zu einer MMA-Kultur mit Casaminoacids als Kohlenstoffquelle bei einer OD_{578} von ca. 0,5 und einer Ernte nach anschließender zweistündiger Inkubation bei 37°C erzielt werden (Abb. 5.1.).

5.1.1.2. Reinigung von TreF

KU68-Zellen, die das Plasmid pBADtreF enthielten (KU68pBADtreF), wurden unter den für die Überexpression optimierten Bedingungen angezogen, geerntet und mit der French-Press-Zelle aufgeschlossen. TreF wurde dann aus dem Extrakt durch Ammoniumsulfat-Fällung, hydrophobe Interaktions-Chromatographie (Phenylsepharose) und Anionenaustauscher-Chromatographie (MonoQ) gereinigt (Vergl. Kapitel 4.4.6.).

Die Proben aus den einzelnen Reinigungsschritten wurden jeweils auf Proteinkonzentration und Trehalase-Aktivität untersucht. Die Anwesenheit des Proteins der richtigen Größe (~63 kDa) wurde auf Polyacrylamid-Gelen überprüft. Der Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte geht aus Tabelle 5.1. und Abb. 5.1. hervor.

TreF läuft entsprechend seinem errechneten Molekulargewicht bei ca. 63 kDa auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel.

Wie Abb. 5.1. zeigt, war TreF nach der MonoQ-Säule im wesentlichen rein.

Tabelle 5.1.: Reinigung von TreF

Probe	Gesamtprotein [mg]	Trehalase-Aktivität [U ^a /mg Protein]
French Press Extrakt	1020	2,5
10 - 40 % Ammoniumsulfat Fraktion	92	22,7
Phenylsepharose	44	37,4
MonoQ	3,8	59,9

^a) Ein Unit (U) entspricht der Hydrolyse von 1 μ mol Trehalose pro Minute. Die Trehalase-Tests wurden in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0 mit 100 mM Trehalose bei Raumtemperatur durchgeführt.

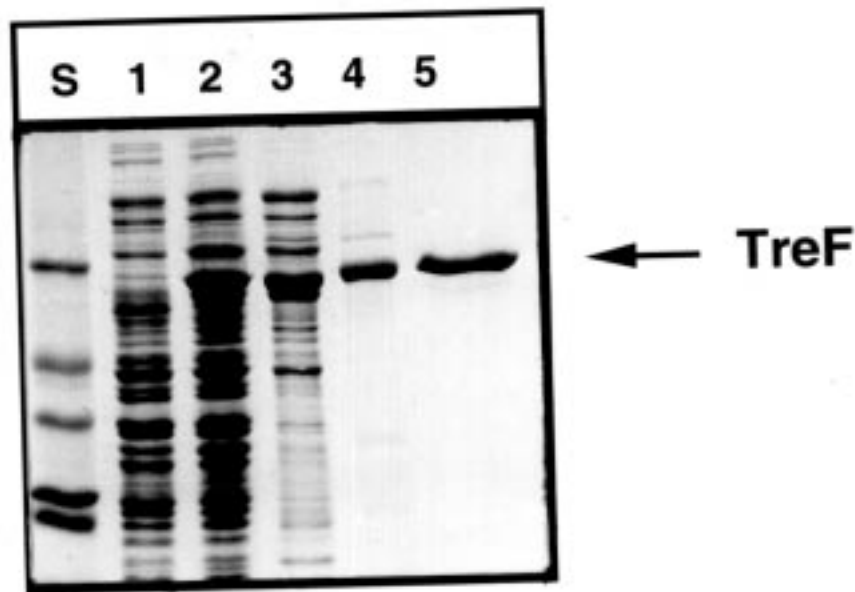


Abb. 5.1.: Überproduktion und Reinigung von TreF

Für Abb. 5.1. wurden je 10 μ g Protein aus den einzelnen Reinigungsschritten mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Comassie Blau angefärbt.

Molekulargewichtsstandard, von oben nach unten: 66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 20,1 kDa, 14,2 kDa; **1**: Ganzzellextrakt von KU68pBADtreF, uninduziert; **2**: Ganzzellextrakt von KU68pBADtreF, induziert mit 1mM L-Arabinose; **3**: 10-40 % gesättigte Ammoniumsulfatfraktion; **4**: zusammengefaßte Fraktionen nach der Phenylsepharose Säulenchromatographie; **5**: zusammengefaßte Fraktionen nach der Anionenaustauscher Chromatographie (MonoQ).

5.1.1.3. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz von TreF

Ca. 50 µg des gereinigten Proteins wurden von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran geblottet und die 10 N-terminalen Aminosäuren des Enzyms von Herrn L. Cobianchi (Fakultät für Biologie, Universität Konstanz) sequenziert. Als N-terminale Aminosäuren wurden Met Leu Asn Gln Lys Ile Gln Asn Pro Asn identifiziert. Sie stimmen mit der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz überein und bestätigen, daß es sich bei dem gereinigten Enzym um TreF handelt und daß aus der DNA-Sequenz das richtige offene Leseraster für TreF vorgeschlagen wurde.

5.1.2. Biochemische Charakterisierung von TreF

Die biochemische Charakterisierung der zytoplasmatischen Trehalase verfolgte verschiedene Ziele: Einerseits sollten die optimalen Testbedingungen zur Bestimmung der Trehalase-Aktivität ermittelt werden. Andererseits sollten durch die Kenntnis der biochemischen Eigenschaften von TreF Rückschlüsse auf die *in vivo*-Funktion gewonnen und ein Vergleich mit der periplasmatischen Trehalase TreA ermöglicht werden.

5.1.2.1. Die K_m von TreF für Trehalose beträgt 1,9 mM, die v_{max} 54 Units pro mg Protein

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter von gereinigtem TreF wurde die Trehalase-Aktivität bei unterschiedlichen Trehalose-Konzentrationen zwischen 0,5 und 20 mM bestimmt. Die Substrataffinität (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) wurden aus der reziproken Auftragung nach Lineweaver und Burk ermittelt (Abb. 5.2.). Die K_m für TreF beträgt 1,9 mM und die V_{max} 54 Units pro mg Protein.

Abb. 5.2.: Bestimmung der kinetischen Parameter von TreF

A) Trehalase-Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Die Messungen wurden in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Werte wurden aus drei voneinander unabhängigen Messungen gemittelt. Die Standardabweichung lag jeweils unter 4 %.

^{a)}Die Trehalase-Aktivität wurde durch Quantifizierung der freigesetzten Glukose ermittelt. Sie besagt, wieviel Units pro mg Protein gespalten wurden.

B) Lineweaver-Burk-Blot zur Ermittlung der kinetischen Parameter von TreF

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurde die Aktivität gegen die Substratkonzentration reziprok aufgetragen. Die Substratabhängigkeit der Trehalase-Aktivität ließ sich dann als Gleichung der Ausgleichsgeraden beschreiben. Aus der Geradengleichung konnten nach Lineweaver und Burk die Substrataffinität (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) berechnet werden.

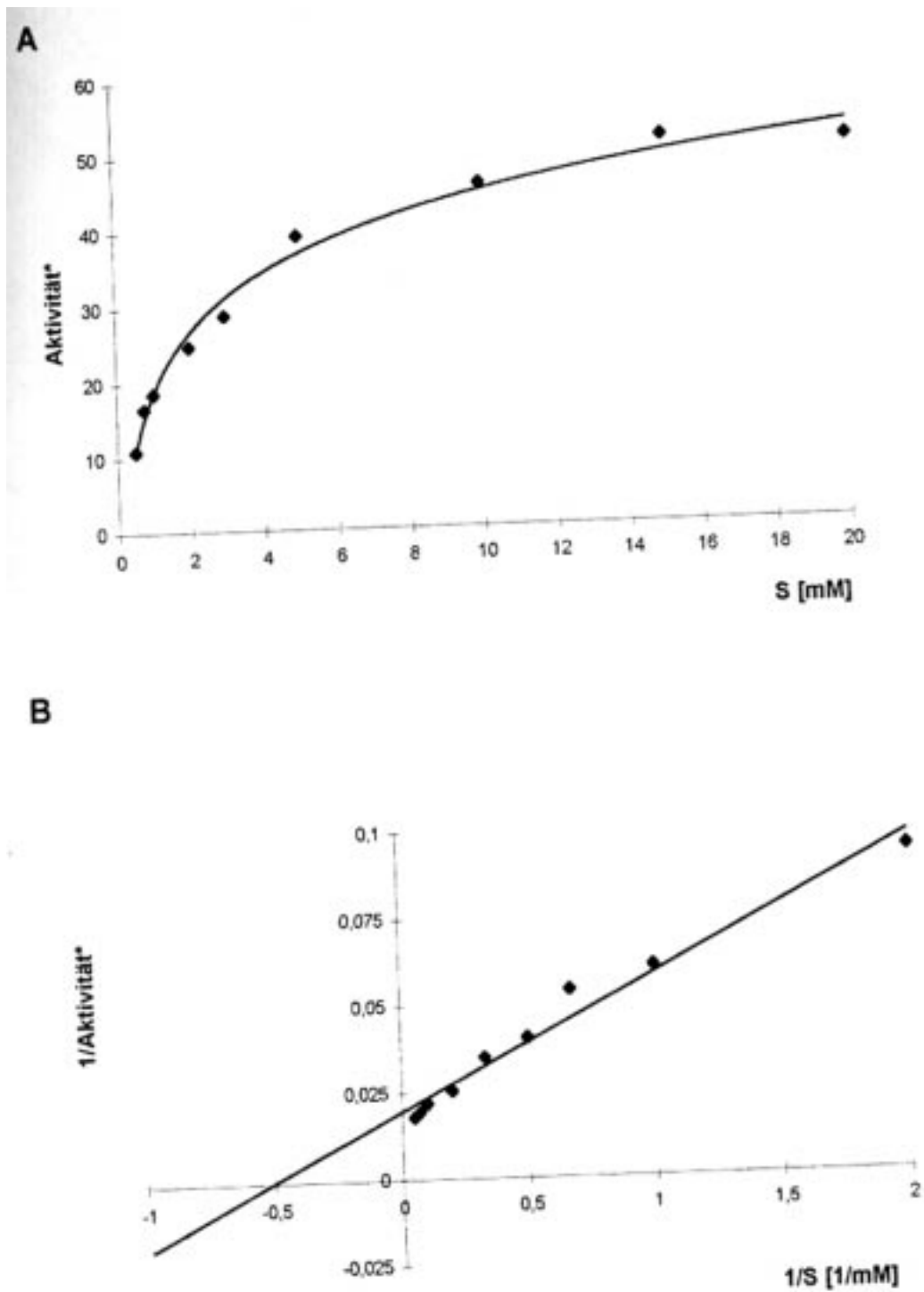


Abb. 5.2.: Bestimmung der kinetischen Parameter von TreF

5.1.2.2. TreF spaltet spezifisch Trehalose

Die zytoplasmatische Trehalase hydrolysierte neben Trehalose keine weiteren Disaccharide. Nach 16-stündiger Inkubation von 1 µg gereinigtem TreF mit 20 mM Trehalose, Lactose, Maltose bzw. Saccharose konnte mittels Dünnschicht Chromatographie lediglich bei Trehalose eine Abnahme des Ausgangssubstrats und die Entstehung von Glukose als Reaktionsprodukt beobachtet werden. Abb. 5.3. zeigt die Substratspezifität von TreF für Trehalose.

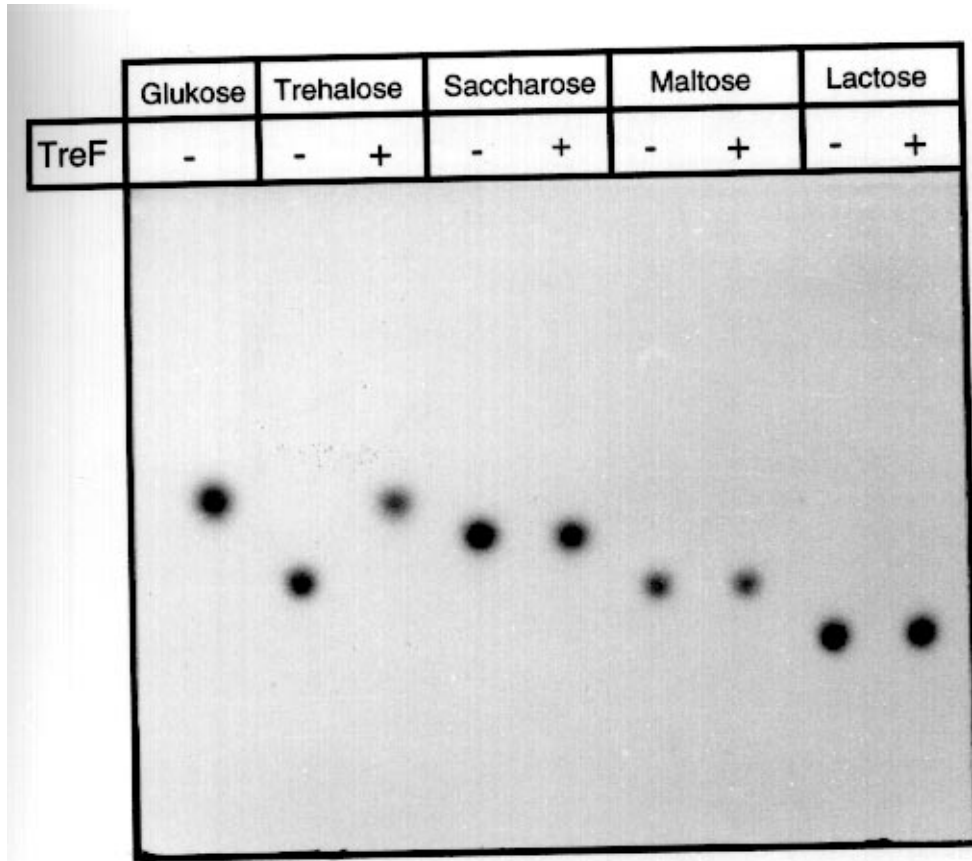


Abb. 5.3.: Substratspezifität von TreF

Die Disaccharide wurden jeweils mit und ohne TreF (1 µg) für 16 Stunden bei Raumtemperatur in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, inkubiert. Anschließend wurden je 10 µg Glukose als zusätzliche Kontrolle auf eine Kieselgel-Dünnschicht-Chromatographie-Platte aufgetragen. Die Platte wurde chromatographiert, in 2 %-ige Schwefelsäure (in Methanol) eingetaucht und bei 180°C entwickelt.

Von links nach rechts wurden Glukose, Trehalose, Saccharose, Maltose und Laktose aufgetragen. Zum Vergleich der Reaktionsprodukte mit den Ausgangssubstanzen befinden sich bei Trehalose, Saccharose, Maltose und Laktose jeweils links neben den Reaktionsansätzen die entsprechenden Disaccharide, die ohne TreF inkubiert worden waren.

5.1.2.3. TreF hat ein breites pH-Optimum im neutralen Bereich

Der Einfluß des pH-Wertes auf die zytoplasmatische Trehalase wurde untersucht, indem die TreF-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 4,0 und pH 9,0 bestimmt wurde. Dabei wurde TreF für eine Stunde in Puffer des jeweiligen pH-Wertes vorinkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von 100 mM Trehalose in dem selben Puffer gestartet.

Die zytoplasmatische Trehalase tolerierte einen weiten pH-Bereich (siehe Tabelle 5.2.). Sie hatte ein ausgedehntes pH-Optimum zwischen pH 6,0 und pH 7,5. Bei den unphysiologischen pH-Werten, pH 5,0 im sauren und pH 9,0 im basischen Bereich, nahm die Aktivität auf ca. 35 % der maximalen Aktivität ab. Die Trehalase-Aktivität im pH-Optimum betrug 38,6 Units pro mg Protein. Sie lag trotz Substratsättigung deutlich unter den Werten, die bei der Substratabhängigkeit ermittelt wurden. Dies könnte durch den Einfluß der hohen Osmolarität des Puffers erklärt werden (vergl. Kapitel 5.1.2.5.).

Im Gegensatz zu TreF ist das pH-Optimum von TreA in den sauren Bereich verschoben. Die periplasmatische Trehalase erreicht ihre maximale Aktivität bei pH 5,5. Bei neutralem pH nimmt die Aktivität auf ca. ein Viertel des Höchstwertes ab (Tourinho-dos-Santos et al., 1994).

Tabelle 5.2.: Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität von TreF

pH-Wert ^{a)}	TreF-Aktivität ^{b)}	% der maximalen Aktivität	
		TreF	TreA ^{c)}
4,0	3,1	8	75
4,5	8,0	21	77
5,0	13,1	34	92
5,5	28,6	74	100
6,0	38,6	100	72
6,5	36,1	94	49
7,0	36,1	94	24
7,5	32,1	83	-
8,0	28,6	74	-
8,5	27,6	72	-
9,0	14,3	37	-

a) Von pH 4,0-5,5 wurde 100 mM Natriumcitrat als Puffer eingesetzt. Von pH 5,5-7,5 wurde 100 mM Kaliumphosphat-Puffer verwendet und die Messungen von pH 7,5 bis pH 9,0 wurden in 100 mM Natriumcarbonat durchgeführt. Bei pH 5,5 ergab sich in Natriumcitrat-Puffer die gleiche Trehalase-Aktivität wie in Kaliumphosphat-Puffer. Bei pH 7,5 entsprach die Aktivität in Kaliumphosphat-Puffer der in Natriumcitrat-Puffer. Die puffernden Substanzen hatten also keinen unterschiedlichen Einfluß auf die Trehalase-Aktivität.

b) Die Trehalase-Aktivität wurde ermittelt, indem die Menge an freigesetzter Glukose mit Hilfe des Glukose-Peroxidase-Tests bestimmt wurde. Die Aktivität ist in Units pro mg Protein angegeben. Die Werte wurden aus drei unabhängigen Messungen gemittelt. Die Standardabweichung lag jeweils unter 5 %. Die Puffer mit den unterschiedlichen pH-Werten hatten in den eingesetzten Mengen keinen Einfluß auf den Glukose-Peroxidase-Test.

c) Zum Vergleich sind die von Tourino-dos-Santos et al. (Tourinho-dos-Santos et al., 1994) ermittelten Werte für TreA angegeben.

5.1.2.4. Die Trehalase-Aktivität wird nicht durch divalente Kationen stimuliert

Eine Aktivierung von Trehalasen durch divalente Kationen, wie Ca^{2+} , Co^{2+} und Mn^{2+} , wurde für die 280 kDa Trehalase aus *Candida utilis* (Arguelles und Gacto, 1986) und für die extrazelluläre Trehalase von *Humicola grisea* beschrieben (Zimmermann et al., 1990). Gleichzeitig wurde eine Hemmung dieser Trehalasen durch Zn^{2+} und Hg^{2+} beobachtet (Arguelles und Gacto, 1986; Chen et al., 1987).

Eine Stimulierung der Aktivität der zytoplasmatischen Trehalase von *E. coli* durch divalente Kationen konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5.3.). Entsprechend hatte auch die Zugabe des Chelators EDTA keinen Effekt auf die TreF-Aktivität. Bei höheren Konzentrationen (10 mM) hatten alle getesteten zweiwertigen Kationen einen hemmenden Einfluß auf die Trehalase-Aktivität.

Tabelle 5.3.: Einfluß verschiedener Ionen auf die TreF-Aktivität

Ion	% der Trehalase-Aktivität ^{a)} bei einer Ionenkonzentration von:	
	1 mM	10 mM
CaCl ₂	100	24
MgCl ₂	100	65
MnCl ₂	103	44
ZnCl ₂	55	24
CoCl ₂	90	13
NH ₄ Cl ₂	105	110
EDTA	110	113

^{a)} Die Aktivität von 100 % entspricht der Hydrolyse von 45 µmol Trehalose pro min und mg TreF. Sie wurde in 100 mM Tris-HCl (pH 7,0) in Anwesenheit der genannten Kationen bei Raumtemperatur bestimmt. Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Messungen.

Zur Überprüfung, ob die Ionen in den eingesetzten Konzentrationen den Glukose-Peroxidase-Test beeinträchtigen, wurde jeweils eine geeichte Glukosekonzentration in Anwesenheit der verschiedenen Ionen bestimmt. Der Enzymtest wurde durch die Ionen nicht gestört.

5.1.2.5. TreF wird durch hohe Salzkonzentrationen in seiner Aktivität gehemmt

Die Osmolarität spielt eine wichtige Rolle bei der *in vivo*-Regulation des Trehalose-Systems von *E. coli*. Es war daher interessant, den Einfluß der Osmolarität auf die gereinigte zytoplasmatische Trehalase zu untersuchen. Dazu wurde die TreF-Aktivität in verschiedenen Konzentrationen an Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Kaliumglutamat und Glycin-Betain bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.4. dargestellt.

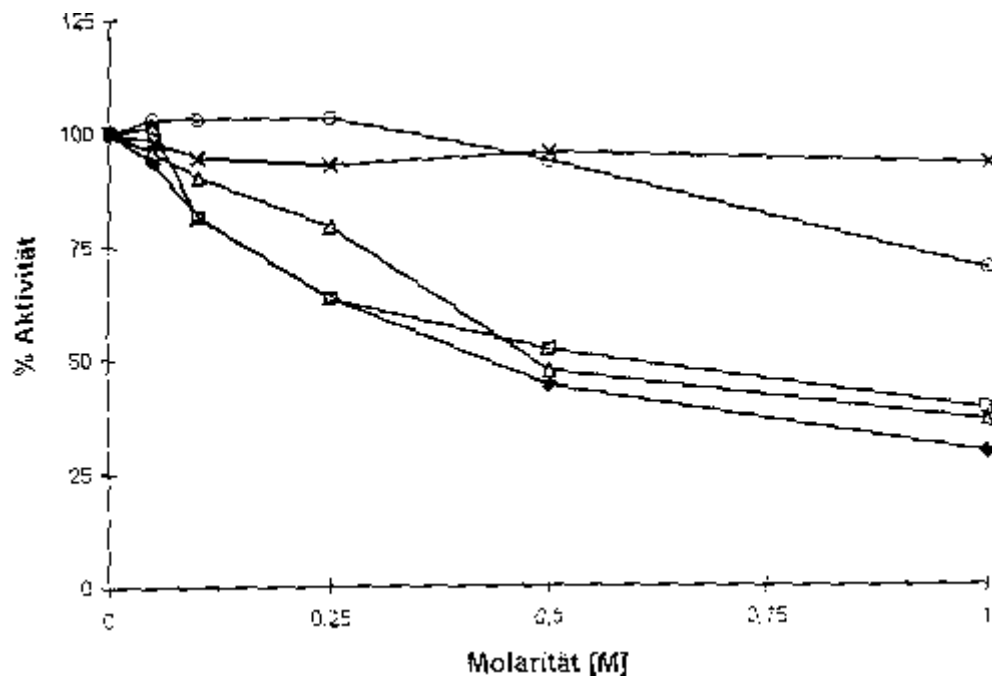


Abb. 5.4.: Hemmung der TreF-Aktivität durch hohe Salzkonzentrationen

Die Trehalase-Aktivität wurde bei Substratsättigung in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0, bestimmt, der Kaliumchlorid (Rauten), Natriumchlorid (Quadrate), Kaliumglutamat (Dreiecke) und Glycin-Betain (Kreuze) in den angegebenen Konzentrationen enthielt. 100 % Aktivität entsprachen der Hydrolyse von 59,9 μmol Trehalose pro min und mg Protein. Zum Vergleich wurde auch die Aktivität der periplasmatischen Trehalase in verschiedenen Konzentrationen an Natriumchlorid ermittelt (Kreise).

Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Kaliumglutamat hatten einen gleichermaßen negativen Einfluß auf die TreF-Aktivität. Bei einer Konzentration dieser Ionen von 0,5 M war die Trehalase-Aktivität um ca. 50 % erniedrigt. Mit steigender Osmolarität nahm die Aktivität weiter ab. Gleiche Konzentrationen an Glycin-Betain, einem sogenannten 'compatible solute', hatten keinen Effekt auf die TreF-Aktivität.

Die periplasmatische Trehalase TreA war gegenüber hoher Osmolarität weniger empfindlich. Ihre Aktivität blieb bis zu einer Salzkonzentration von 0,5 M beinahe unverändert und verringerte sich bei 1 M Natriumchlorid lediglich um 25 %.

5.1.2.6. *In vivo* ist die TreF-Aktivität unter hochosmolaren Bedingungen erhöht

Bei hoher Osmolarität des Mediums synthetisiert *E. coli* die osmotische Schutzsubstanz Trehalose. Unter den selben Bedingungen findet jedoch auch eine Induktion des Trehalose-abbauenden Enzyms TreF statt (siehe Einleitung). Nach dem derzeitigen Verständnis des Trehalose-Stoffwechsels würde man vermuten, daß die TreF-Aktivität unter hochosmolaren Bedingungen inhibiert wird, und daß TreF erst bei Erniedrigung der Osmolarität zur Verfügung steht, um die osmotische Schutzsubstanz abzubauen und zu verwerten.

Hochosmolare Bedingungen hatten einen positiven Einfluß auf die TreF-Aktivität *in vivo*. Natriumchlorid (300 mM) im Wachstumsmedium führte zu einer Erhöhung der TreF-Aktivität eines Zellextraktes von KU92 (*treA*⁻) von 0,004 Units pro mg Zellprotein auf 0,044 Units pro mg Zellprotein. (Um die Bedingungen bezüglich der Osmolarität im Enzymtest gleich zu halten, wurde den in normal osmolarem Medium gewachsenen Zellen nach deren Aufschluß 300 mM NaCl zugefügt.)

Der Unterschied in der Aktivität zwischen mit und ohne NaCl gewachsenen Zellen blieb auch dann erhalten, wenn beide Extrakte gegen 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0, dialysiert wurden. Eine Inhibition von TreF unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen wurde nicht beobachtet. Die Zunahme der Aktivität könnte auf die Osmoinduktion zurückzuführen sein.

5.1.2.7. Produktion und Charakterisierung von TreF-Antiserum

Das gegen die periplasmatische Trehalase gerichtete Antiserum erkannte die zytoplasmatische Trehalase trotz der hohen Homologie der Aminosäuresequenzen nur in sehr geringem Ausmaß (Daten nicht gezeigt). Zur Analyse von *in vivo* Untersuchungen an TreF waren deshalb Antikörper mit besserer Substraterkennung erforderlich.

TreF-Antiserum wurde durch wiederholte Immunisierung eines Kaninchens mit je 150 µg gereinigtem Protein gewonnen. Der Erfolg der Immunisierungsschritte wurde jeweils im Western Blot getestet. Eine Woche nach der vierten Immunisierung wurde das Kaninchen ausgeblutet und das Antiserum aufbereitet. Abb. 5.5. zeigt einen Western Blot von verschiedenen Proben, der mit dem TreF-Antiserum entwickelt wurde.

Das gegen TreF gerichtete Antiserum war spezifisch genug für weitere Untersuchungen. Neben der Hauptaffinität zu TreF hatte das Antiserum auch in geringem Maße Affinität zu einem Protein, welches bei ca. 70 kDa auf dem Polyacrylamid-Gel läuft. Dieses Protein konnte mit Hilfe eines DnaK Antiserums im Western Blot als DnaK identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich enthielt die TreF-Lösung, die dem Kaninchen injiziert wurde, geringe Spuren an DnaK.

Die Kreuzspezifität des TreF-Antiserum gegen TreA war ebenso wie die Kreuzspezifität des TreA-Antiserum gegen TreF sehr gering.

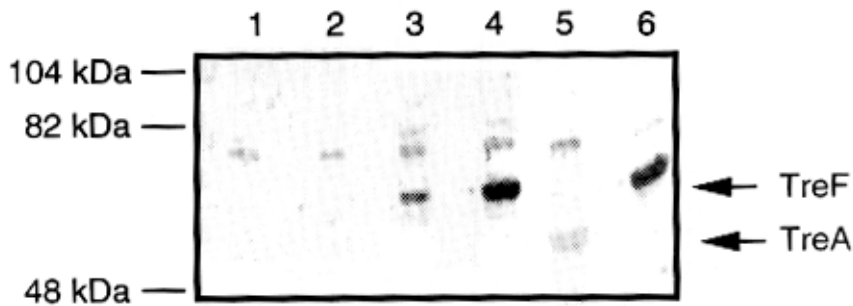


Abb. 5.5.: Spezifität des TreF-Antiserums

20 µg Protein von Zellextrakten verschiedener Stämme sowie 10 µg gereinigtes Protein wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (10 % Polyacrylamid) aufgetragen, aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde mit dem TreF-Antiserum (1:10000 verdünnt) entwickelt. Die erwarteten Größen für TreF und TreA sind jeweils mit einem Pfeil angedeutet. Folgende Proben wurden aufgetragen: **1:** vorgefärbter Proteinstandard (von oben nach unten: 142; 97; 50; 36; 29,7 und 21,9kDa), **2:** KU96 (*treA::Spec^R*, *treF::Kan^R*), **3:** KU92 (*treA::Spec^R*), **4:** KU92pTre11, **5:** KU92pBADtreF (mit 5 µM Arabinose induziert)

5.1.3. Strukturelle Untersuchungen von Trehalasen

Die Ausbildung von Domänenstrukturen und die Oligomerisierung sind wichtige Schritte bei der Faltung eines Enzyms zur aktiven Konformation. Die Kenntnis der Struktur eines Proteins ist daher für das Verständnis seiner Faltung von Interesse.

5.1.3.1. Homologie der Trehalasen von *E. coli*

Um die Aminosäuresequenzen der periplasmatischen und der zytoplasmatischen Trehalase zu vergleichen, wurde ein Sequenz-Alignment mit dem Programm Clustal V durchgeführt. Abb. 5.6. zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Trehalasen.

Abb. 5.6.: Sequenzvergleich von TreA und TreF von *E. coli*

		TL
TreF	MLNQKIQNPNPDELMI E-VDL CYELDPYELKLD EMI EAEPEPEMI EGLPA	
TreA	MKSPAPSRPQK MALIPACIFLCFA-----ALSVQAEETPVTPQPF	
	* . . . * . . . * . . . ** *	
		LEP
TreF	SDALTPADRYLELFEHQSAKIFPDSKITFPDCAPKMDPLDILIRYRKVRR	
TreA	DILLGP-----LFNMQNAKLFPDQKTFADAVPNSDPLMILADYRMOQN	
	* * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
		Prot.K
TreF	HRDFDLRKFVENHFVWLPEVYSSEYVSDPQNSLKEHIDQLWPFVLTREPQDH	
TreA	QSGFDLRHFVNVNFTLPKE-GEKYVPPEGQSLREHIDGLWPFVLTRESTNT	
	. . ***** * . . * ** . . * . . . * . . . ***** * . . . *	
		EGGFEXQMDXY
TreF	IFWSSLLALPQSYIVPGGRFSEIYYWDSYFTMLGLAESGRELLKCMADN	
TreA	EKWDSLPLPEPVVPGGRFREVYYWDSYFTMLGLAESGHDKVADMVAN	
	* * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
TreF	FAWMIENYGHIPNGNRTYYLSRSQPPVFALMV E L F - E E D G V R G A R R Y L D H	
TreA	FAHEIDTYGHIPNGNRSYYLSRSQPPFFALMV E L L A C H E G D A A L K Q Y L P Q	
	** * . . ***** * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
TreF	LKMEYAFWMDGAESLIPNQAYRHVVRMPDGSLLNRYWDCRDTPRDES W L E	
TreA	MQKEYAYWMDGVENIQAGQQEKRVVKLQDGTLLNRYWDCRDTPRPES W E	
	. . ***** * . . * . . . * . . . * . . . * . . . ***** * . . . *	
TreF	DVETAK-HSGRPFNEVYRDLRAGAASGWYSSRWLRDTGRLASIRTTQFTI	
TreA	DIATAKSNFNRPATEIYRDLRSAAASGWDFSSRWENPQQNLRTTSTIV	
	* . . *** . . * . . * . . ***** * . . . * . . . * . . . * . . . *	
TreF	PIDLNAFLFKLESAIANI S A L K G E K E T E A L F R Q K A S A R R D A V N R Y L W D D E	
TreA	FVDLNSLMFKMEKILARASKAAGDNAMANOYETLANARQKGIKYLWNDQ	
	* . . ***** * . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
TreF	NGIYRDYDWRREQL-ALFSAAATVPLYWGMANHEQADRLANAVRSRLITP	
TreA	QGWAYDYDLKSHKVRNQLTAAALFPLYVNAAKDRANKMATAIKIHLLQP	
	* . . * . . * ***** * . . . * . . . * . . . * . . . *	
		QNDXGWR
TreF	GGILASEYETGEQWDFNGWAPLQWMAIQGFMYGDDLLGDELARSWLKT	
TreA	GGLNITSVKSGQWDAFNGWAPLQWVATEGLQNYGQKEVAMDISWHFLIN	
	** * . . . ***** * . . . * . . . * . . . * . . . *	
TreF	VNQFYLEQHKLIEKYHIADGVPREGGGGEYPLQDGFGWINGVVRRLIGLY	
TreA	VQHYDREKKLVEKYDVSTTGT-GGGGGEYPLQDGFGWINGVILKMLDLI	
	* . . * . . * . . . * . . . * . . . ***** * . . . * . . . * . . . *	
TreF	-----GEP	
TreA	CPKEQPCINVPATRPVKSATTQPSTKEAQTTP	
		*

Abb. 5.6.: Sequenzvergleich von TreA und TreF:

Die Aminosäuresequenzen von TreF (oben) und TreA (unten) wurden mit dem Programm Clustal V analysiert. Die Sterne kennzeichnen die identischen, die Punkte die konservativ ausgetauschten Aminosäuren. Oberhalb der Sequenzen sind die beiden in Glykosyl-Hydrolasen konservierten Konsensusmotive (Henrissat und Bairoch, 1993) angegeben. Die Schnittstelle für die Signalpeptidase und damit der N-Terminus des reifen TreA ist mit LEP (für Leaderpeptidase) gekennzeichnet. Des Weiteren sind die N-Termini der bei der limitierten Proteolyse analysierten Fragmente mit Thermolysin (TL) und Proteinase K (ProtK) angegeben (Vergl. Kapitel 5.1.3.6.).

TreF besteht aus 549 Aminosäuren. TreA wird als Vorläuferprotein mit 565 Aminosäuren synthetisiert und ist nach der Prozessierung der Signalsequenz 535 Aminosäuren lang. Über einen zentralen Bereich^{*)} von 478 (TreA) und 477 (TreF) Aminosäuren sind die Trehalasen zu 48,9 % identisch und zu 75 % konserviert. Im Gegensatz zu der homologen 'Kernregion' unterscheiden sich die Enden der Trehalase-Sequenzen stark. Am C-Terminus verfügt TreA im Vergleich zu TreF über 30 zusätzliche Aminosäuren. TreF besitzt dafür am N-Terminus einen 61 Aminosäuren langen Bereich, der in reifem TreA nicht vorkommt. Dieser Bereich ist - wie später gezeigt wird (Vergl. Kapitel 5.1.3.4. und 5.1.3.5.) - für Proteasen leicht zugänglich und für die Aktivität von TreF *in vitro* nicht essentiell.

5.1.3.2. Sekundärstrukturanalysen von Trehalasen

Um die Sekundärstruktur von Trehalasen vorherzusagen, wurde das Programm PHD^{*)} (Rost et al., 1994; Rost und Sander, 1994b) angewandt. Abb. 5.7. zeigt die vorausgesagte Sekundärstruktur der beiden *E. coli* Trehalasen zusammen mit einer Abschätzung der Richtigkeit der Angaben sowie die eine Vorhersage der Zugänglichkeit der einzelnen Aminosäuren für Lösungsmittel.

Abb. 5.7.: Vorhersage von Sekundärstruktur und Lösungsmittelzugänglichkeit für Trehalasen

Abb. 5.7. zeigt die Sekundärstrukturen so, wie sie durch das Programm PHD^{**)} durch 'multiples Alignment' aller bekannten Trehalase-Sequenzen vorausgesagt wurden. In der oberen Zeile sind jeweils identische (Stern) und konservativ ausgetauschte (Punkt) Aminosäuren markiert. Unter den Aminosäuresequenzen von TreF (AA/F, Zeile 2) und TreA (AA/A, Zeile 5) sind jeweils die vorausgesagten Sekundärstrukturen (PHD sec) angegeben (Zeilen 3 und 6). Dabei steht 'H' für α -Helix und 'E' für β -Strang. Die Zahlen unterhalb der jeweiligen Sekundärstruktur (rel sec) beurteilen die Wahrscheinlichkeit, daß die Vorhersage zutrifft. Je höher die Zahl ist, desto sicherer ist die Angabe. In der unteren mit 'SUB acc' gekennzeichneten Zeile ist vorhergesagt, ob der jeweilige Sequenzabschnitt in der 3D-Struktur für Lösungsmittel zugänglich ist. Das 'e' steht für Lösungsmittel-exponiert, das 'b' für Lösungsmittel-unzugänglich. Die Bestimmtheit der Vorhersagen für die Lösungsmittel-Zugänglichkeit ist im allgemeinen geringer als die für die Vorhersagen der Sekundärstruktur (Rost und Sander, 1994a).

^{*)} Dieser Bereich beginnt bei Aminosäure 61 von TreF und Aminosäure 17 von reifem TreA.

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


```

* * ***** ***** ..* ..** ..
AA/F      AWMIENYGHIPNGNRYLRSRSQPFVFMVLF-EEDGVRGARRYLIHL
PHD sec   HHHHHH      EEEEE  HHHHHHHH-HH HHHHHHHHH
Rel sec   999999378789871698826983899999999-96452699999999
AA/A      AHEIDTYGHIPNGNRSYLSRSQPPFFALMVELLAQHEGDAALKQYLPQM
PHD sec   HHHHHH      EEEEE  HHHHHHHHHH  HHHHHHHH
Rel sec   9999983466788625888148738999999999854972179999999
SUB acc   b.bb...b.b.....b.....bbbbbb.bb-.eee.e.b.e.be.b

```

8

```

.***.***.*.*.*..**..**.....**.*.*
AA/F      KMEYAFWMDGAESLIPNQAYRHVVRMPDGSLLNRYWDDRDTPRDESLED
PHD sec   HHHHHHHHHHHHHH      EEEEE  E      HH
Rel sec   99999999998999713566514774983410013468999994454267
AA/A      QKEYAYWMDGVENLQAGQEKRWVKLQDGTLLNRYWDDRDTPRPESWED
PHD sec   HHHHHHHHHHHHHH      EEEE      HH
Rel sec   99999999979987333788526735983432213479999997654115
SUB acc   ee.b.bb.e.e.....ee...b.e.ee...b.....eeee..e.....

```

1

```

.***..**.*.*****.....**.*..**.*
AA/F      VETAK-HSGRPPNEVYRDLRAGAASGWYSSRWLRDTGRLASIRITQFIP
PHD sec   HHHH-H      HHHHHHHHHH      EE
Rel sec   88984-16897689999999976258621221121597644158735433
AA/A      IATAKSNFNRPATETIYRDLRSAAAAGWDFSSRWMDNPQQLNITLRTSIVP
PHD sec   HHHH      HHHHHHHHHH      HHHH
Rel sec   653214899999269999999744326643223455743335426777524
SUB acc   .e.be-e.eee.e.b...b...b.b...bb...b.eee.b.....e.bb

```

10

```

.***..**.*.*.*..**.*..**.*..**.*
AA/F      IDLNAFLFKLESATANI SALKGEKETEALFRQKASARRDAVNRYLWDDEN
PHD sec   HHHHHHHHHHHHHHHH      HHHHHHHHHHHHHHHH
Rel sec   65179999999999999994698456889999999999999831367
AA/A      VILNSLMPKMEKILARASKAAGINAMANQYETLANARQKGIKYLWNDQQ
PHD sec   HHHHHHHHHHHHHHHH      HHHHHHHHHHHHHHHH
Rel sec   661899999999999999948985169899999999999998712368
SUB acc   b.hhhhhbb.e...eb....eeee.....ee..e...e.be.....e.e

```

```

* * *** ..**.*..**.*..**.*..**.*
AA/F      GIYRDYDWRREQ-L-ALFSAAAI VPLYVGMANHEQADRLANAVRSLLTGP
PHD sec   - E      HHHHH      HHHHHHHHHHHHHH
Rel sec   6411357322212-231012321344223443468988899999992479
AA/A      GWYADYDLKSHKVRNQLTAAALFLYVNAAKTRANKMATATKIHLLQPG
PHD sec   EE      E      HHHHH      HHHHHHHHHHHHHH
Rel sec   6210157321344321113311144422121799999999999881479
SUB acc   .....eeee-e.b...b.hbb....eee.see.be...e.b...e

```


5.1.3.3. TreF liegt als Monomer vor

Das Laufverhalten von gereinigtem TreA aus *Saccharomyces cerevisiae* in nativen und denaturierenden Gelen läßt darauf schließen, daß diese Trehalase als Homodimer vorliegt (App und Holzer, 1989). An anderen Trehalasen konnte keine Dimerbildung beobachtet werden.

Durch ein Gelfiltrationsexperiment konnte gezeigt werden, daß aktives TreF als Monomer vorliegt. Dabei wurden in aufeinanderfolgenden Säulenläufen je 200 µg der Eichproteine bzw. TreF auf eine Superose 12 HR10/30-Säule aufgetragen und mittels des UV-Detektors bestimmt, nach welchen Volumina die einzelnen Proteine eluieren. Für TreF wurde das durch die Absorption bei 280 nm ermittelte Elutionsvolumen zusätzlich durch Trehalase-Tests bestätigt. Es betrug 20,2 ml. Die Elutionsvolumina für die Standardproteine Bovine Katalase (240 kDa), β -Amylase (200 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), Serum Albumin (67 kDa) und Egg Albumin (45 kDa) lagen bei 16,0 ml, 17,3 ml, 18,8 ml, 20,0 ml und 21,0 ml.

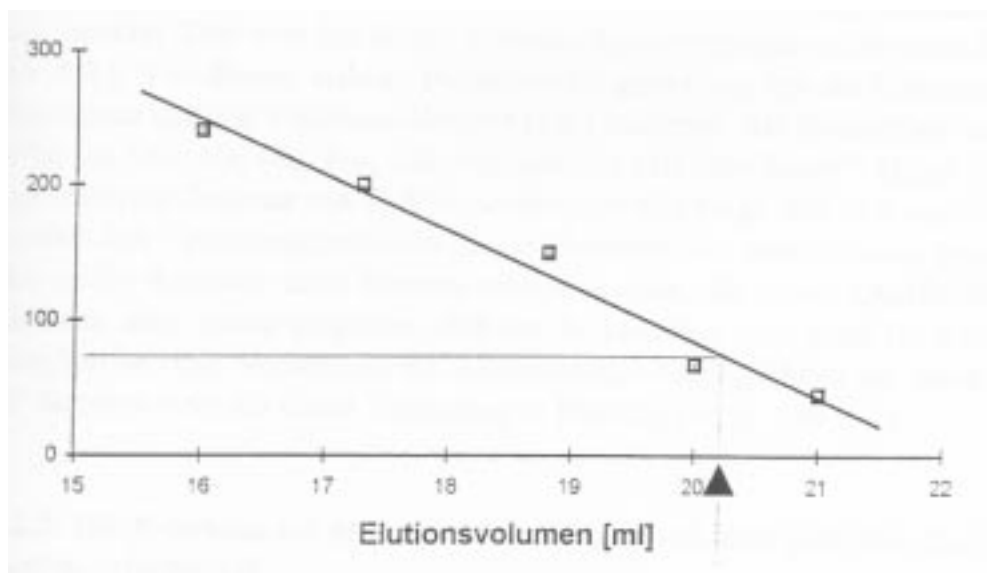


Abb. 5.8.: Molekulargewichtsbestimmung von TreF

Die Größen der Standardproteine sind in kDa gegen die dazugehörigen Elutionsvolumina in ml aufgetragen. Aus den Werten wurde die Eichgerade errechnet und zur Molekulargewichtsbestimmung von TreF herangezogen.

Das Elutionsvolumen von TreF ist mit einem Pfeil markiert.

Anhand der aus den Standardproteinen und ihren Elutionsvolumina aufgestellten Eichgerade wurde für TreF ein Molekulargewicht von ca. 74 kDa bestimmt. Aus einem Vergleich mit dem errechneten Molekulargewicht von 63,703 kDa konnte gefolgert werden, daß es sich bei TreF um ein Monomer handelt.

Da in der Gelfiltration mit TreF abgesehen von den Protein- und Aktivität-enthaltenden Fraktionen um 20,2 ml keine weiteren Fraktionen mit Proteingehalt bzw. Trehalase-Aktivität detektiert wurden, kann man davon ausgehen, daß TreF keine multimeren Formen ausbildet.

5.1.3.4. Der N-Terminus von TreF ist Proteasen frei zugänglich

Um wesentliche Strukturmerkmale der zytoplasmatischen Trehalase zu erfassen, wurden an gereinigtem TreF limitierte Proteolysen durchgeführt. Dazu wurden je 15 µg TreF mit verschiedenen Konzentrationen der Proteasen Trypsin, Papain, Proteinase K und Thermolysin in geeignetem Puffer (Vergl. Kapitel 4.4.10.) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proteolyse-Reaktionen wurden gestoppt, gekocht und mittels SDS-PAGE und Comassie-Färbung analysiert. Für die Proteasen Trypsin, Papain und Proteinase K deckte der Konzentrationsbereich von 1 ng Protease pro ml bis 20 µg Protease pro ml das Spektrum zwischen keiner erkennbaren und vollständiger Proteolyse ab. Bei Thermolysin waren bei den angegebenen Bedingungen für die vollständige Proteolyse von TreF Protease-Konzentrationen von über 2 mg/ml erforderlich.

Bei allen Proteasen trat bei geringen Protease-Konzentrationen ein um ca. 5 kDa verkürztes Proteolyseprodukt auf. Diese verkürzten Proteolyse-Produkte sind beispielhaft in Abb. 5.9.A und B dargestellt. Bei der Proteolyse mit Thermolysin war das um ca. 5 kDa verkürzte Protein bei Konzentrationen von bis zu 0,54 mg Thermolysin pro ml stabil. Intaktes TreF war bei diesen Protease-Konzentrationen nicht mehr nachweisbar (Abb. 5.9.). Von diesem stabilen Proteolyse-Fragment wurden die N-terminale Aminosäuresequenz und die Trehalase-Aktivität (s.u.) bestimmt. Als N-terminale Aminosäuren wurden Ile, Glu, Ala, Glu, Pro, Glu, Pro, Glu und Met identifiziert^{*)}. Diese Aminosäuren entsprechen der Sequenz von TreF ab Aminosäure 45 (Vergl. Abb. 5.6. und 5.7.).

Da neben den Verbindungsregionen zweier Domänen von einer Protease gewöhnlich als erstes solche Regionen eines Proteins erkannt werden, die an der Oberfläche exponiert sind, kann man davon ausgehen, daß der N-Terminus von TreF für Proteasen frei zugänglich ist. Die Vorhersage der Lösungsmittel-Zugänglichkeit an dieser Stelle der TreF-Sequenz steht mit dieser Vermutung in Einklang (vergl. Abb.5.7.).

5.1.3.5. Die N-terminalen 45 Aminosäuren von TreF sind nicht für die Trehalase-Aktivität erforderlich

Um zu untersuchen, ob der N-Terminus einen Einfluß auf die Aktivität der Trehalase hat, wurden die Enzymaktivitäten von nativem und verkürztem TreF verglichen. TreF, welches für 2 Stunden bei 37°C mit 0,54 mg Thermolysin pro ml proteolysiert und danach mit EDTA versetzt worden war, war um ca. ein Viertel weniger aktiv als intaktes TreF, welches im gleichen Puffer ohne Protease inkubiert worden war. Für intaktes TreF wurde eine Aktivität von 48 Units pro mg TreF bestimmt. Wie Abb. 5.9. zeigt, kann die geringere Trehalase-Aktivität des Proteolyse-Ansatzes im Gegensatz zu der des nativen TreF durch einen teilweisen Abbau des Proteins erklärt werden. Die TreF-Aktivität scheint durch das Fehlen der 45 N-terminalen Aminosäuren nicht wesentlich beeinträchtigt zu sein.

^{*)} Die Aminosäure-Sequenzierung wurde von Herrn L. Cobianchi (Fakultät für Biologie, Universität Konstanz) durchgeführt.

In einer nativen PAGE lief das proteolytierte TreF als verkürztes Fragment. Der proteolytierte N-Terminus interagiert also nicht mit dem verbleibenden TreF-Fragment und konnte somit auch nicht zur Aktivität des Enzyms beitragen. Dies war auch zu erwarten, da das Proteolyse-Produkt bei unterschiedlichen steigenden Thermolysin-Konzentrationen nicht sprunghaft, sondern stufenweise um kleinere Fragmente verkürzt wurde (Daten nicht gezeigt).

5.1.3.6. Durch limitierte Proteolyse an gereinigtem TreF läßt sich keine Domänenstruktur ermitteln

Proteine, die aus mehreren Domänen bestehen, zeichnen sich dadurch aus, daß die die Domänen verbindenden Regionen durch mehrere verschiedene Proteasen schon in relativ geringen Konzentrationen gespalten werden. In der limitierten Proteolyse sollten in dem Fall bei verschiedenen Proteasen deutliche Proteolyse-Produkte immer wieder zu finden sein. Bis auf die oben beschriebenen, N-terminal um ca. 5 kDa verkürzten Fragmente traten in der limitierten Proteolyse auch bei höheren Protease-Konzentrationen keine bestimmten Proteolyse-Produkte auf. Vielmehr wurden auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel vielzählige Proteolyse-Produkte sichtbar, die von Protease zu Protease verschieden waren.

Um Stellen zu identifizieren, die an der Oberfläche liegen, wurden auch solche Proteolyse-Produkte untersucht, die durch das Einwirken geringer Protease-Konzentrationen entstanden sind, jedoch nicht bei mehreren Proteasen gleichzeitig auftraten. In Abb. 5.9.B sind die Proteolyse-Produkte dargestellt, die durch geringe Konzentrationen an Proteinase K entstanden sind.

Für die obere gekennzeichnete Bande in Abb. 5.9.B wurden die Aminosäuren Glu, Tyr, Val, Ser, Asp, Pro, Gln, Asp und Ser als N-terminale Aminosäuren identifiziert^{*)}. Diese Sequenz stimmt mit der TreF-Sequenz ab Aminosäure 123 überein. Durch die Proteinase K wurden also die 122 N-terminalen Aminosäuren abgespalten.

Bei der Sequenzierung der unteren gekennzeichneten Bande wurden jeweils zwei Aminosäuren für eine Position identifiziert, die in nur leicht unterschiedlichen Mengen vorlagen. Diese Aminosäuren waren Glu und Met, Tyr und Leu, Val und Asp, Ser und Gln, Asp und Lys sowie Pro und Ile. Die untere Bande scheint sich also aus zwei Fragmenten zusammensetzen, von denen das eine mit dem N-Terminus des intakten TreF und das andere - genau wie das obere analysierte Fragment - mit Aminosäure 123 von TreF beginnt. Die Größendifferenzen könnten durch die Abspaltung C-terminaler Proteinfragmente erklärt werden.

Möglicherweise ist der Bereich um Aminosäure 122 im nativen TreF an der Oberfläche lokalisiert. Diese Vermutung wird durch die Vorhersage der Lösungsmittel-Zugänglichkeit durch das PHD-Programm gestützt, die für diesen Sequenzbereich eine exponierte Lage ermittelte (vergl. Abb. 5.7.).

^{*)} Diese Aminosäure-Sequenzierung wurde ebenfalls von Herrn L. Cobianchi (Fakultät für Biologie, Universität Konstanz) durchgeführt.

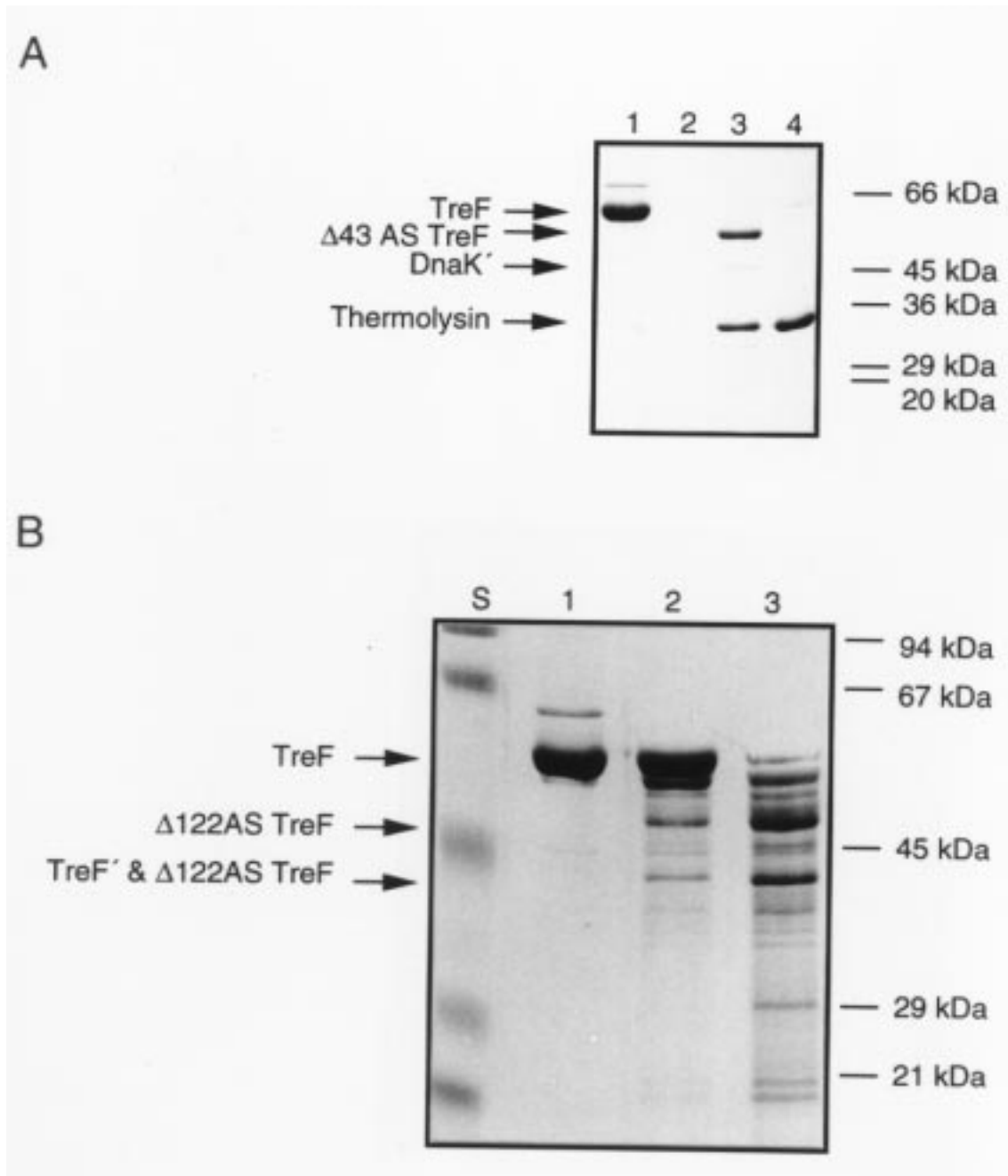


Abb. 5.9.: Limitierte Proteolyse von TreF

A: Proteolyse mit Thermolysin

B: Proteolyse mit Proteinase K

Abb. 5.9.: Limitierte Proteolyse an TreF

Um die Proteolyse-Hauptprodukte zu analysieren, wurden je 75 µg der gereinigten zytosolischen Trehalase mit ausgewählten Konzentrationen an Thermolysin (A) bzw. Proteinase K (B) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Protease-Reaktion durch Zugabe der jeweiligen Stopplösung beendet. Ein Fünftel des Ansatzes wurde jeweils zur Überprüfung der Proteolyse auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Reaktionsprodukte durch Comassie-Färbung sichtbar gemacht. Der verbleibende Proteolyse-Ansatz wurde ebenfalls auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Proteolyse-Fragmente wurden dann auf eine PVDF-Membran übertragen, angefärbt und die dominierenden Banden zur Bestimmung der N-terminalen Sequenz ausgeschnitten.

A) Proteolyse mit Thermolysin: Die aufgetragenen Proben sind von rechts nach links: **1**: Molekulargewichts-Standard (von oben nach unten: 66, 45, 36, 29, 20 kDa), **2**: 15µg gereinigtes TreF, **3**: Proteolyse-Ansatz mit TreF und Thermolysin (0,54 mg/ml), **4**: reines Thermolysin (0,54 mg/ml). TreF, durch Proteolyse verkürztes TreF sowie Thermolysin sind durch Pfeile gekennzeichnet. Ein Proteolyse-Fragment des Chaperons DnaK ist ebenfalls gekennzeichnet. Seine Identität wurde durch N-terminale Sequenzierung und im Western Blot mit gegen DnaK gerichteten Antikörpern festgestellt (Daten nicht gezeigt).

B) Proteolyse mit Proteinase K: Folgende Proben wurden aufgetragen: **1**: Molekulargewichts-Standard (von oben nach unten: 94, 67, 45, 29 und 21 kDa), **2**: gereinigtes TreF (15 µg), **3**: Proteolyse-Ansatz mit 15 µg TreF und Proteinase K (0,016 µg/ml), **4**: Proteolyse-Ansatz mit TreF und Proteinase K (0,08 µg/ml). Intaktes TreF sowie die beiden für die Bestimmung der N-Terminus herangezogenen Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

5.1.3.7. Unter geeigneten Bedingungen kann TreF zu 74,2 % renaturiert werden

In *in vitro*-Rückfaltungsexperimenten mit gereinigtem TreF konnte sich die zytosolische Trehalase spontan vom denaturierten zum nativen Zustand zurückfalten. Durch 100-fache Verdünnung erlangte denaturiertes TreF beinahe 75 % seiner ursprünglichen Aktivität wieder (Tabelle 5.4.). Eine effiziente Rückfaltung von TreF fand jedoch nur dann statt, wenn die Renaturierung bei geringen Proteinkonzentrationen (0,15 µg TreF pro ml Renaturierungsansatz) durchgeführt und die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken durch die Zugabe reduzierender Substanzen unterbunden wurde. Andernfalls trat Aggregation auf (s.u.).

Tabelle 5.4.: Renaturierung von TreF

Renaturierungsbedingungen ^{c)}	Denaturierungsbedingungen ^{b)}		
	nativ	GdnHCl (7 M)	Harnstoff (7,5 M)
Kaliumphosphat, 2 min	100	16,7 ^{a)}	0
Kaliumphosphat, 1 mM DTT, 2 min	100	73,2	73,2
Kaliumphosphat, 1 mM DTT, 30 min	100	74,2	74,2

Tabelle 5.4. zeigt die Trehalase-Aktivitäten der einzelnen Renaturierungsansätze.

a) Die Aktivitäten sind in Prozent angegeben und beziehen sich auf die Aktivität nativer zytoplasmatischer Trehalase. Die Trehalase-Aktivitäten wurden bestimmt, indem jeweils 200 μ l Renaturierungsansatz mit 100 μ l 200 mM Trehalose für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zum Abstoppen der Reaktion für 10 min bei 100°C gekocht wurden. Der vollständige Reaktionsansatz wurde zum Glukose-Nachweis eingesetzt. Da DTT in den eingesetzten Mengen den Glukose-Peroxidase-Test stört, wurde freies DTT durch einstündige Inkubation mit 10 mM Jodacetamid alkyliert, bevor die Menge an freigesetzter Glukose ermittelt wurde. Der Glukose-Peroxidase-Test wurde durch die Jodacetamid-Behandlung nicht beeinträchtigt.

b) Denaturierung von TreF: TreF wurde in einer Konzentration von 15 μ g/ml über Nacht auf Eis in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0, 10 mM Dithiothreitol (DTT) inkubiert, der als Denaturierungsmittel 7 M Guanidin Hydrochlorid (GdnHCl) bzw. 7,5 M Harnstoff enthielt. Die Denaturierung von TreF konnte nicht direkt nachgewiesen werden, da die Bestimmung der Trehalase-Aktivität aufgrund der hohen Osmolarität nicht möglich war. Die geringen bzw. fehlenden Trehalase-Aktivitäten bei der Renaturierung in nicht-reduzierenden Bedingungen lassen jedoch auf eine Inaktivierung der Trehalase durch die Denaturierungsmittel schließen.

c) Renaturierung von TreF: Die Renaturierung von TreF erfolgte durch 1:100 Verdünnung des Denaturierungsansatzes in die angegebenen Renaturierungslösungen auf Eis. TreF lag dann im Renaturierungsansatz in einer Konzentration von 0,15 μ g/ml vor. Die Bestimmung der Trehalase-Aktivität wurde 2 bzw. 30 min nach der Verdünnung durch Zugabe von Trehalose gestartet. Sie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Da die Renaturierung während des Trehalase-Tests möglicherweise weiterhin ablief, konnten Renaturierungsraten von unter 5 min nicht ermittelt werden. Die Inkubationszeiten beim Trehalase-Test konnten nicht verkürzt werden, da die aufgrund der geringen Enzymkonzentrationen niedrigen Mengen an freigesetzter Glukose bereits dicht an der Nachweisgrenze lagen.

Denaturiertes TreF konnte bei geeigneten Bedingungen bis zu 74,2 % der ursprünglichen Aktivität wiedererlangen und damit sehr effizient zurückgefaltet werden. Die Rückfaltung war innerhalb der ersten 7 min abgeschlossen. Ab diesem Zeitpunkt konnte keine weitere Aktivitätszunahme beobachtet werden. Eine höhere Zeitauflösung war mit dieser Methode aufgrund der Sensitivität des Glukose-Peroxidase-Tests einerseits und der nur niedrigen tolerierten TreF-Konzentration von 0,15 μ g pro ml andererseits (s.u.) nicht möglich.

Bei Verdünnung des denaturierten TreF konnten im Tryptophan-Floureszenz-Spektrometer selbst bei Verwendung des Anregungsmaximums von TreF mit 286,1 nm bei dem Emissionsmaximum von TreF mit 335,3 nm keine Emissionsänderungen festgestellt werden. Entweder waren die eingesetzten Proteinkonzentrationen zu gering, um eine Emissionsänderung hervorzurufen, oder die Rückfaltung erfolgte so schnell, daß sie zeitlich nicht von der Emmissionsstörung durch Zugabe und Durchmischung unterschieden werden konnte.

Wurde die TreF-Konzentration auf 1 μ g pro ml, eine Konzentration, die in Rückfaltungs-Experimenten mit anderen Proteinen durchaus toleriert wird (z.B. Cleland et al., 1992; Mendoza et al., 1991a), erhöht, konnten nur noch maximal 20 % der ursprünglichen Aktivität wiedererlangt werden. Durch Zentrifugation der Rückfaltungsansätze und anschließende Analyse von Sediment und Überstand auf einem Polyacrylamid-Gel konnte gezeigt werden, daß unter diesen Bedingungen in starkem Ausmaß Aggregation stattfand (Daten nicht gezeigt).

Um die Aggregation zu verhindern und damit die Rückfaltungseffizienz bei erhöhten TreF-Konzentrationen zu steigern, wurde die Renaturierung unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, die von den angegebenen Autoren als günstig beschrieben worden waren. Dazu gehörten 100 und 500 mM Kaliumchlorid, 10 und 20 % Glycerin, 0,5 M Ammoniumsulfat (Madea et al., 1991), 1 M Guanidin Hydrochlorid (Cleland und Wang, 1990), 1 M Harnstoff (Mendoza et al., 1991) sowie 0,2 mM Polyethylenglycol (PEG 3350) (Cleland et al., 1992). Die Aggregation konnte durch diese Bedingungen jedoch nicht vermindert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Aggregation hätte möglicherweise durch die Zugabe molekularer Chaperone verhindert werden können, wie es z.B. für die *in vitro*-Rückfaltung von Citratsynthase (Buchner et al., 1991) und Rhodanese (Mendoza et al., 1991b) durch GroEL bzw. Hsp60 sowie für Hitze-inaktivierte RNA-Polymerase durch DnaK (Skowyra et al., 1990) beschrieben wurde.

Aufgrund der Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung und des TreF-Antiserums, welches auch DnaK-Affinität aufweist, ist anzunehmen, daß in dem gereinigten Protein auch Spuren an DnaK vorliegen. Da zur effektiven Chaperon-Aktivität jedoch ATP benötigt wird (vergl. Kapitel 3.4.2.1.) und durch die Zugabe von 2 mM ATP zum Renaturierungsansatz die Faltungseffizienz nicht erhöht wurde (Daten nicht gezeigt), kann man davon ausgehen, daß die Rückfaltung in diesen Experimenten unabhängig von DnaK stattfand.

5.2. Vergleich der Translokations- und Faltungseigenschaften von TreA und TreF *in vivo*

5.2.1. Untersuchungen an Vorläufer-TreF

5.2.1.1. TreF ist translokationskompetent, wenn es als Vorläuferprotein synthetisiert wird

Ein wesentlicher Unterschied der beiden Trehalasen TreA und TreF von *E. coli* besteht in ihrer Lokalisation.

Um zu testen, ob TreF als zytoplasmatisches Protein ins Periplasma transloziert und dort aktiv exprimiert werden kann, wurde psstreF konstruiert. Dieses Plasmid codiert für ein TreF-Derivat, in dem TreF hinter die Signalsequenz und die ersten beiden Aminosäuren (2 x Glu) von TreA fusioniert ist.

Wie Abb. 5.13. zeigt, bewirkte das Plasmid in KU101 die Expression einer sehr geringen Menge an TreF. Da dieses TreF im SDS-PAGE auf gleicher Höhe lief wie Wildtyp-TreF (Vergl. Abb. 5.13.), kann man davon ausgehen, daß die Signalsequenz während der Translokation abgespalten wurde.

5.2.1.2. Als Vorläuferprotein synthetisiertes TreF wird im *degP* Stamm stabilisiert

In der *degP*-Nullmutante KU104psstreF, einem Stamm, der nicht über die periplasmatische Protease DegP verfügt, wurde eine deutlich größere Menge an TreF exprimiert als in dem sonst isogenen *degP* Wildtypstamm KU101psstreF (vergl. Abb. 5.13.). Die Stabilisierung von TreF durch das Ausschalten der periplasmatischen Protease DegP (Lipinska et al., 1990) zeigt, daß TreF ins Periplasma transloziert wird, wenn es mit Signalsequenz synthetisiert wird. Die Verkürzung um die Länge der Signalsequenz (Abb. 5.13.) ist demnach nicht das Ergebnis zytoplasmatischer Degradation, sondern beruht auf der Prozessierung durch die Signalpeptidase.

Natives TreF ist gegenüber periplasmatischen Proteasen unempfindlich, denn die Trehalase-Aktivität von KU101pBADtreF, einem Stamm, der gut nachweisbare Mengen an TreF enthält, war im Ganzzellextrakt bei Raumtemperatur über mehrere Stunden konstant (Daten nicht gezeigt). Folgt man daraus, daß korrekt gefaltetes TreF kein Substrat für DegP ist, dann gibt die Degradation von TreF im Periplasma einen Hinweis darauf, daß in diesem Kompartiment Schwierigkeiten bei der Faltung der zytoplasmatischen Trehalase auftreten.

Das Ausschalten weiterer Zellhüllproteasen, wie OmpT (Sugimura et al., 1988) und Protease III (Ptr) (Finch et al., 1986) in KU97, sowie HhoA und HhoB (Bass et al., 1996) in KU102, hatte keine sichtbare Auswirkung auf die Expression von TreF im Periplasma (Daten nicht gezeigt).

5.2.1.3. TreF weist im Periplasma nur sehr geringe Aktivität auf

Die Trehalase-Aktivitäten der *treA::Spec^R*, Δ *treRBC*-Stämme KU101psstreF und KU104psstreF waren im Vergleich mit den Aktivitäten von KU101pTre11 und KU104pTre11 sehr gering (Tabelle 5.5.)^{*)}. Transloziertes TreF liegt also im Periplasma nur zu einem geringen Teil als funktionelles Enzym vor, oder es hat dort nur eine geringe spezifische Aktivität.

Tabelle 5.5.: Trehalase-Aktivität von TreF und TreA'-TreF im Periplasma

	Aktivität ^{a)}		
	KU101 (<i>wt</i>) ganze Zellen	KU104 (<i>degP</i>) ganze Zellen	KU101 (<i>wt</i>) Ganzzellextrakt
psstreF	0,06 +/- 0,03	0,12 +/- 0,05	0,07 +/- 0,01
pTre11	3,91 +/- 1,33	3,96 +/- 1,09	2,46 +/- 0,19
ptreA'-treF	0,02 +/- 0,01	0,09 +/- 0,01	0,03 +/- 0,01
ohne Plasmid	0,004	0,007	0,016

Tabelle 5.5. zeigt die Trehalase-Aktivitäten, die die Plasmide psstreF, ptreA'-treF (s.u.) und pTre11 in KU101 (*treA::Spec^R*, Δ *treRBC*) bzw. KU104 (*treA::Spec^R*, Δ *treRBC*, *degP::Tet^R*) auslösen.

^{a)}Die Aktivitäten sind in Units pro mg Ganzzellprotein angegeben. Die Werte wurden aus den Ergebnissen von bei Extrakten zwei und bei ganzen Zellen mindestens fünf voneinander unabhängigen Messungen gemittelt. Sie sind mit ihren Standardabweichungen gezeigt.

Die Aktivitätstests von ganzen Zellen wurden an 28°C LBamp-Übernachtskulturen durchgeführt. Für die Bestimmung der Trehalase-Aktivität von Ganzzellextrakten wurden entsprechende Kulturen mit Hilfe der French Pressure Zelle aufgeschlossen.

Die Trehalase-Aktivitäten von TreF im Periplasma waren mit 0,057 Units pro mg Ganzzellprotein sehr niedrig. Sie lagen nur geringfügig über den Hintergrund-Aktivitäten der jeweiligen Stämme, die lediglich über die chromosomale *treF*-Kopie, nicht aber über ein Trehalase-codierendes Plasmid verfügten. Die Trehalase-Aktivität in KU101psstreF war bei gleichem Vektor und gleichem Promotor der Trehalase ca. 70 mal niedriger als die von KU101pTre11. Die Trehalase-Aktivität von prozessiertem TreF ist auch dann noch vergleichsweise gering, wenn man die schwache Trehalase-Expression aus der Western Blot Analyse berücksichtigt. Ein genauer quantitativer Vergleich der spezifischen Trehalase-Aktivitäten ist jedoch wegen der unterschiedlichen Affinitäten der Trehalase-Antisera zu ihren jeweiligen Antigenen nicht möglich.

Die niedrige Trehalase-Aktivität von KU101psstreF wurde durch das langsame Wachstum dieses Stammes auf Minimalmedium mit Trehalose als einziger Kohlenstoffquelle bestätigt. Während KU101pTre11 bei 28°C schon nach einem Tag deutliche Einzelkolonien ausbildete, brauchte KU101psstreF 2-3 Tage, bis die Kolonien eine entsprechende Größe erreicht hatten.

^{*)} pTre11 codiert für TreA unter eigenem Promotor.

In dem *degP*⁻ Stamm KU104psstreF war die Trehalase-Aktivität gegenüber dem *degP* Wildtypstamm KU101psstreF verdoppelt. Obwohl die Ausschaltung von *degP* eine deutliche Stabilisierung von prozessiertem TreF bewirkte, trug sie nur wenig zur Erhöhung der Trehalase-Aktivität bei.

Die Trehalase-Aktivität von KU101psstreF änderte sich nicht signifikant, wenn sie an ganzen Zellen an aufgeschlossenen Zellen bestimmt wurde. Es verblieb demnach keine translokationsinkompetente Trehalase im Zytoplasma, denn diese sollte sich dort zu einem funktionellen Enzym falten und zu einer erhöhten Trehalase-Aktivität beitragen. Die Trehalase befand sich also restlos im Periplasma.

Im Zellextrakt liegt die prozessierte Trehalase in einem Milieu vor, in dem die Aktivität von gereinigter zytoplasmatischer Trehalase mit 148 Units pro mg TreF in Extrakt (0,2 mg/ml Zellprotein in 20 mM Kaliumphosphat, pH 6,0) gegenüber 148 Units pro mg TreF in BSA (0,2 mg/ml BSA in 20 mM Kaliumphosphat, pH 6,0) keine Beeinträchtigung erfuhr^{*)}. Die geringe enzymatische Aktivität läßt sich also nicht durch die Reaktionsbedingungen im Periplasma begründen. Vielmehr deuten die Aktivitätsbestimmungen, ebenso wie die Degradation von prozessiertem TreF im *degP* Wildtyp-Stamm, darauf hin, daß TreF im Periplasma falsch gefaltet vorliegt. Das periplasmatische Milieu scheint eher den Vorgang der Faltung der zytoplasmatischen Trehalase als die Aktivität des nativen Enzyms zu beeinträchtigen.

5.2.1.4. Prozessiertes TreF ist im Periplasma aggregiert

Kalte osmotische Schocks von KU104psstreF und eine sich anschließende Analyse der Überstand- (Ü, periplasmatische Proteine) und Sedimentfraktionen (S, Zytoplasma- und Membranproteine) im Western Blot zeigten, daß prozessiertes TreF nicht als lösliches periplasmatisches Protein freigesetzt werden kann. Das gesamte im Western Blot detektierbare TreF lag in der Sedimentfraktion vor (siehe Abb. 5.10.). Dieses Ergebnis läßt zwei verschiedene Interpretationen zu. Einerseits könnte das TreF zytoplasmatisch oder Membran-assoziiert vorliegen, andererseits könnte falsch gefaltetes TreF im Periplasma ein unlösliches Aggregat ausbilden, welches zusammen mit der Zytoplasma- und Membranfraktion sedimentiert.

Die oben beschriebenen Aktivitätstests und Expressionsstudien favorisieren letztere Erklärungsmöglichkeit.

^{*)} Die Aktivität von TreF in Proteinlösung war gegenüber der in Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 6,0) mit 60 Units pro mg TreF erhöht. Eine Erhöhung der Enzymaktivität in Anwesenheit von BSA wurde auch für Aspartat-Amino-Transferasen beschrieben (Mattingly et al., 1995). Die Autoren führen diese auf eine Absättigung unspezifischer Bindestellen im Reaktionsgefäß durch BSA zurück. Diese Erklärung könnte auch für TreF zutreffen.

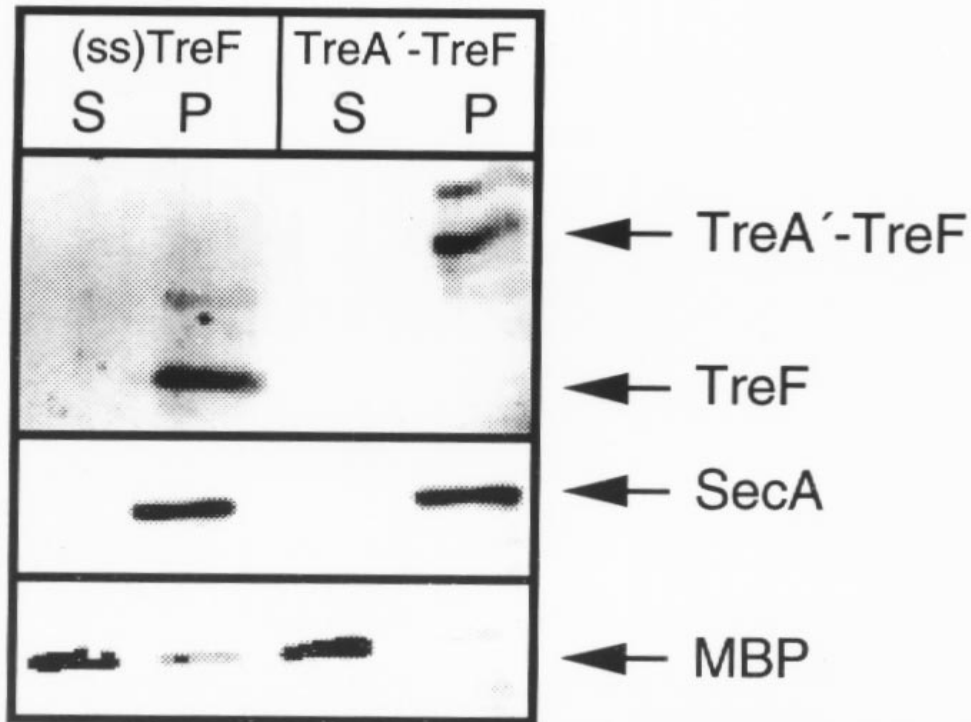


Abb. 5.10.: Aggregation von TreF und TreA'-TreF im Periplasma eines *degP*- Stammes

Abb. 5.10. zeigt die Überstands- (Ü, lösliche, periplasmatische Proteine) und die Sedimentfraktionen (S, Zytoplasma- und Membranproteine sowie Proteinaggregate) von kalten osmotischen Schocks von *degP*- Stämmen, die prozessiertes TreF bzw. TreA'-TreF im Periplasma enthielten (KU104psstreF und KU104ptreA'-treF). Pro Spur wurden Fraktionen aus ursprünglich 2 µg Ganzzellprotein auf ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %) aufgetragen. Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und dort sowohl mit TreF-, als auch mit SecA- und MBP-Antisera entwickelt.

5.2.1.5. Die Ausbildung von Disulfidbrücken durch DsbA ist nicht der ausschließliche Grund für die Aggregation von TreF im Periplasma

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Periplasma und Zytoplasma ist der Redox-Status dieser beiden Kompartimente. Während im Zytoplasma reduzierende Bedingungen aufrecht erhalten werden, findet im Periplasma eine katalysierte Oxidation von SH-Gruppen statt (vergl. Einleitung). Die Aminosäuresequenz von TreF enthält drei Cysteine. Aus den Rückfaltungsstudien an gereinigtem TreF (Vergl. Kapitel 5.1.3.7.) ist bekannt, daß das Protein Disulfidbrücken ausbildet, wenn es im denaturierten Zustand vorliegt.

Die Ausbildung von Disulfidbrücken durch die Disulfid-Oxidoreduktase DsbA (Bardwell et al., 1991) scheint zumindest nicht der einzige Grund für eine falsche Faltung von TreF im Periplasma zu sein, denn die TreF-Aktivität der *dsbA*-Nullmutante KU108psstreF (*degP*⁻, *dsbA*⁻-Stammes) unterschied sich nicht signifikant von der des isogenen *dsbA* Wildtypstammes KU104psstreF (Daten nicht gezeigt).

Außerdem konnte durch die Schaffung reduzierender Bedingungen (durch Zugabe von 35 mM DTT zu den Zellen) weder die Aktivität von TreF im Periplasma erhöht noch die Aggregation (sichtbar in kalten osmotischen Schocks) vermindert werden (Daten nicht gezeigt).

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

Da die Koexpression des TreA-N-Terminus möglicherweise den Kontakt zu geeigneten Faltungshelfern für TreF herstellen könnte, war es interessant zu untersuchen, ob die Expression von TreF im Periplasma verbessert werden kann, wenn es als TreA'-TreF Fusionsprotein synthetisiert wird. Für diese Untersuchung wurden ptreA'-treF und pΔstreA'-treF kloniert (vergl. Plasmidkonstruktionen, Kapitel 4.3.3.). Diese Plasmide codieren für Hybridproteine, in denen das vollständige TreF C-terminal an Aminosäure 233 von TreA (pΔstreA'-treF) bzw. Aminosäure 263 von Vorläufer-TreA (ptreA'-treF) fusioniert ist.

5.2.1.7. TreA'-TreF wird im Periplasma abgebaut und in einer *degP* Null-Mutante stabilisiert

Genau wie prozessiertes TreF wurde TreA'-TreF, welches als Vorläuferprotein synthetisiert worden war, beinahe vollständig abgebaut, wenn es ins Periplasma transloziert wurde. In dem *degP*⁻ Stamm KU104ptreA'-treF konnte das Fusionsprotein stabilisiert werden (vergl. Abb. 5.17.). Es lief dann in der SDS-PAGE als Doppelbande. Die obere der beiden Banden hatte die gleiche Größe wie TreA'-TreF, welches ohne Signalsequenz synthetisiert wurde. Die Signalsequenz von TreA'-TreF wurde also vollständig prozessiert und das Fusionsprotein demnach ins Periplasma transloziert. Im Zytoplasma von KU101pΔstreA'-treF wurden ca. 15 % von TreA'-TreF zu der Größe von TreF degradiert. Ein solches Abbauprodukt konnte im Periplasma von KU104ptreA'-treF nicht nachgewiesen werden (vergl. Abb. 5.17.B).

5.2.1.8. TreA'-TreF hat im Periplasma nur geringe Aktivität

Die Aktivität des Fusionsproteins TreA'-TreF war im Periplasma vergleichbar mit der von TreF in diesem Kompartiment (Tabelle 5.5.). Die Aktivität war mit 0,02 Units pro mg Zellprotein in KU101ptreA'-treF sehr gering und erhöhte sich durch die Stabilisierung im *degP*⁻ Stamm um das 4,5-fache auf 0,09 Units pro mg Zellprotein. Verglichen mit TreA (3,91 Units pro mg Zellprotein) unter gleichem Promotor ist die Aktivität auch im *degP*⁻ Stamm sehr gering. Der TreA-Teil des Fusionsproteins leistet also keinen positiven Beitrag zu Faltung von TreF im Periplasma.

Die Trehalase-Aktivität von TreA'-TreF wurde im KU101p Δ sstreA'-treF Ganzzell-extrakt auf 3,91 Units pro mg Zellprotein bestimmt. Im KU101pBADtreF-Ganzzell-extrakt^{*)} war die Trehalase-Aktivität mit 6,64 Units pro mg Zellprotein ca. 1,7 mal höher (Vergl. Tabelle 5.11.). Wäre nur das TreF-Abbauprodukt von TreA'-TreF aktiv, so wäre aufgrund der TreF-Menge (vergl. Abb. 5.17.B) nur eine geringere Trehalase-Aktivität zu erwarten. Höchstwahrscheinlich war demnach auch das Fusionsprotein aktiv. Der TreA-Teil scheint also nicht generell einen störenden Einfluß auf die Trehalase-Faltung und -Aktivität zu haben.

5.2.1.9. Selektion für prozessiertes TreF mit höherer Aktivität

Wurde TreF als Vorläuferprotein synthetisiert, so fand eine Translokation der Trehalase über die Zytoplasmamembran statt. Das Enzym wurde im Periplasma jedoch abgebaut, oder es aggregierte, wenn die Degradation durch das Ausschalten der verantwortlichen Protease, DegP, verhindert wurde. Es wies nur geringe enzymatische Aktivität auf, obwohl die TreF-Aktivität durch die periplasmatischen Bedingungen nicht wesentlich beeinträchtigt sein sollte (Vergl. Kapitel 5.1.2.). Die in Kapitel 5.1.3.7. beschriebenen Rückfaltungsexperimente zeigten, daß sich denaturiertes TreF unabhängig von einem Chaperon oder Faltungskatalysator zurückfalten kann. Die Experimente zeigten jedoch auch eine starke Neigung der Polypeptidkette zur Aggregation.

Entweder ist die gesamte TreF-Sequenz so an die Faltungs- bzw. Reaktionsbedingungen des Zytoplasma angepaßt, daß eine effektive Faltung oder enzymatische Aktivität im Periplasma nicht möglich ist, oder einzelne Aminosäuren stören die Ausbildung einer aktiven Konformation bzw. die Aktivität von TreF im Periplasma. Im letzteren Fall sollte es möglich sein, TreF so zu mutagenisieren, daß eine Trehalase mit höherer enzymatischer Aktivität entsteht.

Das Selektionssystem

Als Selektionsstamm für die Selektion von TreF mit höherer periplasmatischer Aktivität wurde der Stamm KU101 (*treA*::Spec, Δ *treRBC*) verwendet. Da dieser Stamm aufgrund der Deletion von *treB* und *treC* keine Trehalose ins Zytoplasma aufnehmen und verstoffwechseln kann, hängt seine Wachstumsgeschwindigkeit auf MMA mit Trehalose als einziger Kohlenstoffquelle von der Aktivität einer periplasmatisch lokalisierten Trehalase ab (Vergl. Abb.5.11.). Da TreA in KU101 ausgeschaltet ist, ist das Wachstum

^{*)} TreF und TreA'-TreF werden in pBADtreF bzw. ptreA'-treF unter dem selben Promotor exprimiert.

von KU101psstreF auf MMA Trehalose durch die niedrige TreF-Aktivität im Periplasma limitiert. Der Stamm KU101psstreF bildete auf MMATrehalose bei 37°C erst nach zwei bis drei Tagen gut sichtbare Einzelkolonien aus*). Er sollte sich daher für die Selektion eines aufgrund erhöhter Trehalase-Aktivität schneller wachsenden Stammes eignen.

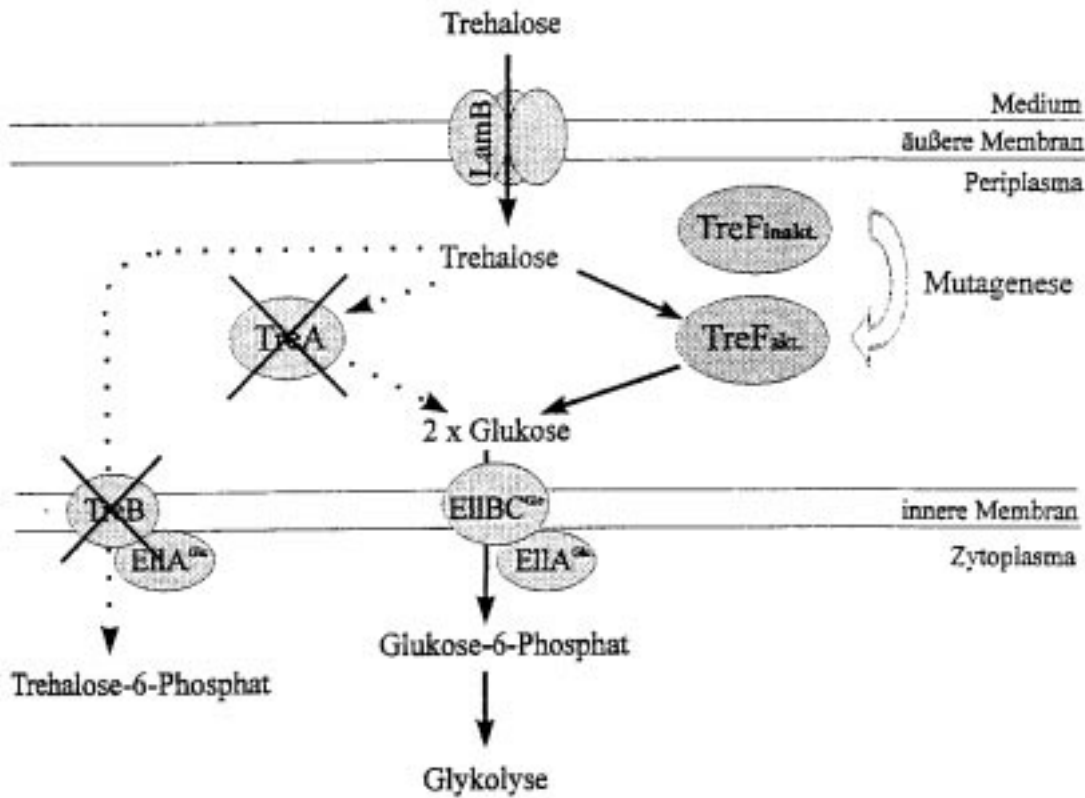


Abb. 5.11.: Selektionsprinzip für aktive Trehalasen im Periplasma

Die molekularen Grundlagen, durch die das Wachstum des *treA::Spec^R, ΔtreRBC*-Selektionsstammes KU101psstreF auf Trehalose von der Aktivität einer periplasmatisch lokalisierten Trehalase abhängt, sind schematisch dargestellt.

*) KU101pTre11 benötigte dagegen nur einen Tag, um die gleiche Koloniengröße zu erreichen.

Durchführung der Selektion

Um für TreF mit erhöhter Aktivität im Periplasma zu selektionieren, wurde KU101psstreF mit 2-Aminopurin mutagenisiert. Die mutagenisierten Plasmide wurden präpariert und mittels Elektroporation in KU101 retransformiert. Insgesamt wurden 40 Elektro-Transformationsansätze direkt auf 40 MMA Trehalose Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

Auf diesen Platten waren nach ein bis zwei Tagen ca. 150 Kolonien deutlich größer als die schätzungsweise 100 000 übrigen Transformanden. Diese Kolonien wurden durch wiederholtes Ausstreichen auf Selektionsmedium gereinigt und dann die Trehalose-Verstoffwechslung auf dem Indikatormedium MacConkey Trehalose überprüft. Von den ca. 25 verbleibenden Stämmen, die im Gegensatz zu dem nur hellroten KU101psstreF eine deutliche Rotfärbung auf MacConkey Trehalose hervorriefen, wurde die Trehalase-Aktivität bestimmt. Die beiden Stämme, deren Trehalase-Aktivität im Vergleich zu KU101psstreF mehr als zweifach erhöht war, werden im folgenden als die psstreF-Mutanten 24 und 25 analysiert.

5.2.1.10. Plasmid-codierte Mutationen lösen die erhöhte Trehalase-Aktivität aus

Wurden die aus den Mutanten isolierten Plasmide psstreF24 und psstreF25 in KU101 retransformiert, dann verhielten sich die Retransformanden auf MMA Trehalose, MacConkey Trehalose sowie in Trehalase-Aktivitätstests entsprechend den ursprünglich isolierten Mutanten. Folglich hatte eine Mutation auf den Plasmiden stattgefunden.

5.2.1.11. Die erhöhte Aktivität von TreF24 und TreF25 im Periplasma wird durch verschiedene Punktmutationen ausgelöst

Um die für die erhöhte Trehalase-Aktivität von TreF24 und TreF25 verantwortlichen Mutationen zu identifizieren, wurden die Vorläufer-*treF*-codierenden Bereiche der Plasmide psstreF24 und psstreF25 sequenziert^{*)}. Folgende Punktmutationen wurden in *treF* gefunden:

In psstreF24 ist Adenin₂₄₄ gegen Guanin ausgetauscht. Der Basenaustausch verändert das Triplet *aca* zu *gca* und bewirkt einen Aminosäureaustausch von Alanin₈₂ zu Threonin. Mutation 24 wird deshalb im Folgenden auch mit TreF A₈₂->T bezeichnet.

In psstreF25 ist Cytosin₅₁₅ gegen Tyrosin ausgetauscht. Das Triplet *acc*₁₇₂ wird zu *atc*. Threonin₁₇₂ (polare Restgruppe) wird dadurch gegen Isoleucin (unpolare Restgruppe) ausgetauscht. Mutation 25 heißt deshalb im Folgenden auch TreF T₁₇₂->I.

Weitere Mutationen konnten nicht gefunden werden. Sie sind jedoch nicht vollständig auszuschließen.

^{*)} Das Sequenzgel wurde von Frau S. Englisch (Technologie Transfer Zentrum, Universität Konstanz) gefahren.

Interessanterweise liegt die Mutation in TreF25 innerhalb der ersten der beiden in Glykosylhydrolasen konservierten Bereiche. Die periplasmatische Trehalase TreA, deren Aktivität für das Periplasma optimiert sein sollte, hat an der entsprechenden Stelle ein Valin, also eine ebenfalls hydrophobe Aminosäure mit sehr ähnlicher Struktur.

Vergleicht man allerdings die Sequenzen des ersten konservierten Bereiches aller bisher bekannten Trehalasen, so stellt man fest, daß bis auf TreF alle Trehalasen (auch zytoplasmatische) an der mutierten Stelle einen unpolaren Aminosäurerest haben. In einer Trehalase liegt sogar ebenfalls Isoleucin an dieser Position vor (vergl. Abb. 5.12.). Möglicherweise begünstigt ein unpolarer Aminosäurerest an dieser Position die Trehalase-Aktivität im allgemeinen.

Konsensus Sequenz		<u>PGGRF_xExY_xWD_xY</u>
TreF	<i>E. coli</i>	IVPGGRFSE T YYWDSY
TreF25	<i>E. coli</i>	IVPGGRFSE I YYWDSY
TreA	<i>E. coli</i>	VVPGRFR E VYYWDSY
TreA	<i>yeast</i>	AVPGGRFN E LYGWDSY
TreB	<i>yeast</i>	AVPGGRFN E LYGWDSY
TreA	<i>canal</i>	VVPGRFR E LYGWDSY
TreA	<i>klula</i>	AVPGGRFN E LYGWDSY
TreA	<i>bommo</i>	IVPGGRFKE I YYWDAY
TreA	<i>tenmo</i>	IIPGGRF T E F YYWDSY
TreA	<i>rabit</i>	IVPGGRF V E F YYWDSY

Abb. 5.12.: Konsensussequenzen der Trehalasen im ersten in Glykosylhydrolasen konservierten Bereich

Abb. 5.12. zeigt die Aminosäuren 164-180 von TreF sowie die entsprechenden homologen Sequenzen von TreF25, TreA und von Trehalasen anderer Organismen^{*)}, deren Sequenzen mit Hilfe der Datenbank SwissProt^{**)} ermittelt wurden. Die Mutation in TreF25 sowie die entsprechenden Positionen in den anderen Trehalasen sind fett hervorgehoben.

yeast = *saccharomyces cerevisiae*, *canal* = *candida albicans*, *klula* = *kluveromyces lactis*, *bommo* = *bombyx mori*, *tenmo* = *tenebrio molitor*, *rabit* = *oryctolagus cuniculus*

^{*)} Die in der SwissProt-Datenbank verwendeten Kürzel für die Organismen wurden beibehalten.

^{**)} <http://www.expasy.hcuge.ch/sprot/sprot-top.html>

5.2.1.12. In den Mutanten ist die Trehalase-Aktivität 4- bis 7-fach erhöht

Die Trehalase-Aktivitätstests zeigten, daß die mutierten Plasmide gegenüber dem nicht mutierten psstreF sowohl in KU101 (*degP* Wildtyp), als auch KU104 (*degP*::Tet^R) eine 4- bis 7-fache Steigerung der Trehalase-Aktivität auslösen.

Wenngleich die Aktivitäten der KU104psstreF-Mutanten deutlich gegenüber der des nicht mutierten KU104psstreF erhöht waren, so lagen sie dennoch um ein ca. 10-faches unter der Aktivität, die KU104pTre11 (mit der periplasmatischen Trehalase TreA unter gleichem Promotor) hervorrief.

Tabelle 5.6.: Aktivität der TreF-Mutanten

	Erhöhung der Aktivität	
	KU101 (<i>degP</i> ⁺)	KU104 (<i>degP</i> ::Tet ^R)
psstreF	1,0	1,0
psstreF24	6,1 +/- 1,3	6,0 +/- 1,3
psstreF25	5,5 +/- 1,7	7,4 +/- 1,8

Tabelle 5.6. zeigt die Erhöhung der Trehalase-Aktivitäten, die die psstreF-Mutanten gegenüber dem psstreF Wildtyp Plasmid in KU101 bzw. KU104 auslösen. Die Faktoren beziehen sich auf die Stämme KU101psstreF bzw. KU104psstreF, deren Trehalase-Aktivitäten 0,057 bzw. 0,119 Units pro mg Ganzzellprotein betragen. Die Faktoren sind aus vier voneinander unabhängigen Messungen gemittelt und mit ihren Standardabweichungen angegeben. Mit ca. 20 % sind diese Standardabweichungen sehr hoch. Die Aktivitäten der Mutanten waren dennoch in jeder Messung mindestens dreifach gegenüber denen des Wildtyps erhöht.

5.2.1.13. Die Expression der TreF-Mutanten unterscheidet sich nicht von der des TreF im Periplasma

Menge, Größe und Stabilität der mutierten Trehalasen TreF A₈₂->T und TreF T₁₇₂->I unterschieden sich in der Western Blot Analyse weder im *degP*⁺ Stamm KU101 noch im *degP*-Stamm KU104 von prozessiertem TreF (vergl. Abb. 5.13.). Proteinmenge und Proteingröße waren in den psstreF-Mutanten- und Wildtypstämmen identisch. Da die Signalsequenz abgespalten und die Proteine im *degP*-Wildtyp-Hintergrund abgebaut wurden, müssen die mutierten Trehalasen TreF A₈₂->T und TreF T₁₇₂->I als prozessierte Proteine im Periplasma vorgelegen haben.

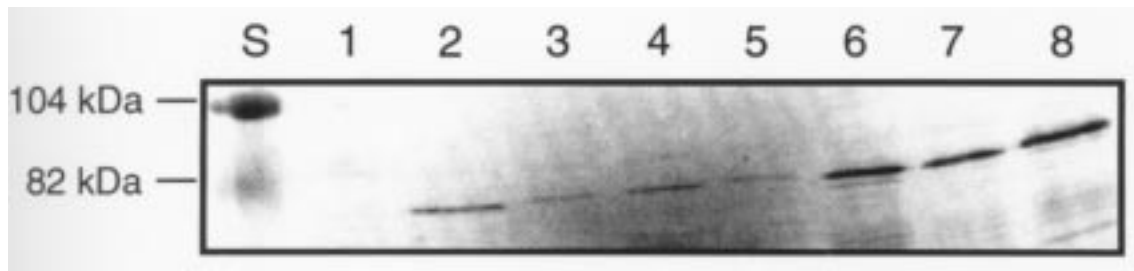


Abb. 5.13.: Expression von prozessiertem TreF und TreF-Mutanten und ihre Stabilisierung im *degP*⁻ Stamm

Für Abb. 5.13. wurden 2 µg Ganzzellprotein aus Übernachtskulturen (LBamp, 28°C) der *degP*⁺ und *degP*⁻-Stämme KU101 und KU104, die die Plasmide psstreF, psstreF24 bzw. psstreF25 enthielten, in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend mit einem TreF-Antiserum entwickelt.

S: vorgefärbter Molekulargewichtsstandard, **1:** KU101, **2:** KU101pBADtreF (induziert mit 1µM Arabinose), **3:** KU101psstreF, **4:** KU101psstreF24, **5:** KU101psstreF25, **6:** KU104psstreF (*degP*⁻), **7:** KU104psstreF24 (*degP*⁻), **8:** KU104psstreF25 (*degP*⁻).

5.2.1.14. Die Mutationen von TreF A₈₂->T und TreF T₁₇₂->I verhindern die Aggregation im Periplasma nicht

TreF A₈₂->T und TreF T₁₇₂->I wurden im Periplasma größtenteils degradiert. Kalte osmotische Schocks von den *degP*⁻-Stämmen KU104psstreF24 und KU104psstreF25 zeigten, daß die mutierten Trehalasen genau wie das nicht mutierte, prozessierte TreF im Periplasma aggregieren (Daten nicht gezeigt). Eine verbesserte Proteinlöslichkeit scheidet demnach als Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte enzymatische Aktivität der TreF-Mutanten im Periplasma aus.

5.2.2. Faltung von TreA

Wie im vorigen Kapitel beschrieben wurde, ist die zytoplasmatische Trehalase TreF zwar translokationskompetent, kann sich aber im Periplasma nicht effektiv zu einem löslichen, aktiven Enzym falten. In diesem Zusammenhang war es interessant zu untersuchen, welche periplasmatischen Faltungshelfer TreA benötigt, und ob sich die Trehalase auch im Zytoplasma falten kann.

5.2.2.1. TreA benötigt die Faltungskatalysatoren DsbA, RotA und SurA *nicht* zur Ausbildung ihrer aktiven Konformation *in vivo*

Proteine mit konservierter Konformation sollten bei der Faltung die gleichen Stufen durchlaufen (Stackhouse et al., 1988). Da vollständig gefaltete Proteine nicht transloziert werden können (Randall und Hardy, 1986), müßten an den gleichen Faltungsschritten von periplasmatischer und zytoplasmatischer Trehalase verschiedene Faltungshelfer beteiligt sein.

Die *dsbA*, *rot* bzw. *surA*-Nullmutanten KU71pTre11, KU70pTre11 und KU82pTre11^{*)} unterschieden sich weder in ihrer TreA-Expression noch in ihrer Trehalase-Aktivität signifikant von der des Stammes KU65pTre11 (vergl. Abb. 5.14. und Tabelle 5.7.). Die korrekte Faltung der periplasmatischen Trehalase hängt also nicht von der Disulfid-Oxido-Reduktase DsbA oder den Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen Rot und SurA ab. In Tabelle 5.7. wird die Trehalase-Aktivität des *treA*-Stammes KU65, der das Plasmid pTre11 enthält, mit verschiedenen Faltungshelfer-Mutanten im gleichen Stammhintergrund verglichen. Abb. 5.14. zeigt die Expression der entsprechenden Stämme im Western Blot.

Tabelle 5.7.: Einfluß von Faltungshelfer-Mutationen auf die Aktivität von TreA

Stamm	relevanter Genotyp	Trehalase-Aktivität ^{a)}	% der Aktivität im Wildtyp
KU65	ohne TreA	0,004	0,1
KU65pTre11	wt	3,92	100,0
KU70pTre11	<i>rot</i>	3,63	92,8
KU82pTre11	<i>surA</i>	4,09	104,4
KU71pTre11	<i>dsbA</i>	3,50	89,5
KU65pTre11 + DTT	wt, reduzierende Bedingungen	3,93	100,4
KU67pTre11	<i>degP</i>	3,96	101,0

^{*)} pTre11 exprimiert TreA unter eigenem Promotor.

a) Die Trehalase-Aktivität ist in Units pro mg Zellprotein angegeben. Die Werte sind aus je drei voneinander unabhängigen Messungen gemittelt. Die Standardabweichungen lagen jeweils unter 2 %.

Zur Bestimmung der Trehalase-Aktivität wurden die Zellen von Übernachtskulturen (LBamp, 28°C) der Stämme KU65, KU65pTre11, KU70pTre11 (*rot*::Kan^R), KU82pTre11 (*surA*::Kan^R), KU71pTre11 (*dsbA*::Kan^R) und KU67pTre11 (*degP*::Kan^R) zwei mal mit MMA gewaschen, auf eine Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml eingestellt und für 10 min bei Raumtemperatur mit 100 mM Trehalose inkubiert. Durch Aufkochen der Proben für 5 min wurde die Reaktion gestoppt. Die Menge an freigesetzter Glukose wurde mit Hilfe des Glukose-Peroxidase-Tests bestimmt. (Durch starke osmotische Induktion von TreA auf pTre11 konnte die Trehalase-Aktivität entsprechend der Trehalase-Expression erhöht werden. Die Diffusion der Trehalose durch die Porine der Außenmembran ist also auch bei sehr hohen Trehalase-Aktivitäten nicht limitierend.)

Die Trehalase-Aktivitäten unterschieden sich in den Faltungskatalysator-Mutanten *rot*, *surA* und *dsbA* nicht signifikant von der im Wildtyp-Stamm gemessenen Aktivität. Da keine *rot*, *surA*-Doppelmutante getestet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich diese beiden Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen in ihrer Funktion komplementieren. FkpA, eine dritte Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase im Periplasma von *E. coli* (Missiakas et al., 1996), könnte die Funktion von Rot bzw. SurA ebenfalls ersetzen.

TreA verfügt über zwei Cysteine (Cys 503 und Cys 509), die am C-Terminus sehr dicht beieinander liegen. Eine Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Cysteinen scheint für die Aktivität von TreA nicht notwendig zu sein, denn erstens unterschied sich die unter reduzierenden Bedingungen (35 mM DTT im Trehalase-Test) gemessene Trehalase-Aktivität nicht von der unter nicht-reduzierenden Bedingungen^{*)}, und zweitens hatte eine *dsbA*-Nullmutation keinen Effekt auf die TreA-Aktivität. Die beiden Cysteine sind in Trehalasen nicht konserviert. Eine besondere Bedeutung der SH-Gruppen für die Trehalase-Aktivität ist daher auch nicht zu erwarten.

Da es Hinweise gibt, daß DegP neben seiner Protease-Aktivität auch Chaperon-Aktivität haben könnte (vergl. Einleitung), wurde die Auswirkung einer *degP*-Nullmutante auf TreA getestet. Die *degP*-Nullmutation hatte keinen Einfluß auf die Trehalase-Aktivität (Tabelle 5.7.).

^{*)} Da der Glukose-Peroxydase-Test durch freies DTT gestört wird, wurden die freien Thiolgruppen vor der Bestimmung der freigesetzten Glukosemenge mit Jodacetamid alkyliert.

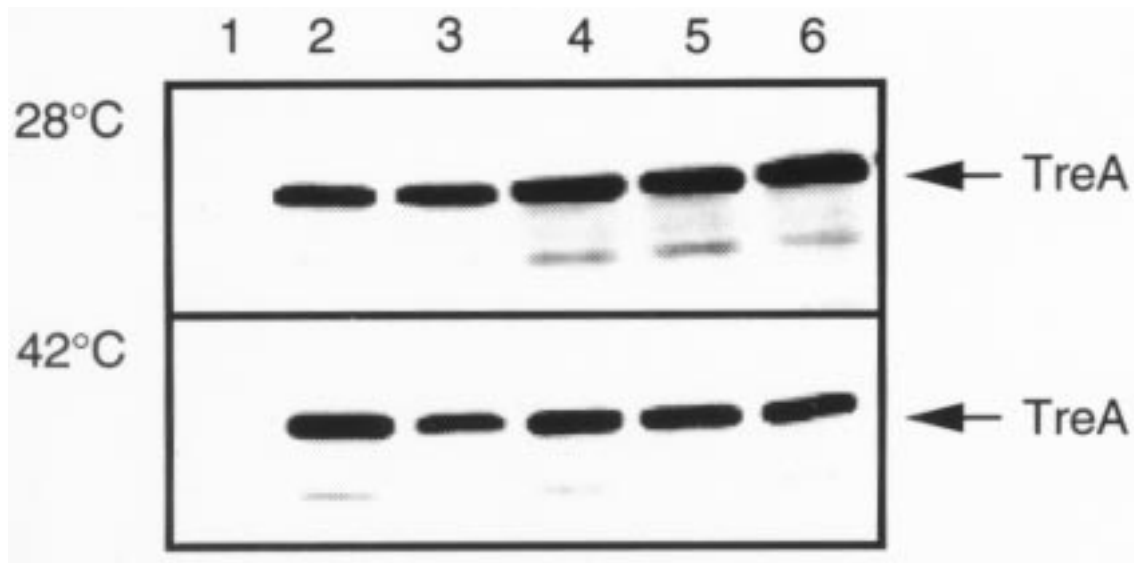


Abb. 5.14.: Einfluß verschiedener Faltungshelfer-Mutationen auf die Expression von TreA

Abb. 5.14. zeigt einen Western Blot von verschiedenen Faltungshelfermutanten und dem Wildtypstamm. Je 2 µg Zellprotein von Übernachtskulturen der unten angegebenen Stämme (LBamp, 28°C und 42°C) wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und dann auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Entwicklung erfolgte mit TreA-Antiserum.

1: KU65 (Kontrollstamm ohne TreA), **2:** KU65pTre11, **3:** KU71pTre11 (*degP*::Kan^R), **4:** KU70pTre11 (*rot*::Kan^R), **5:** KU82pTre11 (*surA*::Kan^R), **6:** KU71pTre11 (*dsbA*::Kan^R)

Abb. 5.14. zeigt, daß sich die Faltungshelfer-Mutanten hinsichtlich ihrer TreA-Expression nicht vom Wildtypstamm unterscheiden. Dies steht im Einklang mit dem Ergebnis, daß die Nullmutationen auch keinen Einfluß auf die Trehalase-Aktivität haben.

5.2.2.2. TreA ist im Zytoplasma aktiv, wenn es ohne Signalsequenz exprimiert wird

Sollte kein 'Kompartiment-spezifischer' Faltungshelfer für die Ausbildung der funktionellen TreA-Konformation erforderlich sein, dann könnte TreA möglicherweise auch außerhalb seines vorgesehenen Kompartiments seine aktive Konformation einnehmen. Andererseits sollte die Faltungseffizienz eines periplasmatischen Proteins im Zytoplasma gering sein, damit die Translokationskompetenz aufrechterhalten bleibt.

Um die Faltung der periplasmatischen Trehalase im Zytoplasma zu untersuchen, wurde das Plasmid pΔstreA konstruiert (siehe Plasmidkonstruktionen, Kapitel 4.3.3.), in dem die periplasmatische Trehalase ohne Signalsequenz unter Kontrolle des Arabinose-Promotors exprimiert wird.

Der Stamm KU95 (*treA::Spec^R*, *treC-lacZ*, Δ *ara...leu::Tn10Tet^R*) wächst nur in Anwesenheit einer aktiven Trehalase auf Minimalmedium mit Trehalose als einziger Kohlenstoffquelle. Enthielt dieser Stamm das Plasmid p Δ sstreA, dann wuchs er in Abhängigkeit des Induktors Arabinose auf Trehalose. Reifes TreA wird also in Abhängigkeit des Arabinose-Promotors exprimiert und ist aktiv.

Der Stamm KU92 (*treA::spec^R*, Δ *treRBC*) kann im Gegensatz zu KU95 keine Trehalose ins Zytoplasma aufnehmen. Er sollte daher nur in Anwesenheit einer periplasmatischen Trehalase auf Trehalose wachsen (vergl. Abb. 5.11.). KU92, der p Δ sstreA enthielt, wuchs ganz schwach auf Trehalose, das heißt, die Trehalase ist - wie aufgrund der fehlenden Signalsequenz zu erwarten - nicht im Periplasma, sondern im Zytoplasma lokalisiert*).

Western Blots von osmotisch geschockten Zellen (siehe Abb. 5.22., Kapitel 5.2.4.) sowie Aktivitätstests an ganzen Zellen und Zellextrakten (Tabelle 5.8.) bestätigten, daß reifes TreA von p Δ sstreA exprimiert wird, sich vorwiegend im Zytoplasma befindet und dort aktiv ist (Vergl. Kapitel 5.2.4.1.).

Tabelle 5.8.: Vergleich der Trehalase-Aktivitäten im Periplasma und im Zytoplasma

	Aktivität ^{a)}		% vom Extrakt
	ganze Zellen	Ganzzellextrakt	
p Δ sstreA	0,62 +/- 0,11	2,89 +/- 0,05	21,3
pBADtreF	0,53 +/- 0,09	6,64 +/- 0,63	8,0
ohne Plasmid	0,004 +/- 0,002	0,02 +/- 0,01	-

Tabelle 5.8. zeigt die Trehalase-Aktivitäten von KU101p Δ sstreA bzw. KU101pBADtreF in ganzen Zellen und in Zellextrakten. Die Aktivitätsbestimmungen wurden mit gewaschenen 28°C LBamp Übernachtskulturen durchgeführt, die zur Induktion der Trehalase-Expression 5 μ M Arabinose enthielten.

^{a)}Die Trehalase-Aktivität ist mit ihren Standardabweichungen in Units pro mg Zellprotein angegeben. Die Werte sind aus je drei unabhängigen Messungen gemittelt.

*) KU92, der pBADtreF enthält, wächst ebenfalls schwach auf Trehalose. Vermutlich wird dieses Wachstum durch ein Transportsystem ermöglicht, welches Trehalose unspezifisch ins Zytoplasma schleust. Das Wachstum könnte auch die Aktivität zytoplasmatischer Trehalase vermittelt werden, die entweder durch Zell-Lyse freigesetzt oder zu einem sehr geringen Prozentsatz fälschlicherweise transloziert wird (vergl. Kapitel 5.2.4.3.). Alkalische Phosphatase, die ohne Signalsequenz exprimiert wird, ist auch in geringem Ausmaß (zu ca. 1%) im Periplasma lokalisiert (Derman et al., 1993b).

5.2.2.3. Die Substrataffinität von TreA ist im Zytoplasma vergleichbar mit der im Periplasma

Nach Messung der Trehalase-Aktivität eines KU95p Δ ssTreA Ganzzellextraktes in Abhängigkeit verschiedener Substratkonzentrationen zwischen 0,25 und 5 mM und reziproker Auftragung der Meßwerte nach Lineweaver-Burk wurde die Substrataffinität von Signalsequenz-losem TreA und Wildtyp TreA aus den Regressionsgeraden ermittelt. Für das ohne Signalsequenz exprimierte TreA wurde ein K_m -Wert von 0,16 mM und für TreA ein K_m -Wert von 0,31 mM bestimmt. Die Substrataffinität von Δ ssTreA ist in Tabelle 5.10. und Abb. 5.21. im Vergleich mit den Wildtyp-Trehalasen TreA und TreF sowie mit Trehalase-Hybriden (s.u.) dargestellt. Die Substrataffinität der periplasmatischen Trehalase ist im Zytoplasma annähernd gleich wie die im Periplasma. TreA scheint sich im Zytoplasma funktionell zu falten. Das Enzym braucht demnach keinen für das Periplasma spezifischen Faltungshelfer zur Ausbildung seiner aktiven Konformation. Entweder kann es sich im Zytoplasma spontan falten, oder aber ein zytoplasmatischer Faltungshelfer kann die Faltung dieses ursprünglich periplasmatischen Proteins assistieren.

5.2.3. Selektion und Charakterisierung von Trehalase-Hybriden aus TreA und TreF

Da sowohl die Struktur als auch die biochemischen Eigenschaften von TreA und TreF starke Ähnlichkeit aufweisen, gleichzeitig aber beträchtliche Unterschiede in Aminosäure-Zusammensetzung (vergl. Horlacher et al., 1996) und Faltungseigenschaften (TreA kann sich im Zytoplasma falten, TreF aber nicht im Periplasma) auftreten, war es interessant zu untersuchen, ob funktionelle Hybride aus TreA und TreF gebildet werden können, und wie sich diese Hybride in den unterschiedlichen Kompartimenten verhalten.

5.2.3.1. Das Selektionssystem für Trehalase-Hybride

Der Grundgedanke der Selektion bestand darin, einen Selektionsstamm zu verwenden, dessen Wachstum auf Trehalose als einziger Kohlenstoffquelle von der Aktivität einer Trehalase abhängt. Diesem Stamm wurden auf einem Plasmid die beiden Trehalase-Sequenzen *treA*' und *treF* angeboten, die durch Verkürzungen am 3' bzw. 5'-Ende für inaktive Genprodukte codieren. Da die DNA-Sequenzen der beiden Trehalasen - genau wie die Aminosäuresequenzen - über weite Bereiche identisch sind, sollte Rekombination an homologen Stellen und Deletion die Entstehung einer intakten Trehalase aus den beiden Teilstücken begünstigen. Wenn eine solche zusammengesetzte Trehalase aktiv ist, sollte sie zu Wachstum der im Folgenden beschriebenen Selektionsstämme auf MMA Trehalose führen.

Selektionsstämme:

Die Stämme KU92 (*treA::Spec^R*, Δ *treRBC*) und KU93 (*treA::Spec^R*, Δ *treRBC*, *prlA4...Kan^R*) können Trehalose nicht verstoffwechseln, denn sie nehmen Trehalose weder über das Trehalose-spezifische PTS auf, noch machen sie diese durch Hydrolyse im Periplasma dem Glukose-spezifischen PTS zugänglich. KU92 und KU93 sollten nur dann auf Minimalmedium mit Trehalose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, wenn sie über eine aktive Trehalase verfügen, die im Periplasma lokalisiert ist. Sie eignen sich daher für die Selektion einer solchen Trehalase. (Ein *treA::Spec^R*, Δ *treRBC*-Stamm wurde bereits zur Selektion von TreF-Mutanten mit erhöhter periplasmatischer Aktivität verwendet. Das Selektionssystem ist in Abb. 5.11. graphisch veranschaulicht.)

KU93 unterscheidet sich von KU92 durch die *prlA4*-Mutation, die dazu führt, daß eine Vielzahl periplasmatischer Proteine (u.a. auch TreA (siehe Kapitel 5.2.4.1.)) auch dann transloziert werden, wenn sie ohne Signalsequenz exprimiert werden (Derman et al., 1993; Bowden et al., 1992, Flower et al., 1994).

Im Gegensatz zu KU92 und KU93 kann der Stamm KU95 (*treA::Spec^R*, *treC-lacZ*) Trehalose als Trehalose-6-Phosphat ins Zytoplasma aufnehmen. Durch die Mutation der Phospho-Trehalase TreC wird Trehalose-6-Phosphat jedoch nicht für die Glykolyse verfügbar gemacht. Trehalose-6-Phosphat wird stattdessen durch das *otsB*-Genprodukt zu Trehalose dephosphoryliert, die dann durch eine zytoplasmatisch lokalisierte Trehalase zu zwei Molekülen Glukose hydrolysiert werden kann. Glukose im Zytoplasma kann über die Glukokinase der Glykolyse zugeführt werden. KU95 kann Trehalose also nicht nur in Abhängigkeit einer periplasmatisch aktiven Trehalase verstoffwechseln, sondern auch dann, wenn sich in ausreichendem Maße Trehalase-Aktivität im Zytoplasma befindet. (Die chromosomale Kopie der zytoplasmatischen Trehalase TreF reichte für das Wachstum von KU95 auf Trehalose nicht aus. KU95pBADtreF bzw. KU95p Δ ssTreA bildeten dagegen bereits nach einem Tag große Kolonien auf MMA Trehalose, 5 μ M Arabinose, aus.)

Selektionsplasmide:

Für die Selektion von Trehalase-Hybriden in diesen Selektionsstämmen wurden die Plasmide ptreA'-treF und p Δ ssstreA'-treF konstruiert (siehe Kapitel 4.3.3.3., Plasmidkonstruktionen).

In ptreA'-treF liegt die DNA-Sequenz des C-Terminus von TreF ab Aminosäure 166 direkt hinter der DNA-Sequenz der 373 N-terminalen Aminosäuren von reifem TreA. Der TreA-Teil wird in diesem Plasmid als Vorläuferprotein unter eigenem Promotor exprimiert.

p Δ ssstreA'-treF unterscheidet sich von ptreA'-treF dadurch, daß der TreA-Teil ohne Signalsequenz unter Kontrolle des Arabinose-Promotors exprimiert wird. In beiden Plasmiden überlappen die homologen DNA-Sequenzen von *treA* und *treF* über eine Länge von ca. 750 bp. Dieser überlappende Bereich, in dem Rekombination stattfinden kann, codiert für die beiden Trehalasen von der zweiten Aminosäure des ersten in Glykosylhydrolasen konservierten Sequenzmotivs bis 43 Aminosäuren vor Beginn des zweiten in Glykosylhydrolasen konservierten Sequenzmotivs.

Das Selektionsprinzip ist in Abb. 5.15. dargestellt. Die in den Selektionsplasmiden enthaltenen Sequenzen *treA*' und *treF*' sind durch Großbuchstaben hervorgehoben.

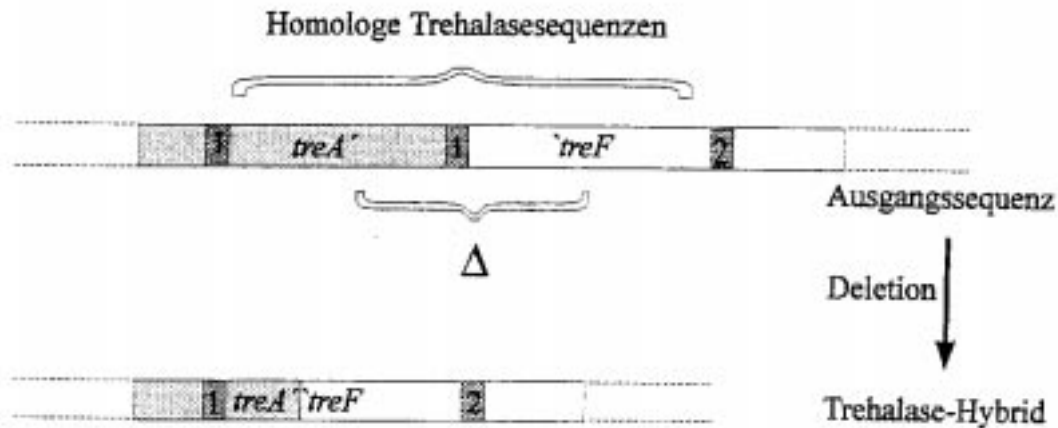


Abb. 5.15.: Selektionsprinzip für Trehalase-Hybride

Die Entstehung einer Trehalase-Hybrid-Sequenz aus den in den Selektionsplasmiden *ptreA*'-*treF*' bzw. $p\Delta$ *streA*'-*treF*' angebotenen Trehalasesequenzen ist schematisch gezeigt. Die Sequenz eines intakten Hybridproteins entsteht durch Deletion. Diese kann entweder spontan oder durch Aneinanderlagerung der homologen Sequenzbereiche von *treA*' und *treF*' und anschließendes 'cross over' entstehen.

5.2.3.2. Durchführung der genetischen Selektionen

Selektion für *TreA*'-*TreF*'-Hybride

Für die Selektion von *TreA*'-*TreF*'-Hybriden wurde das Plasmid *ptreA*'-*treF*' in den Selektionsstamm KU92 transformiert. Die Transformanten wuchsen nicht auf MMA Trehalose. Die Zellen einer 25 ml LBamp-Übernachtskultur wurden zur Entfernung jeglicher Kohlenstoffquelle zwei mal mit MMA gewaschen und dann je ein Zehntel der Kultur auf eine MMA Trehalose-Platte ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 37°C wuchsen pro Platte ca. 150 Einzelkolonien unterschiedlicher Größe. 12 dieser spontanen Mutanten wurden zweimal auf Selektionsmedium gereinigt. Von den gereinigten Kolonien wurden die Plasmide präpariert und in KU92 retransformiert. Die Plasmide vermittelten Wachstum aller bzw. eines hohen Prozentsatzes der Re-transformanten auf MMA Trehalose. Von den wachsenden Kolonien wurden erneut die Plasmide präpariert. Diese wurden für die anschließende Charakterisierung verwendet (s.u.).

Selektion für TreA`-`TreF-Hybride ohne Signalsequenz

Um aktive TreA`-`TreF-Hybride ohne Signalsequenz zu selektionieren wurde das Plasmid p Δ streA`-`treF in den Selektionsstamm KU95 transformiert. Für die Selektion von TreA`-`TreF-Hybriden ohne Signalsequenz, die aktiv sind und zugleich in einem *prlA4*-Stamm transloziert werden können, wurde das gleiche Plasmid auch in KU93 transformiert. Beide Transformanden-Sämme wuchsen nicht auf MMA Trehalose mit 1 bis 1000 μ M Arabinose. Von den Stämmen KU95p Δ streA`-`treF und KU93p Δ streA`-`treF wurden je 50 ml LBamp-Übernachtskultur bei 37°C gezogen. Die Zellen wurden zweimal mit MMA gewaschen und auf insgesamt 40 MMA Trehalose Selektionsplatten ausplattiert, die zur Induktion von Δ ssTreA` bzw. des potentiellen Trehalase-Hybrids 0, 1, 10 bzw. 100 μ M Arabinose enthielten. Bei dem Selektionsansatz mit KU95p Δ streA`-`treF wuchsen selbst nach 5-tägiger Inkubation bei 37°C bzw. 28°C keine Kolonien auf den Selektionsplatten. Aus der Selektion mit KU93p Δ streA`-`treF konnten von MMA Trehalose Platten, die 1 μ M Arabinose enthielten und bei 37°C gewachsen waren, drei Kolonien isoliert werden. Diese wurden zweimal auf Selektionsplatten gereinigt und dann die Plasmide der Mutanten isoliert. Die Plasmide wurden jeweils in KU93 und KU95 transformiert und führten in beiden Stammhintergründen zu Arabinose-abhängigem Wachstum auf MMA Trehalose.

Aus den Transformanden wurden die auf diese Art gereinigten Plasmide erneut präpariert und zusammen mit den Plasmiden aus der TreA`-`TreF-Hybrid-Selektion charakterisiert.

5.2.3.3. Alle aktiven Trehalasen sind durch Deletionen von ca. 750 bp entstanden

Durch Restriktionsanalyse der aus den TreA`-`TreF- und den Δ ssTreA`-`TreF-Hybrid-Selektionen isolierten Plasmide wurde gezeigt, daß in allen Plasmiden im Trehalascodierenden Bereich Deletionen von ca. 750 bp Länge stattgefunden haben. Die Länge der Deletionen entspricht der Länge der überlappenden Bereiche im Selektionsplasmid und damit auch der Länge, die zu erwarten ist, wenn von den Trehalase-Teilstücken so viel verloren geht, daß sie sich zu einer intakten Trehalase zusammensetzen.

5.2.3.4. Fusionspunkte der TreA`-`TreF-Hybride

Die Fusionspunkte von Plasmiden der beiden Selektionen (ptreA`-`treF1, ptreA`-`treF2, ptreA`-`treF8, ptreA`-`treF10, p Δ streA`-`treF1 und p Δ streA`-`treF7) wurden durch DNA-Sequenzierung bestimmt^{*)}. ptreA`-`treF1, ptreA`-`treF2, p Δ streA`-`treF1 und p Δ streA`-`treF7 haben identische Fusionspunkte.

Die Fusionspunkte von TreA`-`TreF1, TreA`-`TreF8 und TreA`-`TreF10 sind in Abb. 5.6. und Abb. 5.7. eingezeichnet. Die Fusionen TreA`-`TreF1 und TreA`-`TreF8 sind außerdem in Abb. 5.18. zusammen mit den anderen Trehalase-Konstrukten schematisch dargestellt.

^{*)} Das Sequenzgel wurde von Herrn Baur (Technologie Transfer Zentrum, Universität Konstanz) gefahren.

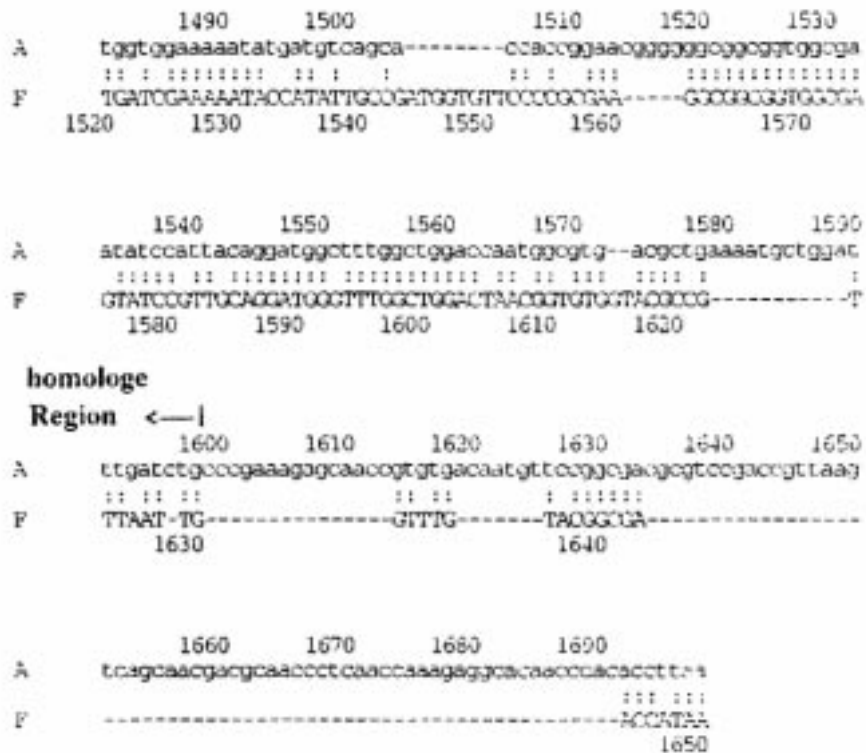


Abb. 5.16.: Homologievergleich von *treA* und *treF* und Lokalisation der Fusionspunkte der Trehalase-Hybride

Abb. 5.16. zeigt einen Homologievergleich*) der Nukleotidsequenzen von *treA* (oben) und *treF* (unten). Die Doppelpunkte kennzeichnen identische Nukleotide. Die Zahlen ober- bzw. unterhalb der Sequenzen geben die Basenpaare der *treF* bzw. *treA* Sequenz an der jeweiligen Stelle an. Zur Orientierung sind die Sequenzen (Motiv 1 und 2) überstrichen, die für die in Glykosyl-Hydrolasen konservierten Bereiche codieren. Außerdem sind Anfang und Ende der Sequenzen gekennzeichnet, die für die auf Aminosäure-Ebene homologe Region von TreA und TreF codieren.

Die im Selektionsplasmid vorkommenden Nukleotide sind in Großbuchstaben, die fehlenden in Kleinbuchstaben geschrieben. Die Lokalisation der Fusionspunkte 1, 8 und 10 ist mit den entsprechenden Zahlen markiert.

*)Die Sequenzen sind zu 55,9% identisch.

Der Fusionspunkt von *treA*'-'*treF1* liegt bei bp 1004 von *treA* und bp 1046 von *treF*. *treA*'-'*treF1* codiert für ein 535 Aminosäuren langes Fusionsprotein (einschließlich Signalsequenz), welches sich aus den ersten 334 Aminosäuren von TreA und den C-terminalen 200 Aminosäuren von TreF zusammensetzt. Am Fusionspunkt entsteht ein Valin.

ΔsstreA'-'*treF1* hat seinen Fusionspunkt bei bp 1046 von *treF* bzw. bp 905 von *ΔsstreA*. Der Fusionspunkt entspricht dem von *treA*'-'*treF1*. Das *ΔssTreA*'-'*TreF1*-Fusionsprotein besteht aus 503 Aminosäuren. Es setzt sich aus den drei Aminosäuren Met, Val und Leu am N-Terminus, 299 Aminosäuren von TreA (ab Codon 36, Thr), einem Valin am Fusionspunkt und den 200 C-terminalen Aminosäuren von TreF zusammen. *ΔssTreA*'-'*TreF1* unterscheidet sich lediglich an seinem N-Terminus von reifem *TreA*'-'*TreF1*.

Zwischen Ende der TreA-Sequenz und der Anfang der TreF-Sequenz werden bei diesen Hybriden weder Aminosäuren eingefügt noch deletiert. *TreA*'-'*TreF1* und *ΔssTreA*'-'*TreF1* besteht zu ca. 60 % aus TreA- und zu ca. 40 % aus TreF-Sequenz. Betrachtet man die homologe Kernregion (von Aminosäure 164 bis Aminosäure 548 von TreF bzw. Aminosäure 119 bis Aminosäure 416 von TreA, vergl. Abb. 5.6.), so besteht in dieser das selbe Verhältnis der Sequenzanteile.

Für den Übergang von TreA (Großbuchstaben) zu TreF (Kleinbuchstaben) ergeben sich für das *TreA*'-'*TreF1*-Hybrid folgende Nukleotid- und Aminosäuresequenzen:

```
TTA CGC ACC ACC AGC ATC GTA CCG Gtc gat ctg aat gcc ttc ctg ttt aaa
Leu Arg Thr Thr Ser Ile Val Pro Val asp leu asn ala phe leu phe lys
```

In *treA*'-'*treF8* liegt der Fusionspunkt bei bp 762 von *treF* bzw. bp 716 von *treA*. Das Gen codiert für ein 534 Aminosäuren langes Fusionsprotein (einschließlich Signalsequenz), das sich aus den 238 N-terminalen Aminosäuren von TreA und den 295 C-terminalen Aminosäuren von TreF zusammensetzt. Am Fusionspunkt bleibt das Alanin der TreA-Sequenz erhalten. Das Ende der TreA-Sequenz und der Anfang der TreF-Sequenz dieses Hybridproteins liegen an der selben Stelle in der Trehalasestruktur. Bei *TreA*'-'*TreF8* ist das Verhältnis der TreA- und TreF-Sequenzanteile im Kernbereich umgekehrt wie bei *TreA*'-'*TreF1*. Die TreA-Sequenz macht etwa 40 % des Proteins aus. Die restlichen C-terminalen 60 % werden von TreF gebildet (vergl. Abb. 5.18.). Der Übergang von der TreA- (Großbuchstaben) zur TreF-Sequenz (Kleinbuchstaben) verläuft in *TreA*'-'*TreF8* wie folgt:

```
CCG CAA ATG CAA AAA GAA TAT GCc ttc tgg atg gac ggt gca gaa tcg
Pro Gln Met Gln Lys Glu Tyr Ala phe trp met asp gly ala glu ser
```

Der Fusionspunkt von *treA*'-'*treF10* liegt bei bp 1025 von *treA* und bp 1068 von *treF*. *treA*'-'*treF10* codiert für ein 535 Aminosäuren langes Hybridprotein (einschließlich Signalsequenz). Dieses setzt sich aus den 342 N-terminalen Aminosäuren von TreA und den 193 C-terminalen Aminosäuren von TreF zusammen. Am Fusionspunkt werden weder Aminosäuren eingefügt noch deletiert.

Für den Übergang von TreA (Großbuchstaben) zu TreF (Kleinbuchstaben) ergeben sich für das Hybrid TreA'-TreF10 folgende Nukleotid- und Aminosäuresequenzen:

```
GTC GAT CTG AAC AGC CTG ATG TTT aaa ctg gag agc gcc atc gcc aac
Val Asp Leu Asn Ser Leu Met Phe lys leu glu ser ala ile ala asn
```

Gegenüber den Hybridproteinen TreA'-TreF1 und Δ ssTreA'-TreF1 ist der Fusionspunkt von TreA'-TreF10 um 7 Aminosäuren - also nur geringfügig - in Richtung C-Terminus verschoben. Die folgende Charakterisierung beschränkt sich daher auf die Hybride TreA'-TreF1, TreA'-TreF8 und Δ ssTreA'-TreF1.

5.2.3.5. Die TreA'-TreF-Hybride werden entsprechend der erwarteten Größe exprimiert

Die Expression der Trehalase-Hybride wurde im Western Blot untersucht. Wie Abb. 5.17.A und B zeigen, wurden die Hybridproteine exprimiert und sowohl von TreA- als auch von TreF-Antiserum erkannt.

Die Hybridproteine liefen auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel etwas unterhalb der Wildtyp Trehalasen TreA und TreF. Sie zeigten die Größe, die zu erwarten ist, wenn die Hybridproteine vollständig exprimiert werden. Mit 505 Aminosäuren ist z.B. das reife TreA'-TreF1-Hybrid um 30 bzw. 44 Aminosäuren kleiner als reifes TreA und TreF.

TreA'-TreF1 lief auf gleicher Höhe wie Δ ssTreA'-TreF1, das Trehalase-Hybrid ohne Signalsequenz mit gleichem Fusionspunkt. TreA'-TreF scheint demnach prozessiert zu werden. Dies spricht für eine periplasmatische Lokalisation dieses Hybridproteins.

Die Trehalase-Hybride TreA'-TreF1 und TreA'-TreF8 wurden in geringerer Menge exprimiert, als Wildtyp-TreA unter gleichem Promoter. Δ ssTreA'-TreF1, das Trehalase-Hybrid ohne Signalsequenz, wurde in einer Menge exprimiert, die in etwa mit Δ ssTreA und TreF vergleichbar war. (Die Quantifizierung der Expression kann jedoch nur eine Schätzung sein, da die Erkennung durch die Antiseren aufgrund der unterschiedlichen Sequenzanteile von TreA und TreF in Hybrid- und Wildtypproteinen verschieden ist.)

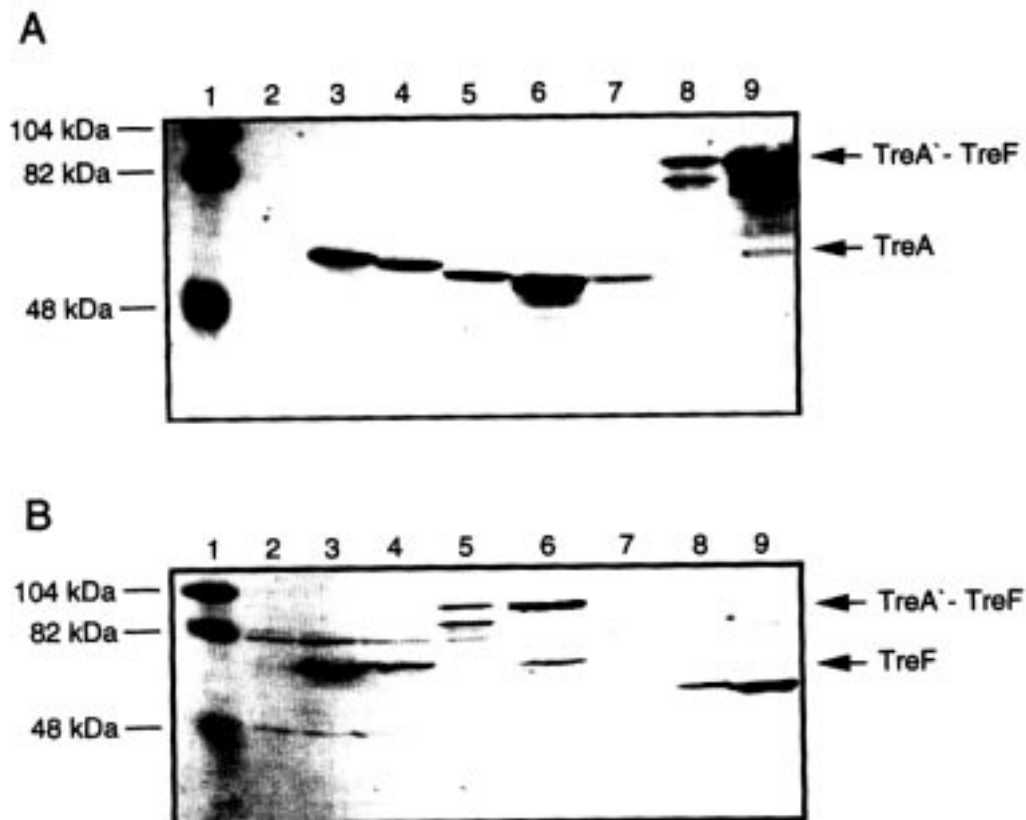


Abb. 5.17.: Expression der verschiedenen Trehalase-Konstrukte

Die Wildtyp-Trehalasen, die Trehalase-Hybridproteine und andere Trehalase-Konstrukte sind im Immunoblot vergleichend dargestellt. Je 2 µg Ganzzellprotein aus Übernachtskulturen (LBamp, 28°C, 5µM Arabinose) der unten angegebenen Stämme wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Entwicklung erfolgte mit TreA (A) bzw. TreF-Antiserum (B).

A) **1:** vorgefärbter Molekulargewichtsstandard mit 104, 82 und 48 kDa, **2:** KU104, **3:** KU104pTre11, **4:** KU104pΔstreA, **5:** KU104ptreA`-`treF1, **6:** KU104pΔstreA`-`treF1, **7:** KU104ptreA`-`treF8, **8:** KU104ptreA`-`treF, **9:** KU104pΔstreA`-`treF.

B) **1:** vorgefärbter Molekulargewichtsstandard mit 104, 82 und 48 kDa, **2:** KU104, **3:** KU104pBADtreF, **4:** KU104psstreF, **5:** KU104ptreA`-`treF, **6:** KU104pΔstreA`-`treF, **7:** KU104ptreA`-`treF1, **8:** KU104pΔstreA`-`treF1, **9:** KU104ptreA`-`treF8.

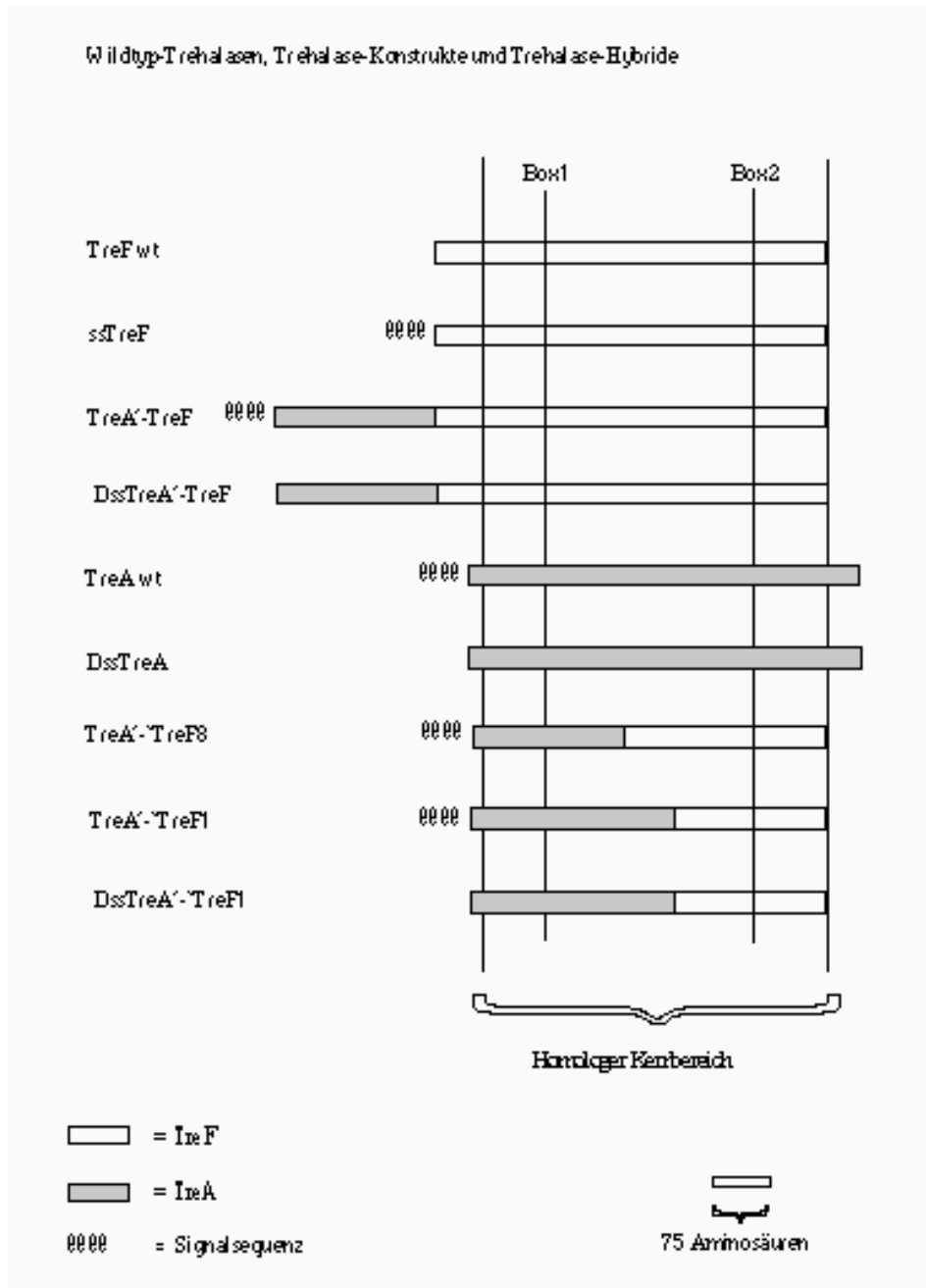


Abb. 5.18.: Wildtyp-Trehalasen, Trehalase-Konstrukte und Trehalase-Hybride

TreF ist mit weißen, TreA mit grauen Balken dargestellt. Die Signalsequenz ist mit eeee nicht maßstabsgerecht abgebildet. Die dünnen senkrechten Linien grenzen den homologen Kernbereich der beiden Wildtyp-Trehalasen ein. Box 1 und Box 2 geben die Lokalisation der in Glykosylhydrolasen konservierten Motive PGGRF_xExYxWDxY und QWDxPxGAWPAP innerhalb der Trehalasen an.

5.2.3.6. TreA'-TreF1 und TreA'-TreF8 werden im *degP*⁻ Stamm stabilisiert

In einer *degP*-Nullmutante, der Mutante einer periplasmatischen Protease, konnte die Expression der beiden Hybridproteine TreA'-TreF1 und TreA'-TreF8 im Vergleich zum *degP* Wildtypstamm um den Faktor 3 - 4 erhöht werden (vergl. Abb. 5.19.). Dies bedeutet, daß die geringe Expression der Hybride im Vergleich zu Wildtyp-TreA auf periplasmatische Degradation zurückzuführen ist. Die Stabilisierung durch das Ausschalten einer periplasmatischen Protease ist - neben der Prozessierung der Signalsequenz - ein weiterer indirekter Hinweis darauf, daß die beiden Hybride ins Periplasma transloziert werden.

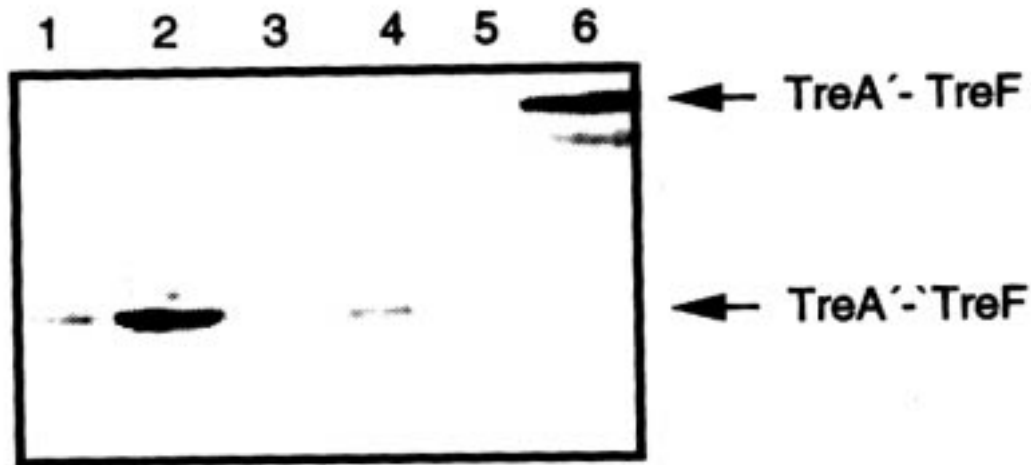


Abb. 5.19: Stabilisierung der Trehalase-Hybride im *degP*⁻ Stamm

In Abb. 5.19. wird die Menge der Trehalase-Fusionsproteine in *degP*⁺ und *degP*⁻ Stämmen KU101 und KU104 gezeigt.

Je 2 µg Ganzzellprotein aus Übernachtskulturen (LBamp, 28°C) der angegebenen Stämme wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Entwicklung erfolgte mit TreA-Antiserum.

1: KU101ptreA'-treF1, **2:** KU104ptreA'-treF1 (*degP*⁻), **3:** KU101ptreA'-treF8, **4:** KU104ptreA'-treF8 (*degP*⁻), **5:** KU101ptreA'-treF, **6:** KU104ptreA'-treF (*degP*⁻)

5.2.3.7. Die Trehalase-Aktivitäten der Hybridproteine TreA'-TreF1 und ΔssTreA'-TreF1 sind mit denen der Wildtyp Trehalasen vergleichbar

Die Trehalase-Hybride wurden dadurch selektiert, daß sie Tre⁻-Selektionsstämmen zum Wachstum auf MMA Trehalose verhalten. Sie müssen demnach Trehalase-Aktivität aufweisen. Die Aktivität der Trehalase-Hybride in ganzen Zellen und Zellextrakten des *degP* Wildtypstammes KU101 und des *degP*⁻-Stammes KU104 sind in Tabelle 5.9. aufgeführt.

Tabelle 5.9.: Aktivität der Trehalase-Hybride

A)

	Aktivität ^{a)}		
	KU101 (<i>degP</i> ⁺) ganze Zellen	Extrakt	KU104 (<i>degP</i> ⁻) ganze Zellen
ptreA ⁻ -treF1	0,57+/-0,07	0,54+/-0,08	1,47+/-0,16
ptreA ⁻ -treF8	0,02+/-0,01	0,03+/-0,01	0,10+/-0,05
pTre11	3,91+/-1,33	2,46 +/- 0,19	3,96+/-1,09
psstreF	0,06+/-0,03	0,07+/-0,01	0,12+/-0,05
ohne Plasmid	0,00+/-0,00	0,02+/-0,00	0,01+/-0,00

B)

	Aktivität ^{a)}
	KU101 (<i>degP</i> ⁺) Extrakt
pΔsstreA ⁻ -treF1	6,49+/-0,00
pΔsstreA	2,89+/-0,05
pBADtreF	6,64+/-0,63
ohne Plasmid	0,02+/-0,00

Tabelle 5.9. gibt die Aktivitäten der Trehalase-Hybride in den *degP*⁺- und *degP*⁻ Stämmen KU101 bzw. KU104 an. Zum Vergleich sind die Aktivitäten der Wildtyp-Trehalasen und anderer Trehalase-Konstrukte aufgeführt.

A) Von den Plasmiden ptreA⁻-treF1, ptreA⁻-treF8, pTre11 und psstreF werden die Trehalasen mit Signalsequenz unter der Kontrolle des *treA*-Promotors exprimiert.

B) pΔsstreA⁻-treF1, pBADtreF und pΔsstreA codieren für Trehalasen ohne Signalsequenz. Die Expression ist durch den Arabinose-Promotor kontrolliert. Durch die Zugabe von 5 μM Arabinose zum Wachstumsmedium wurde die Expression dieser Trehalasen so eingestellt, daß die Wildtyp-Trehalasen annähernd die gleiche Aktivität haben.

Für die Aktivitätsbestimmungen wurden LBamp Übernachtskulturen (28°C, 5 μM Arabinose), die jeweils eines der Trehalase-codierenden Plasmide enthielten, zwei mal mit MMA gewaschen und dann direkt (ganze Zellen) oder nach Aufschluß durch die French Press Zelle (Extrakt) im Trehalase-Test eingesetzt.

^{a)} Die Trehalase-Aktivitäten sind mit ihren Standardabweichungen in Units pro mg Zellprotein angegeben. Sie sind aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen gemittelt.

In dem *degP*-Wildtypstamm KU101 betrug die durch das Plasmid ptreA⁻-treF1 ausgelöste Aktivität ca. ein Siebentel der durch pTre11 ausgelösten Aktivität. In der *degP*-Nullmutante KU104ptreA⁻-treF1 war die Trehalase-Aktivität gegenüber dem *degP*-Wildtypstamm ca. 2,5-fach erhöht. Dies steht im Einklang mit der auf dem Western Blot beobachteten Stabilisierung des Hybridproteins.

Das Plasmid ptreA⁻-treF8 löste nur eine geringe Trehalase-Aktivität aus. Mit 0,02 und 0,1 Units pro mg Zellprotein in KU101ptreA⁻-treF8 bzw. KU104ptreA⁻-treF8 war sie mit der geringen Aktivität von TreF im Periplasma (psstreF) vergleichbar. Die niedrige

Aktivität war aufgrund der äußerst geringen Expression dieses Hybridproteins zu erwarten. Die durch das Ausschalten der Protease DegP stattfindende Stabilisierung spiegelte sich in einer 5-fachen Erhöhung der Aktivität wieder. Dennoch blieben Aktivitäts- und Expressionslevel von TreA'-TreF8 deutlich unter dem von TreA'-TreF1.

Da sowohl die im Western Blot abgeschätzte Expression, als auch die Aktivität von TreA'-TreF1 im *degP*-Stamm ca. 3 mal niedriger war als die von TreA, scheint sich die spezifische Aktivität von Wildtyp- und Hybridprotein nicht wesentlich zu unterscheiden. Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Trehalasen *in vivo* kann jedoch aufgrund der unterschiedlichen Erkennung der Antigene durch die Antiseren nur grob geschätzt werden.

Weder die Aktivität von KU101ptreA'-treF1 noch die von KU101ptreA'-treF8 erhöhte sich signifikant, wenn sie statt in ganzen Zellen in aufgeschlossenen Zellen bestimmt wurde. Das läßt - ebenso wie die vollständige Prozessierung der Signalsequenz - darauf schließen, daß die Hybridproteine vollständig ins Periplasma transloziert werden und nicht im Zytoplasma verbleiben.

Daß zumindest TreA'-TreF1 sich im Zytoplasma zu einem aktiven Protein falten kann, zeigt Tabelle 5.9.b. Hier sind die Aktivitäten der Trehalase-Konstrukte ohne Signalsequenz aufgeführt. TreA'-TreF1 und TreF haben mit 6,49 bzw. 6,64 Units pro mg Zellprotein nahezu identische Aktivitäten. Das Hybridprotein ist also voll funktionsfähig. (Die Aktivität ist durchaus auch mit der von TreA im Zytoplasma vergleichbar, sofern man die etwas geringere Expression (Abb. 5.17.) berücksichtigt.)

5.2.3.8. TreA'-TreF1 liegt im Periplasma als lösliches Protein vor, TreA'-TreF8 ist größtenteils aggregiert

Da die Trehalase-Aktivität von KU101ptreA'-treF1 im Extrakt und in ganzen Zellen über einen längeren Zeitraum (12 h, RT) annähernd konstant bleibt (Daten nicht gezeigt), ist davon auszugehen, daß die aktiven Hybridproteine gegenüber den zellulären Proteasen resistent sind. Die Degradation des Hybridproteins findet demnach entweder während der - möglicherweise verlangsamten - Faltung statt, oder sie betrifft den Teil der Hybridproteine, deren Konformation sich fehlerhaft ausbildet.

Um Faltungsdefekte zu detektieren, wurde überprüft, ob die Hybridproteine im Periplasma in löslicher Form vorliegen. Dazu wurden mittels kalter osmotischer Schocks lösliche periplasmatische Proteine (Ü) von der Zytoplasma- und Membranfraktion (S) getrennt, wobei mit letzterer auch aggregierte periplasmatische Proteine sedimentieren.

In Abb. 5.20. ist zu sehen, daß der größte Teil von TreA'-TreF1 (genau wie TreA) im Periplasma in löslicher Form vorliegt. Von TreA'-TreF8 ist dagegen nur eine minimale Menge an löslichem Protein nachweisbar.

Die Kontrollanfärbung des periplasmatischen Proteins MBP zeigt, daß ein Rest an periplasmatischem Protein in der Zytoplasma- und Membranfraktion (S) verblieb, obwohl es als natives Protein in löslicher Form vorliegen sollte. Folglich war der Aufschluß der Zellen durch die kalten osmotischen Schocks nicht vollständig. Da das zytoplasmatische und z.T. Membran-assoziierte SecA ausschließlich in der Sediment-

fraktion nachweisbar ist, ist sichergestellt, daß die Sphäroplasten während der Schocks intakt geblieben sind. Es ist also kein zytoplasmatisches Protein ins Periplasma freigesetzt worden.

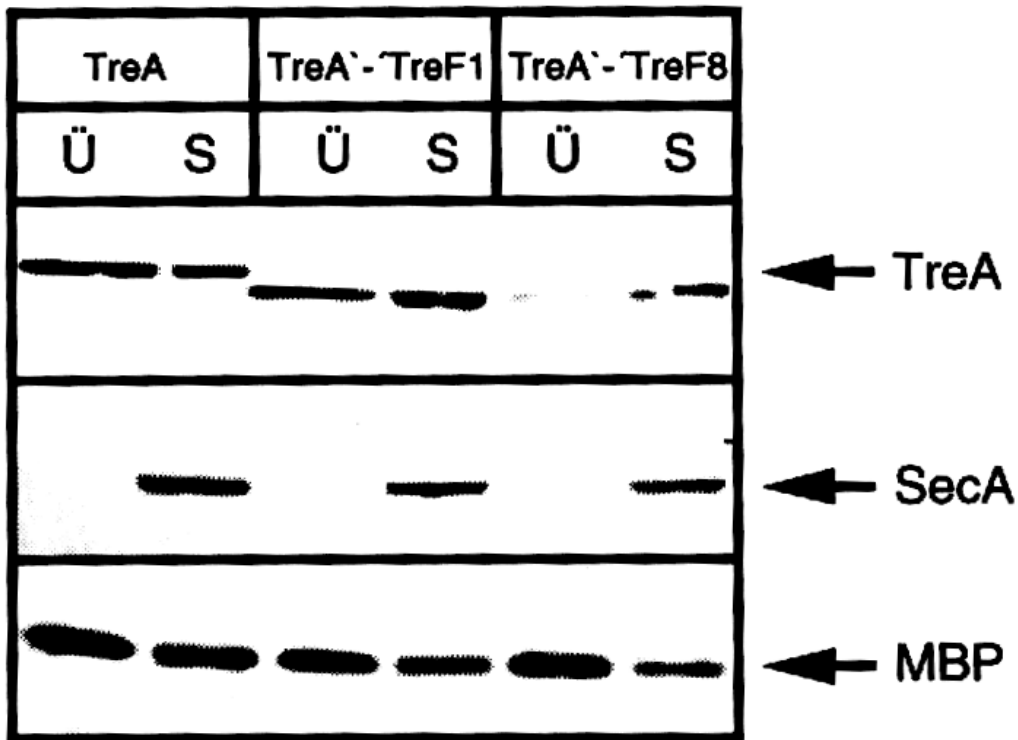


Abb. 5.20.: Löslichkeit der Trehalase-Hybride

Für die Trennung von löslichen periplasmatischen Proteinen (Ü) von den restlichen zellulären Proteinen (Zytoplasma- und Membranproteine sowie Aggregate) (S) wurden LBamp-Übernachtskulturen (28°C) der Stämme KU104pTre11, KU104ptreA'-treF1 und KU104ptreA'-treF8 kalt osmotisch geschockt und abzentrifugiert. Die Proteine aus Sediment (S) und Überstand (Ü) von ursprünglich 2 µg Ganzzellprotein wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Entwicklung erfolgte sowohl mit TreA-, als auch SecA- und MBP-Antisera.

5.2.3.9. Die Substrataffinität der Trehalase-Hybride ist mit der von TreA vergleichbar

Die Trehalase-Aktivität der TreA'-TreF1-Hybride wurde durch einen Vergleich der Substrataffinität der einzelnen Trehalase-Hybride mit denen der Wildtyp-Trehalasen charakterisiert. Dazu wurden die Trehalase-Aktivitäten von Ganzzellextrakten aus KU92pBADtreF und KU95pΔsstreA'-treF1 sowie von ganzen Zellen von KU92pTre11 und KU92ptreA'-treF1 bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 0,25 und 5 mM Trehalose bestimmt. In Abb. 5.21A ist die Abhängigkeit der Trehalase-Aktivität von der Substratkonzentration graphisch dargestellt. Abb. 5.21.B zeigt die reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk, die zur Ermittlung der Substrataffinitäten herangezogen wurde. In Tabelle 5.10. sind die K_m -Werte aufgelistet.

Die zytoplasmatische Trehalase TreF hat im Ganzzell-Extrakt einen K_m -Wert von 1,49 mM. Die periplasmatische Trehalase hat mit einem K_m -Wert von 0,31 mM eine stärkere Substrataffinität. Die Substrataffinität des Hybridproteins TreA'-TreF1 liegt mit 0,30 mM sehr nah an der von Wildtyp-TreA. Die K_m -Werte von Δss TreA und Δss TreA'-TreF1 entsprechen sich mit 0,16 mM. Obwohl die TreA'-TreF1-Hybride zu ca. 40 % aus dem schwächerbindenden TreF bestehen, haben sie eine ebenso hohe Affinität zu Trehalose wie Wildtyp-TreA. Wahrscheinlich enthält die TreA-Sequenz der TreA'-TreF-Hybride die Substratbindestelle.

In der Literatur wurde für gereinigtes TreA ein K_m -Wert von 0,78 mM beschrieben (Thourinho-dos-Santos, 1994). Für gereinigtes TreF wurde ein K_m -Wert von 1,9 mM ermittelt (vergl. Kapitel 5.1.2.1.). Die Substrataffinität wurde *in vivo* um ca. 0,5 mM niedriger bestimmt als *in vitro*. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür wäre, daß sich das Substrat aufgrund der hohen molekulare Dichte in Zellextrakten nur auf ein geringeres Volumen verteilen kann. Damit ist die Konzentration an Substrat scheinbar erhöht (molecular crowding Effekt).

Abb. 5.21.: Substrataffinitäten verschiedener Trehalasen

Abb. 5.21.A: Vergleich der Substratabhängigkeit der Trehalase-Aktivitäten von verschiedenen Trehalase-Hybriden, Signalsequenz-losem TreA sowie den Wildtyp-Trehalasen TreA und TreF

Abb. 5.21.A zeigt die Substratabhängigkeit der verschiedenen Trehalasen, wie sie bei periplasmatisch lokalisierten Enzymen aus ganzen Zellen und bei zytoplasmatisch lokalisierten Enzymen aus Ganzzellextrakten bestimmt wurden.

LBamp-Übernachtskulturen der Stämme KU92pTre11, KU92pBADtreF, KU92ptreA'-treF1, KU95p Δss treA'-treF1 und KU95p Δss treA wurden zweimal mit MMA gewaschen und entweder direkt oder nach Aufschluß mit der French Pressure Zelle auf eine Proteinkonzentration von 0,2 und 0,4 mg/ml eingestellt. Die Zellen bzw. Extrakte wurden dann jeweils mit 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5 mM Trehalose für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend aufgeköcht. Die Menge der freigesetzten Trehalose wurde im Glukose-Peroxidase-Test bestimmt. (Bei geringen Substratkonzentrationen mußten oft große Volumina für den Glukose-Nachweis eingesetzt werden. Bei entsprechender Behandlung des Glukose-Standards kann die Glukosemenge auch dann noch zuverlässig bestimmt werden.)

Zur Kontrolle, wieviel der durch die Trehalase-Reaktion freigesetzten Glukose durch die Enzyme der Zellen umgesetzt wurde, wurde die Abnahme einer bekannten, geringen Glukosemenge bei den Testbedingungen bestimmt. Die Menge war mit dem Glukose-Peroxidase-Test nicht nachweisbar. Sie wurde deshalb bei der Auswertung der Daten vernachlässigt.

In den für den Trehalase-Test eingesetzten Zellen und Extrakten konnte keine Glukose nachgewiesen werden.

*Die Aktivitäten sind in Prozent angegeben und beziehen sich jeweils auf den Wert bei Substratsättigung. Die Werte sind aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Messungen gemittelt.

Rauten = TreF, Quadrate = TreA, Dreiecke = TreA'-TreF1, Kreise = Δss TreA, Kreuze = Δss TreA'-TreF1

Abb. 5.21.B: Ermittlung des K_m -Wertes von Signalsequenz-losem TreA, verschiedenen Trehalase-Hybriden sowie von den Wildtyp-Trehalasen TreA und TreF

Trehalase-Aktivitäten und Substratkonzentrationen sind reziprok gegeneinander aufgetragen. Die Ausgleichsgeraden wurden aus den Meßwerten berechnet.

Rauten = TreF, Quadrate = TreA, Dreiecke = TreA'-TreF1, Kreise = Δss TreA, Kreuze = Δss TreA'-TreF1

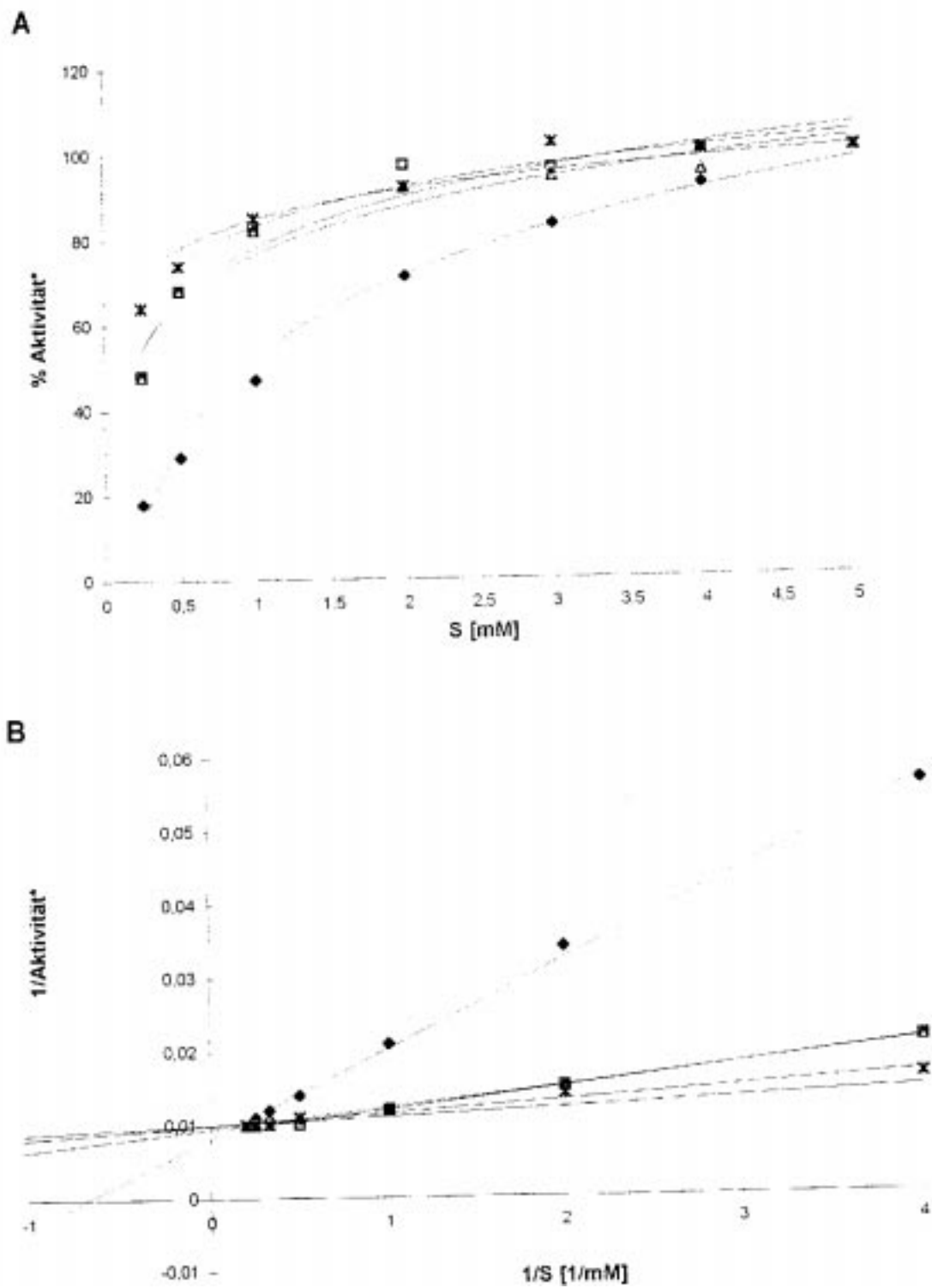


Abb. 5.21.: Substrataffinitäten verschiedener Trehalasen

Tabelle 5.10.: K_m -Werte verschiedener Trehalasen

	K_m -Werte [mM]
TreF	1,49
TreA	0,31
TreA`-`TreF1	0,30
Δ ssTreA	0,16
Δ ssTreA`-`TreF1	0,16

In Tabelle 5.10. sind die K_m -Werte der einzelnen Trehalasen angegeben. Sie wurden nach Lineweaver-Burk durch Auflösen der Gleichungen der Regressionsgeraden aus Abb. 5.21.B. berechnet.

5.2.4. Untersuchung der Translokationseigenschaften der Trehalasen unabhängig von der Signalsequenz

Alle in dieser Arbeit untersuchten Trehalase-Konstrukte werden ins Periplasma transloziert, wenn sie an ihrem N-Terminus eine Signalsequenz tragen. Experimente mit *prlA*-Stämmen haben jedoch gezeigt, daß die Signalsequenz nicht das einzige Merkmal ist, welches periplasmatische von zytoplasmatischen Proteinen unterscheidet. Vielmehr wird vermutet, daß auch Faltungseigenschaften wie z.B. Faltungsgeschwindigkeiten und die Affinität zu verschiedenen Chaperonen die Translokationskompetenz mitbestimmen (siehe Kapitel 3.3.3.).

Inwiefern sich die beiden Trehalasen Δ ssTreA und TreF sowie das Trehalase-Hybrid Δ ssTreA`-`TreF1 hinsichtlich ihren Translokationseigenschaften voneinander unterscheiden, wurde durch kalte osmotische Schocks und Aktivitätstests an intakten und aufgeschlossenen Zellen in Wildtyp- und *prlA4* Stämmen untersucht, die die verschiedenen Trehalasen enthielten.

Mit Hilfe der kalten osmotischen Schocks wurden die löslichen periplasmatischen von den zytoplasmatischen und aggregierten Proteinen sowie den Membranproteinen getrennt. Während mit der Aktivitätsbestimmung an aufgeschlossenen Zellen die Trehalase-Gesamtaktivität ermittelt wurde, sollte an ganzen Zellen die Trehalase-Aktivität im Periplasma bestimmt werden. Die Verwendung der *treB*-Stämme KU101, KU104 und KU105*) sollte gewährleisten, daß Trehalose nicht ins Zytoplasma aufgenommen und folglich auch nicht durch zytoplasmatisch lokalisierte Trehalasen hydrolysiert wurde. Bei Trehalasen, die in beiden Kompartimenten aktiv sind, sollte durch einen Vergleich der Aktivitäten von ganzen und aufgeschlossenen Zellen der Anteil an translozierter Trehalase abgeschätzt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.22. und Tabelle 5.11. dargestellt. Sie werden im Anschluß diskutiert:

*) KU101 = *treA::Spec^R, Δ treRBC, Δ ara714...leu⁺*,
 KU104 = *treA::Spec^R, Δ treRBC, Δ ara714...leu⁺, degP::Tet^R*,
 KU105 = *treA::Spec^R, Δ treRBC, Δ ara714...leu⁺, degP::Tet^R, prlA4...Kan^R*

Tabelle 5.11.: Einfluß der *prlA4*-Mutation auf die Aktivität verschiedener Trehalasen und Trehalase-Konstrukte

	Aktivität ^{a)}			
	KU101 (<i>degP</i> ⁺)		KU104 (<i>degP</i> ⁻)	KU105 (<i>degP</i> ⁻ / <i>prlA4</i>)
	ganze Zellen	Extrakt	ganze Zellen	ganze Zellen
p Δ streA	0,62 +/- 0,11	2,89 +/- 0,05	0,60 +/- 0,12	6,62 +/- 1,73
p Δ streA ⁻ - treF1	0,56 +/- 0,09	6,49 +/- 0,00	0,71 +/- 0,15	0,89 +/- 0,02
pBADtreF	0,53 +/- 0,09	6,64 +/- 0,63	0,50 +/- 0,01	0,64 +/- 0,05
p Δ streA ⁻ -treF	0,39 +/- 0,18	3,60 +/- 0,03	0,31 +/- 0,06	0,80 +/- 0,18
pTre11	3,91 +/- 1,33	2,46 +/- 0,19	3,96 +/- 1,10	3,66 +/- 1,04
ptreA ⁻ -treF1	0,57 +/- 0,14	0,54 +/- 0,08	1,47 +/- 0,16	1,61 +/- 0,04
ohne Plasmid	0,00 +/- 0,00	0,02 +/- 0,00	0,01 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00

Tabelle 5.11. zeigt die Aktivitäten der Plasmid-codierten Trehalasen Δ ssTreA, Δ ssTreA⁻-TreF1, TreF, Δ ssstreA⁻-TreF, TreA und TreA⁻-TreF1, die an intakten Zellen der *treA*::Spec^R, Δ *treRBC* Stämme KU101 (*degP*⁺), KU104 (*degP*⁻) und KU105 (*degP*⁻/*prlA4*) bestimmt wurden. Außerdem sind die Trehalase-Gesamtaktivitäten der KU101-Stämme angegeben, die die verschiedenen Trehalase-codierenden Plasmide enthielten.

Zur Bestimmung der Trehalase-Aktivitäten wurden Übernachtskulturen (LBamp, 28°C^{*}) der jeweiligen Stämme zwei mal mit MMA gewaschen und dann entweder direkt (ganze Zellen) oder nach Aufschluß durch die French Press Zelle (Extrakt) dem Trehalase-Test unterzogen. Die Aktivitäten wurden bei Extrakten zwei, bei ganzen Zellen mindestens drei mal unabhängig voneinander bestimmt.

^{a)}Die aus diesen Messungen gemittelten Werte sind zusammen mit ihren Standardabweichungen in Units pro mg Zellprotein angegeben.

^{*}) Den Übernachtskulturen von Stämmen, die die Plasmide p Δ streA, p Δ streA⁻-treF1, p Δ streA-treF bzw. pBADtreF enthielten, wurde zur Induktion des Arabinose-Promotors 5 μ M Arabinose zugesetzt.

Abb. 5.22. Lokalisation der ohne Signalsequenz exprimierten Trehalasen

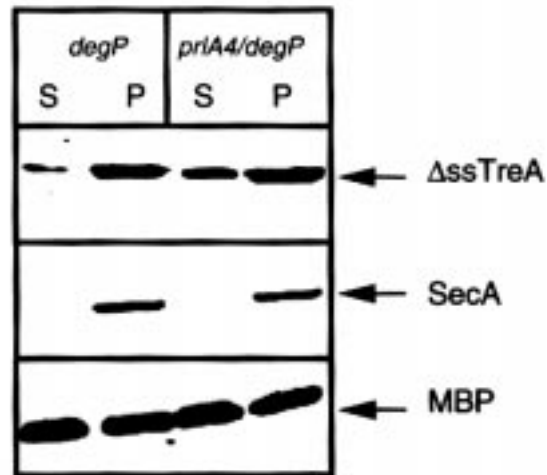
Abb. 5.22. zeigt die durch kalte osmotische Schocks getrennten Fraktionen (lösliche periplasmatische Proteine (Ü) und Sediment (S) von Δ ssTreA (A), Δ ssTreA⁻-TreF1 (B) und TreF (C) in den *treA::Spec^R*, Δ *treRBC* Stämmen KU104 (*degP⁻*) bzw. KU105 (*degP⁻/prlA4*).

Pro Spur wurden Fraktionen aus 2 μ g Ganzzellprotein auf einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % PAA) aufgetrennt (Von KU104 p Δ ssTreA wurden zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Translokationseffizienzen für die Entwicklung mit TreA-Antiserum ~5 μ g Ganzzellprotein aufgetragen.) und auf eine PVDF Membran übertragen. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit TreA- (A und B) und TreF-Antiseren (C).

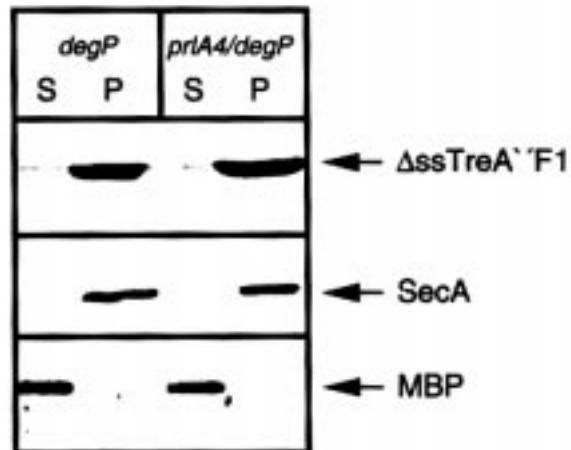
Als Kontrolle für die Qualität der Abtrennung der löslichen periplasmatischen von den restlichen zellulären Proteinen wurden dieselben Proben jeweils auch mit SecA- und MBP-Antiseren im Western Blot analysiert. Die Entwicklung mit dem SecA-Antiserum zeigt, daß in keinem Fall das zytoplasmatische und Membran-assoziierte SecA freigesetzt wurde.

Die Zytoplasmamembran ist also während der Schocks intakt geblieben. Die Anfärbung des löslichen periplasmatischen MBP gibt an, wieviel des gesamten periplasmatischen Proteins jeweils freigesetzt wurde. Die Freisetzungseffizienz war von Experiment zu Experiment verschieden (siehe folgende Seite).

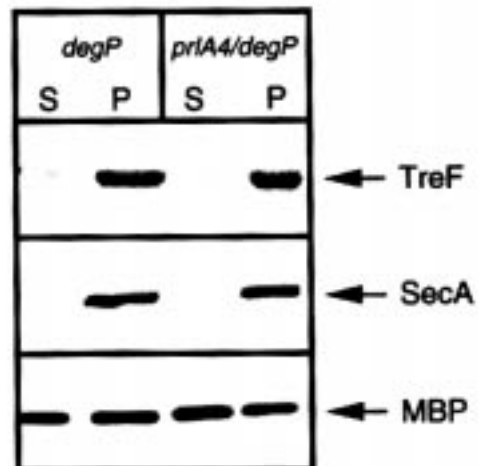
A



B



C



5.2.4.1. Δ ssTreA wird im *prlA4* Stamm transloziert

In KU101p Δ ssTreA wurden ca. 20 % der Trehalase-Gesamtaktivität an ganzen Zellen gemessen. Eine mögliche Erklärung für diese hohe Aktivität wird in den beiden nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

Wie für ein periplasmatisches Protein zu erwarten, veränderte sich die Trehalase-Aktivität in dem *degP*⁻ Stamm KU104p Δ ssTreA mit 0,6 Units pro mg Zellprotein nicht gegenüber der des *degP*⁺ Stammes KU101p Δ ssTreA mit 0,62 Units pro mg Zellprotein. Die Trehalase-Aktivität im Periplasma erhöhte sich jedoch mehr als zehnfach (von 0,6 auf 6,62 Units pro mg Zellprotein), wenn Δ ssTreA in dem *prlA4*-Stamm KU105 exprimiert wurde.

Die Translokation von Δ ssTreA im *prlA4*-Stamm wurde auch im Western Blot von Zellen deutlich, die einem kalten osmotischen Schock unterzogen wurden. Sie erhöhte sich ca. um das fünffache.

Δ ssTreA verhielt sich also wie alle anderen bisher untersuchten periplasmatischen Proteine, die ohne Signalsequenz in einem *prlA*-Stamm exprimiert wurden: Es wurde - wenngleich mit geringer Effizienz als TreA (vergl. Abb. 5.20. und Abb. 5.22.A) - auch ohne die Signalsequenz als Exportsignal transloziert.

Die ganzen Zellen von KU105p Δ ssTreA hatten gegenüber dem Zellextrakt von KU101p Δ ssTreA eine höhere Trehalase-Aktivität. Diese spiegelte sich auch in einer stärkeren Expression von Δ ssTreA, detektierbar im Western Blot, wider (Daten nicht gezeigt). Für Abb. 5.22.A. wurden die Proteinproben zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Menge an transloziertem TreA so aufgetragen, daß die TreA-Mengen im Sediment (S) vergleichbar waren.

5.2.4.2. Δ ssTreA⁻-TreF1 wird im *prlA4* Stamm nicht transloziert

Wird das Hybridprotein TreA⁻-TreF1 mit Signalsequenz exprimiert, dann unterscheidet sich die mittels kalter osmotischer Schocks analysierte Translokationseffizienz nicht signifikant von der von TreA (vergl. Abb. 5.22.B). Wurde das Hybridprotein jedoch ohne Signalsequenz exprimiert, war es in seinem Translokationsverhalten verschieden von TreA. Im Gegensatz zu TreA wurde es im *prlA4* Stamm nicht verstärkt transloziert (Vergl. Abb. 5.22.B und Tabelle 5.11.).

Obwohl vorangegangene Experimente (Kapitel 5.2.3.6.) zeigten, daß Löslichkeit und Stabilität des Hybridproteins im Periplasma eines *degP*⁻ Stammes gegeben sind, so daß transloziertes Protein mit den angewendeten Methoden hätte nachweisbar sein sollen, nahm die Menge an Δ ssTreA⁻-TreF1 in der Periplasmafraktion von Zellen, die einem kalten osmotischen Schock unterzogen wurden, nicht zu (Abb. 5.22.B). Das Trehalase-Hybrid scheint demnach im *prlA4* Stamm nicht effizienter transloziert zu werden als im Wildtypstamm.

Die an ganzen Zellen bestimmte Trehalase-Aktivität war im *prlA4*-Stamm KU105p Δ ssTreA⁻-treF1 mit 0,89 Units gegenüber 0,71 Units pro mg Zellprotein im *secA* Wildtypstamm KU104p Δ ssTreA⁻-treF1 nicht signifikant erhöht. Da gezeigt wurde (siehe Kapitel 5.2.3.7.), daß TreA⁻-TreF1 im Periplasma eines *degP*⁻ Stammes aktiv ist,

bestätigen die Aktivitätstests die Beobachtung, daß *prlA4* keinen Einfluß auf die Translokation von $\Delta_{ss}TreA$ - $\text{'}TreF1$ hat.

Die Aktivität von KU104p $\Delta_{ss}streA$, die an intakten Zellen bestimmt worden war, lag mit 0,71 Units pro mg Zellprotein weit über der Hintergrundsaktivität. Sie ist nicht vernachlässigbar. Selbst im *degP* Wildtypstamm KU101p $\Delta_{ss}streA$ - 'treF1 , in dem periplasmatisch lokalisiertes Hybridprotein weitgehend abgebaut werden sollte, war die Trehalase-Aktivität im Periplasma mit 0,56 Units pro mg Zellprotein verhältnismäßig hoch. Sie betrug ca. 10 % der Trehalase-Gesamtaktivität in diesem Stamm.

Möglicherweise spiegeln die an ganzen Zellen gemessenen Werte nicht ausschließlich die Aktivitäten periplasmatisch lokalisierter Trehalasen wider. Die gemessenen Trehalase-Aktivitäten könnten statt dessen auch auf zytoplasmatische Trehalasen zurückzuführen sein, denen ihr Substrat durch eine unspezifische Aufnahme von Trehalose ins Zytoplasma zugeführt wird. Die folgenden Daten von TreF sprechen für diese Interpretation.

5.2.4.3. Lokalisation von TreF

Wird TreF als Vorläuferprotein synthetisiert, dann wird es ins Periplasma transloziert. Dort wird es durch die periplasmatische Protease DegP abgebaut. Es aggregiert, wenn die Degradation durch das Ausschalten dieser Protease verhindert wird. Lösliches TreF kann nicht nachgewiesen werden. Die Aktivität ist nur sehr gering. (vergl. Kapitel 5.2.1.) Aus den aufgeführten Gründen scheinen die verfügbaren Methoden (kalte osmotische Schocks und Aktivitätstests) nicht geeignet zu sein, um die *prlA4*-abhängige Translokation der zytoplasmatischen Trehalase TreF ins Periplasma zu untersuchen.

Wie zu erwarten, konnte kein TreF in den Periplasma-Fractionen (Ü) von kalten osmotischen Schocks von KU104psstreF (*degP*⁻) und KU105psstreF (*degP*⁻, *prlA4*) (vergl. Abb. 5.22.C) detektiert werden. Auch die Trehalase-Aktivität im Periplasma dieser beiden Stämme unterschieden sich mit 0,71 und 0,89 Units nicht signifikant.

Die Ergebnisse aus Tabelle 5.11. sind jedoch insofern interessant, als sie zeigen, daß ca. 10 % der Trehalase-Gesamtaktivität von KU101pBADtreF an ganzen Zellen gemessen werden kann. Die an ganzen Zellen gemessenen Trehalase-Aktivitäten der *degP*⁺ und *degP*⁻ Stämme KU101pBADtreF bzw. KU104pBADtreF waren mit 0,53 und 0,50 Units pro mg Zellprotein beinahe identisch.

Um diese Ergebnisse zu erklären, müßte TreF im Periplasma in seiner nativen Konformation vorliegen, in der es aktiv und insensitiv gegenüber periplasmatischen Proteasen ist. Da die Polypeptidkette von prozessiertem TreF im *degP*⁺ Stamm abgebaut wird bzw. im *degP*⁻ Stamm aggregiert und in jedem Fall nur geringe Aktivität aufweist, (vergl. Kapitel 5.2.1.), müßte TreF das Periplasma schon als gefaltetes Enzym erreichen. Dies widerspricht dem Dogma, daß gefaltete Proteine nicht transloziert werden können und legt die Vermutung nahe, daß es sich bei der Bestimmung der periplasmatischen Trehalase-Aktivitäten um ein Artefakt handelt.

Daß die hohen Trehalase-Aktivitäten im Periplasma zumindest nicht ausschließlich das Ergebnis mechanischer Beanspruchung der Zellen während des Aktivitätstests waren, zeigten Wachstumstests mit den KU101-Stämmen, ($\Delta treRBC$, $treA::Spec^R$, $\Delta ara...leu^+$), die pBADtreF, p $\Delta sstreA$, p $\Delta sstreA'$ -treF oder auch p $\Delta sstreA'$ -treF1 enthielten. Obwohl diese Stämme durch die Deletion von *treB* keine Trehalose ins Zytoplasma aufnehmen können sollten, wuchsen sie bereits nach einem Tag auf MMA Platten mit Trehalose als einziger Kohlenstoffquelle.

Sowohl die 'periplasmatischen' Aktivitäten, als auch das Wachstum auf Trehalose könnten dadurch erklärt werden, daß Trehalose durch ein nicht identifiziertes Transportsystem ins Zytoplasma geschleust wird. Die Hydrolyse der Trehalose im Zytoplasma würde dann die Aktivität periplasmatisch lokalisierter Trehalase vortäuschen.

5.2.4.4. Die *prlA4*-Mutation hat keinen Einfluß auf die Translokation von Trehalasen, die als Vorläuferproteine synthetisiert werden

prlA4 Stämme begünstigen die Translokation von periplasmatischen Proteinen ohne Signalsequenz (siehe Einleitung). Tabelle 5.11. zeigt, daß die Mutation in SecY die Translokation von Trehalasen, die als Vorläuferproteine synthetisiert werden, weder positiv noch negativ beeinflußt wurden. Die normale Funktion des Sekretionsapparates scheint also durch die *prlA4*-Mutation keine erkennbare Beeinträchtigung zu erfahren.