

6 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Methode der Zirkulardichroismus-Spektroskopie wird in der Biologie vornehmlich angewandt, um Sekundärstrukturgehalte von Proteinen zu berechnen (Winter und Noll, 1998). Beliebte ist die Methode vor allem, weil sie ein Abbild des Faltungszustands des Proteins erlaubt. Auch für diese Arbeit wurden CD-Spektren im kurzwelligen Bereich verwendet. Zum einen, um die Proteinintegrität nach Einführung der zwei Cysteine zu überprüfen (bevor die Strukturen bekannt waren), zum anderen, weil aus vorhergehenden Röntgenstrukturanalysen bekannt war, dass sich die domänenverbindende Helix der 5'-NT zwischen der geschlossenen und der offenen Konformation ändert.

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie kann aber auch Informationen über die Tertiärstruktur eines Proteins geben. Hierbei wird die Probe bei Wellenlängen zwischen 240 und 320 nm vermessen; also in dem Bereich, in dem aromatische Aminosäuren (Phe, Tyr, Trp) gut absorbieren. Diese Absorption hängt nun von der achiralen Umgebung des jeweiligen Aromaten ab. Ändert sich die Umgebung, dann ändert sich auch das absorptive Verhalten des Aromaten. Das Spektrum ist individuell für ein gegebenes Protein und damit sehr sensitiv für Konformationsänderungen. Eine Schwierigkeit besteht hier jedoch darin, dass sich keine verlässlichen quantitativen Aussagen und gar Vorhersagen über die Tertiärstruktur des Proteins machen lassen.

Im Abschnitt 6.1 werden die Ergebnisse des kurzwelligen Bereichs dargestellt, während im Abschnitt 6.2 die Ergebnisse aus dem UV-nahen Wellenlängenbereich zusammengetragen sind.

6.1 5'-NT-Spektren im UV-fernen Bereich

Die Messungen wurden zweimal durchgeführt: Einmal zu Hause und einmal an einer Synchrotronstrahlenquelle (BESSY II, Berlin). Der Vorteil der Synchrotronstrahlung liegt vor allem in einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis, was darin resultiert, dass auch bei kürzerwelligem Licht noch ein gutes Signal erhalten werden kann (Wallace und Janes, 2003). Das war besonders interessant, da α -Helices ein starkes CD-Signal um die 190 nm geben. Da sich die Synchrotron-Messungen ansonsten nicht von den Messungen zu Hause unterscheiden, sind im Folgenden nur die Synchrotronmessungen wiedergegeben.

Es wurde vorher beobachtet, dass sich die offenen von den geschlossenen Kristallstrukturen der 5'-NT dadurch unterscheiden, dass in der geschlossenen Form sich die domänenverbrückende Helix bei den Resten Lys-355, Gly-356 öffnet (Knöfel und Sträter, 2001a). Die Hypothese war, dass dieser Knick in der Helix bei einem sehr guten Spektrum sichtbar werden würde.

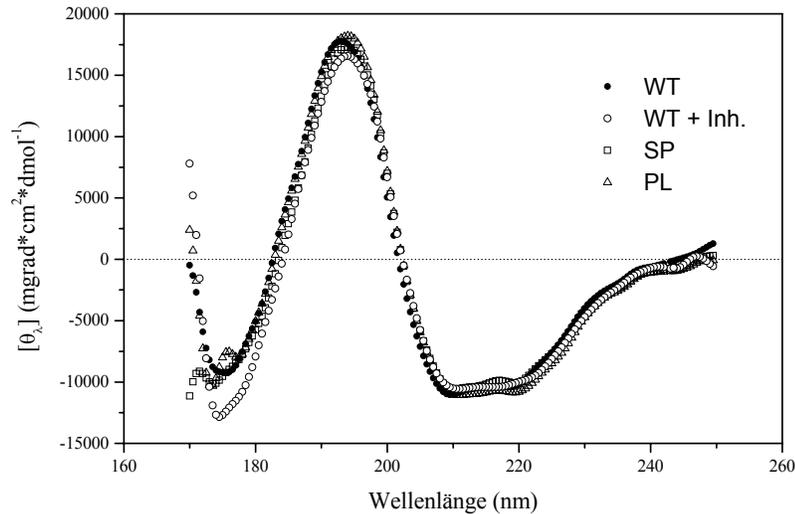


Abbildung 36. CD-Spektren im fernen UV-Bereich. Dargestellt sind die Spektren der beiden disulfidverbrückten 5'-NT-Enzyme (SP und PL) sowie das Wildtyp-Protein (WT). Das Wildtyp-Protein wurde auch in Gegenwart des Inhibitors AMPCP gemessen (WT + Inh.).

Aus Abbildung 36 ist ersichtlich, dass es nicht möglich ist, verschiedene Konformationen der 5'-NT aufgrund des CD-Signals im fernen UV-Bereich zu unterscheiden. Die Spektren überlagern alle exakt, die kleineren Unterschiede sind nicht signifikant. Interessant könnte der Unterschied bei 180 nm sein. Hier verhält sich das Wildtyp-Protein mit Inhibitor deutlich anders als ohne Inhibitor. Leider ist in diesem Bereich das Signal/Rausch-Verhältnis bereits sehr klein, so dass über diesen Unterschied keine verlässlichen Aussagen gemacht werden können. Das Signal in diesem Bereich ist dennoch hier dargestellt, um aufzuzeigen, dass bei weiterem Ausbau des Synchrotron-Strahlrohrs, das dann rauschfreie Messungen bis 165 nm ermöglichen soll (Peter Baumgärtel, persönliche Mitteilung), die Wiederholung der Messung als sinnvoll erscheint.

Das Ergebnis lässt keine Aussage über die Konformation des Proteins in Lösung zu, da es keine Hinweise darauf gibt, dass die kleinen Unterschiede in den Sekundärstrukturelementen, die kristallographisch beobachtet wurden, auch tatsächlich im CD-Signal reflektiert sein müssen. Es kann ebenso gut sein, dass die CD-Spektroskopie nicht sensitiv genug ist, um diese Unterschiede zu detektieren. Auf der anderen Seite kann es auch möglich sein, dass tatsächlich alle Enzyme die Helixstruktur der offenen Konformation in Lösung einnehmen. Auch die Zugabe des Inhibitors ist keine Garantie dafür, dass das Enzym in eine geschlossene Konformation überführt wird, wobei sich die domänenverbrückende Helix öffnet. Es ist auch möglich, dass die Anwesenheit des Inhibitors nur kurzzei-

tig die geschlossene Konformation induziert oder dass beispielsweise die Metallionen für die Schließbewegung notwendig sind.

Das Ergebnis ist jedoch in anderer Hinsicht aussagekräftig. Wie in Abschnitt 2.7.1 ausgeführt wurde, kann mit Hilfe des CD-Spektrums der Sekundärstrukturgehalt des Proteins berechnet werden. In Tabelle 22 ist die Berechnung des Sekundärstrukturgehalts aus den CD-Daten der Berechnung aus den kristallographischen Strukturen (PDB 1ho5 für die geschlossene Konformation, PDB 1hp1 für die offene Konformation) gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass die Daten sehr gut übereinkommen. Dieses Ergebnis bestätigt die frühere Schlussfolgerung, dass die Domänenbewegung als eine „starre Körper“ Bewegung angesehen werden kann, in der keine weiteren Strukturänderungen einbezogen sind.

Tabelle 22. Vergleich des Sekundärstrukturgehaltes. Die Berechnung erfolgte einmal anhand der CD-Daten und einmal anhand der kristallographischen Struktur.

Strukturelement	CD-spektroskopische Daten (%)				Kristallographische Daten (%)	
	WT	WT + Inhibitor	SP	PL	WT (1ho5)	WT (1ush)
α -Helix	28,8	28,1	27,7	29,0	29,5	29,0
β -Faltblatt	21,3	21,2	21,5	21,7	23,5	20,0
Schlaufenbereiche	22,6	23,4	23,1	22,6	22,2	22,3

6.2 5'-NT-Spektren im UV-nahen Bereich

Wie in den Abschnitten 4.2 und 4.3 dargelegt wurde, unterscheiden sich die beiden disulfidverbrückten Proteinmutanten in ihrer Konformation deutlich. Wenn diese Unterschiede auch in Lösung vorliegen, sollte die CD-Spektroskopie sie sichtbar machen können (vgl. Abschnitt 2.7.1). Abbildung 37 zeigt die Spektren des Wildtyp-Proteins und der SP- und PL- Mutanten. Während die Spektren für das Wildtyp-Protein und die SP-Mutante direkt überlagern, zeigt sich für die PL-Mutante ein deutlich unterschiedliches Spektrum.

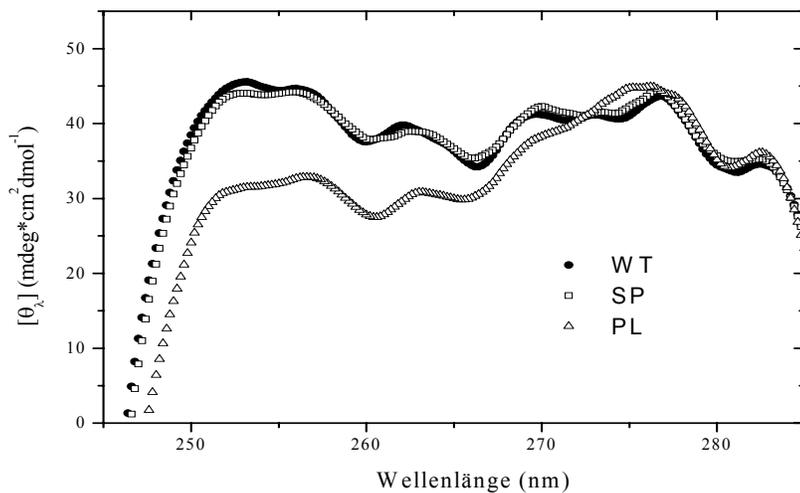


Abbildung 37. CD-Spektren im UV-nahen Bereich. Gezeigt ist das Wildtyp-Protein (WT) und die beiden disulfidverbrückten Mutanten SP (offen) und PL (halb-geschlossen). Aufgetragen ist die Wellenlänge gegen die mittlere molare Elliptizität $[\theta]_{\lambda}$.

Während bei 280 nm die Spektren noch parallel laufen, fällt die Kurve für die PL-Mutante bei 275 nm steil ab bis 260 nm, bevor sie dann zwischen 260 und 250 nm ein Plateau findet. Die Spektren für das Wildtyp-Protein und für die SP-Mutante hingegen fallen bei 275 nm nur leicht ab bis 265 nm, um dann wieder anzusteigen, um dann ein der PL-Mutante ähnliches Plateau zwischen 260 und 250 nm zu bilden. Das Plateau liegt jedoch viel höher ($[\theta]_{\lambda} \approx 45 \text{ mdeg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, verglichen mit der PL Mutante, die dieses Plateau bei ca. $32 \text{ mdeg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ hat). Die Unterschiede liegen also interessanterweise in dem Bereich, in dem die Phenylalanine am stärksten absorbieren. Aus den Kristallstrukturen (Knöfel und Sträter 1999, 2001a, 2001b) ist bekannt, dass die Phenylalanine Phe 429 und Phe 498, die in einer hydrophoben Stapelwechselwirkung den Adenosinring des Substrats bzw. Inhibitors binden, starken Umgebungsveränderungen während der Rotationsbewe-

gung unterliegen. Es ist jedoch fraglich, ob der Beitrag von zwei Resten allein derart unterschiedliche Spektren zur Folge haben kann und die strukturelle Erklärung der Spektren ist mit Sicherheit sehr viel komplexer.

Das Ergebnis der CD-Spektroskopie weist in eindeutiger Weise dem Wildtyp-Protein eine offene Konformation in Lösung zu. Ein identisches Verhältnis der Spektren zueinander wurde auch unter anderen Bedingungen wie etwa mit und ohne Metallionen, anderes Puffersystem (Kakodylat) und Verwendung von Proteinen aus unterschiedlichen Proteinaufreinigungen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das Wildtyp-Protein in Lösung ganz überwiegend in einer offenen Konformation vorliegt, wenngleich die CD-Spektroskopie zwei Aussagen nicht zulässt. 1) Es kann nicht quantitativ bestimmt werden, inwieweit die Konformation der SP-Mutante und des Wildtyp-Proteins in Lösung identisch sind. Es ist möglich, dass kleinere Abweichungen vorhanden sind, die im CD-Spektrum nicht beobachtet werden können. Auch konnte gezeigt werden, dass die SP-Mutante trotz der eingebauten Disulfidbrücke noch erhebliche Flexibilität aufweist (s. Abschnitte 4.3.1.3 und 4.4.2), so dass nicht klar ist, in welcher Konformation sie in Lösung vorliegt. 2) Die Daten lassen sich auch in Hinblick auf ein Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen Form nicht eindeutig interpretieren. Es kann aber festgestellt werden, dass das Wildtyp-Protein ganz überwiegend in einer offenen Konformation, die nicht unbedingt mit der bislang beobachteten am meisten geöffneten Konformation (PDB 1hpu) übereinstimmen muss, vorliegt.

Es ist naheliegend, über Reduktion der eingeführten Disulfidbrücke zu versuchen, die PL-Mutante ebenfalls in die offene Konformation zu überführen. Abbildung 38 zeigt, dass dies nicht vollständig möglich ist. Die Spektren unterscheiden sich zwar deutlich voneinander, die allgemeine Form ist aber unverändert. Der starke Abfall ab 275 nm fällt sehr viel schwächer aus in der reduzierten Form, so dass, ähnlich den Spektren der SP-Mutante und des Wildtyp-Proteins, das Plateau zwischen 250 und 260 nm sehr viel höher liegt ($[\theta_\lambda] \approx 40 \text{ mdeg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ anstelle der üblichen $[\theta_\lambda] \approx 30 \text{ mdeg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) als in der oxidierten Form. Es kann aber nicht sichergestellt werden, dass diese Unterschiede allein auf eine Konformationsänderung des Proteins zurückzuführen sind. Es ist schwer möglich, den Einfluss des DTT auf die Disulfidbrücke durch Kontrollexperimente abzuschätzen. Fügt man DTT dem Wildtyp-Protein in gleicher Konzentration zu, so ändert sich das Spektrum nur unwesentlich (Daten nicht gezeigt), fügt man DTT der SP-Mutante zu (Abbildung 39), so verändert sich das Spektrum ebenfalls nur wenig; es kommt jedoch zu einer erhöhten Absorption im Bereich zwischen 265 und 250 nm. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT allein schon einen Einfluss auf das Spektrum hat. Weil das CD-Signal naturgemäß sehr stark von der Umgebung der Chromophore abhängig ist, lässt es sich nicht abschätzen, welcher Anteil der Signaländerung in dem PL-Enzym auf eine Konformationsänderung und welcher Anteil auf das DTT zurückzuführen ist.

Es ist sehr gut möglich, dass sich die Disulfidbrücke öffnet, das Protein jedoch weiterhin in seiner Bewegungsfreiheit eingeschränkt ist. Dies liegt daran, dass die Disulfidbrücke

zwingenderweise an einer Kontaktstelle der N-terminalen und der C-terminalen Domäne eingebaut werden musste.

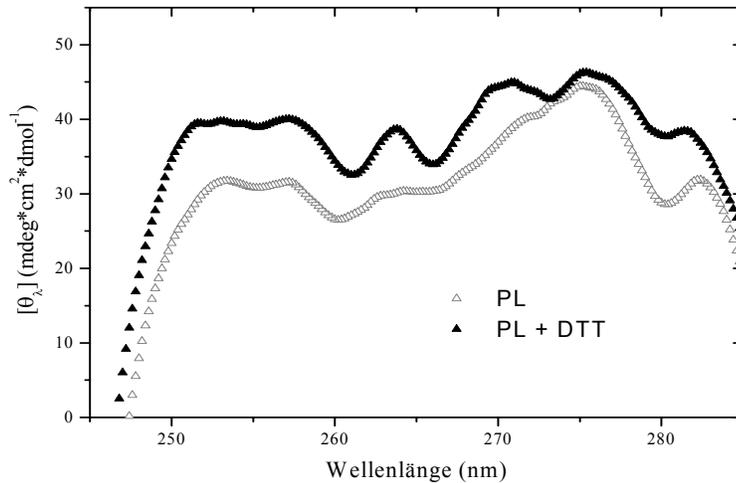


Abbildung 38. CD-Spektren der PL Mutante (PL) im UV-nahen Bereich mit und ohne DTT.

Interessant ist nun, dass sich die Spektren aller Proteine nach Zugabe eines Inhibitors (AMPCP) und in Anwesenheit von DTT als Reduktionsmittel relativ ähnlich sind (Abbildung 40). Auch diese Spektren sind jedoch schwierig zu interpretieren, da die Adenosin-Gruppe sehr stark absorbiert (Absorptionsmaximum bei 259 nm) und es so zu Überlagerungseffekten kommt. Auffällig ist jedoch, dass sich die Form des Spektrums des PL-Enzyms deutlich geändert hat, was bei einer einfachen Addition eines zusätzlichen Signals nicht zu erwarten ist. Namentlich der starke Abfall von 275 bis 260 nm ist vollständig eingeebnet, so dass das Plateau zwischen 260 und 250 nm bei allen drei Proteinformen auf der gleichen Höhe liegt. Der Vergleich mit den anderen beiden Spektren deutet darauf hin, dass diese Verlaufsveränderung des Spektrums nicht allein auf den Inhibitor zurückzuführen sein kann, da die Änderungen bei dem SP und dem Wildtyp-Protein weniger stark sind. Allerdings haben sich auch diese beiden Spektren geändert. Charakteristischerweise lag bei diesen Proteinen das Plateau zwischen 260 und 250 nm höher als die Spitze bei 275 nm, im Spektrum mit DTT und Inhibitor liegt dieses Plateau nun auf gleicher Höhe. Die Spektren mit DTT und Inhibitor lassen sich also nicht eindeutig einer Konformation zuordnen, wenngleich die Unterschiede zu der offenen Konformation (vgl. Abbildung 37 SP und WT) vom Kurvenverlauf her nicht groß sind.

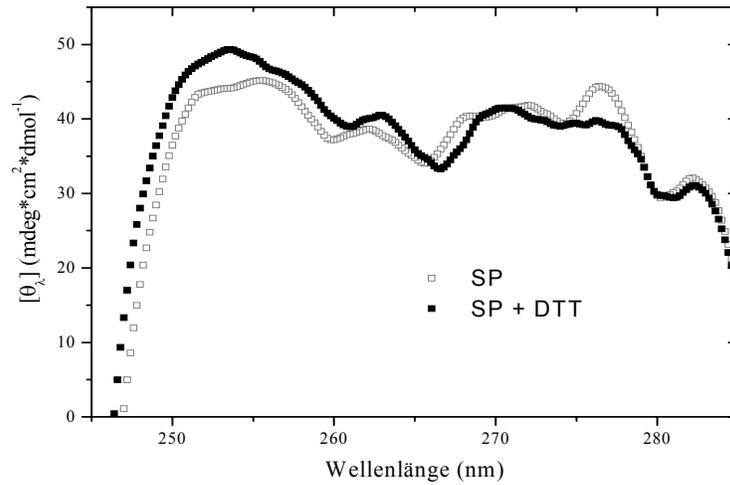


Abbildung 39. CD-Spektren der SP-Mutante im UV-nahen Bereich mit und ohne DTT.

Es ist überraschend, dass sich das Wildtyp-Protein in Anwesenheit des Inhibitors nicht schließt, da die Anbindung des Inhibitors an die Substratbindestelle die Konformationsänderung induzieren sollte. CD-Spektren des Wildtyp-Proteins in Anwesenheit von Metallionen mit Inhibitor und ohne Inhibitor zeigen, dass für den Konformationswechsel die Metallionen notwendig sind (Abbildung 41).

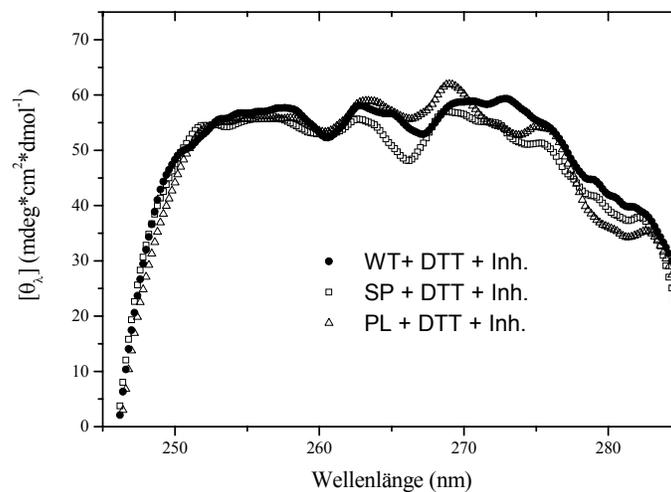


Abbildung 40. CD-Spektren im UV-nahen Bereich mit dem Inhibitor AMPCP, ohne Metallionen.

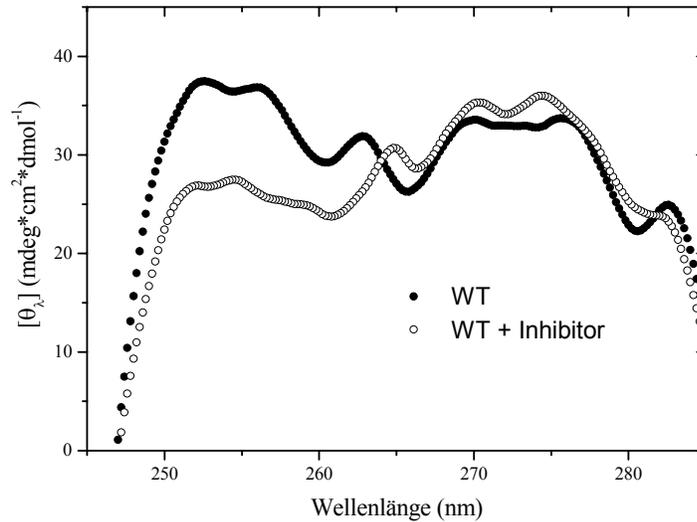


Abbildung 41. CD-Spektren des Wildtyp-Proteins in Anwesenheit von Metallionen und Inhibitor (AMPCP). Das Wildtyp-Spektrum ohne Inhibitor wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf das Spektrum mit Inhibitor skaliert.

Hier nimmt das Wildtyp-Spektrum mit dem Inhibitor AMPCP möglicherweise eine Konformation ähnlich der PL-Mutante an mit dem charakteristischen Abfall des Signals ab 270 nm und dem Erreichen eines Plateaus bei 260 nm. Das Wildtyp-Protein ohne Inhibitor hingegen behält sein übliches Spektrum auch in Anwesenheit von Metallionen bei. Aufgrund der starken Absorption des Inhibitors (die Daten in Abbildung 41 wurden skaliert) kann auch hier erneut nicht gut unterschieden werden zwischen dem Einfluss des Inhibitors, der ein starkes CD-Signal verursacht und dem Einfluss einer Konformationsänderung. Vergleicht man jedoch die Spektren mit Inhibitor mit und ohne Metallionen ist deutlich ein Konformationsunterschied auszumachen. Ein optimales Kontrollexperiment, das den Einfluss der Bindung des Inhibitors vom Konformationseinfluss trennt, etwa durch Bindung des Inhibitors nur an die C-terminale Domäne oder mit Adenosin unter der Annahme, dass das die Konformation nicht verändert, wurde nicht durchgeführt. Es ist auch gar nicht deutlich, ob das möglich ist, das heißt, ob die C-terminale Domäne alleine stabil ist. Unter der Annahme, dass das SP-Protein seine Konformation nicht ändern kann, könnte auch dieses Protein als Kontrolle eingesetzt werden.