

2.3 Generierung und Charakterisierung von Punktmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

2.3.1 Auswahl der Punktmutanten

Ein weiterer Teil dieser Doktorarbeit beschäftigte sich mit funktionellen Aminosäuren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Der Reaktionsmechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist gut untersucht. Im Unterschied zu anderen Epimerasen, etwa der UDP-GlcNAc-4-Epimerase, benötigt die UDP-GlcNAc-2-Epimerase keinen Cofaktor für die katalytische Reaktion. Die Reaktion erfolgt in drei Schritten (Tanner, 2002). Zunächst wird das nicht-azide Proton am C2 durch eine Base abstrahiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Elimination von UDP, bevor schließlich die stereospezifische Re-Addition des Protons an C2 und die Addition von OH⁻ an C1 erfolgen. Als katalytische Base während des De- und Reprotonierungsvorgangs kommen sowohl Aminosäuren mit Carboxylatgruppen als auch Histidine in Frage. Zahlreiche Histidine der UDP-GlcNAc-2-Epimerasedomäne wurden bereits von Effertz *et al.* (1999) mutiert und analysiert. Sie weisen alle einen Totalverlust der Epimeraseaktivität auf, der jedoch auf den Zerfall des funktionellen oligomeren Zustands basiert. Weitere Hinweise auf funktionelle Aminosäuren ergeben sich aus der Kristallstruktur der bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Die Aminosäuren Asp95, Glu117 und Asp131 sind homolog zu den Aminosäuren Asp112, Glu134 und Asp143 des rGNE-Proteins (Campbell *et al.*, 2000) und für die Epimerisierung essentiell (Murkin *et al.*, 2004). Um zu klären, ob diese drei Aminosäuren ähnliche Aufgaben im GNE-Protein der Ratte übernehmen, wurden die Punktmutanten D112N, E134Q und D143N erzeugt, bei denen die zuvor Carboxylatgruppen-tragenden Aminosäuren durch ihre Amidderivate ersetzt wurden (Glu → Gln, Asp → Asn). Des Weiteren postuliert die Kristallstruktur der bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase die Lokalisation Lys24 und His220 im aktiven Zentrum des rGNE-Proteins (Abbildung 2.16). Da His220 bisher noch nicht untersucht wurde, wurde zusätzlich eine H220N-Mutante hergestellt. Schließlich wurde Lys24 zu Alanin mutiert. Unabhängig von der Analyse der Substratbindungstasche wurde die Punktmutante M712T generiert, die neben anderen Punktmutanten als Auslöser der erblichen Einschlusskörperchen-Myopathie HIBM gilt. In Abbildung 2.17 ist die Verteilung der mutierten Aminosäuren innerhalb des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Proteins schematisch dargestellt.

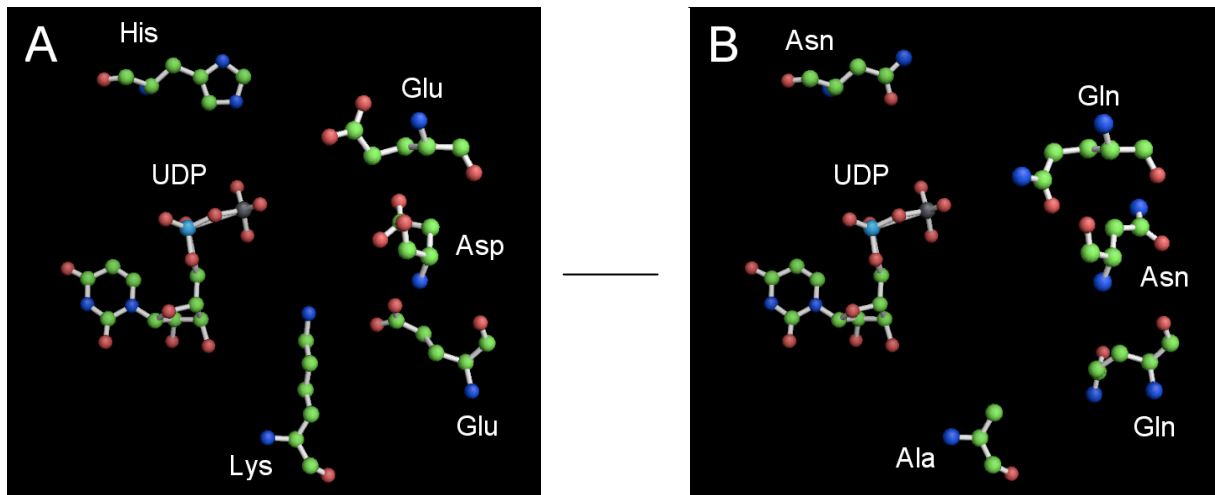


Abbildung 2.16: Dreidimensionales Modell der UDP-GlcNAc-Bindungstasche der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase sowie von den generierten Punktmutationen K24A, D112N, E134Q, D143N und H220N. A: Konfiguration der Aminosäuren, basierend auf der Kristallstruktur der mit UDP kokristallisierten bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase (Campbell *et al.*, 2000). B: Aktives Zentrum mit den mutierten Aminosäuren.

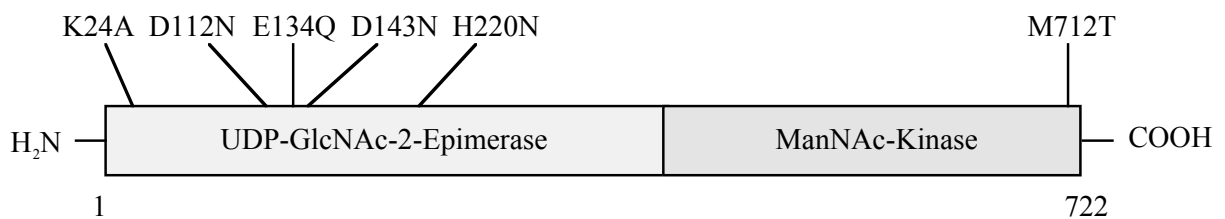


Abbildung 2.17: Schematische Darstellung der Lokalisation der durch Site-Directed-Mutagenese generierten Mutationen in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.

2.3.2 Generierung, Expression und Reinigung der Punktmutanten

Zum Erstellen der DNA-Konstrukte wurde der Site-Directed-Mutagenese-Kit von Stratagene verwandt. Als Template diente der pFASTBACHTA-Vektor mit der cDNA der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenleber. Die 6 Mutanten K24A, D112N, E134Q, D143N, H220N und M712T des His₆-rGNE-Proteins konnten erfolgreich generiert werden. Zur Überprüfung der Konstrukte wurde bei allen das komplette UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen sequenziert, um eventuell auftretende Änderungen in der Nukleotidsequenz auszuschließen. Anschließend wurden die Konstrukte in *E. coli* DH10BAC-Zellen transformiert. Die aus diesen Zellen isolierten, rekombinanten Bacmide wurden zur Transfektion von Insektenzellen eingesetzt, die nach einigen Tagen rekombinante Baculoviruspartikel freisetzen. Die generierten Baculoviren trugen dabei die jeweilige

Punktmutation im UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen. Nach 2-tägiger Inkubation von Sf900-Zellen mit den neu konstruierten Viren konnten analog zur Reinigung des mit einem His₆-Fusionsteil versehenen Wildtyps die mutierten Proteine isoliert werden. Zur Überprüfung der Reinheit der Proteine wurden diese mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 2.18). Der Wildtyp und die Mutanten K24A, D112N, E134Q, D143N, H220N und M712T konnten bis zur Homogenität gereinigt werden. Lediglich E134Q weist eine Doppelbande auf, bei der es sich wahrscheinlich um trunkiertes E134Q-His₆-rGNE-Protein handelt.

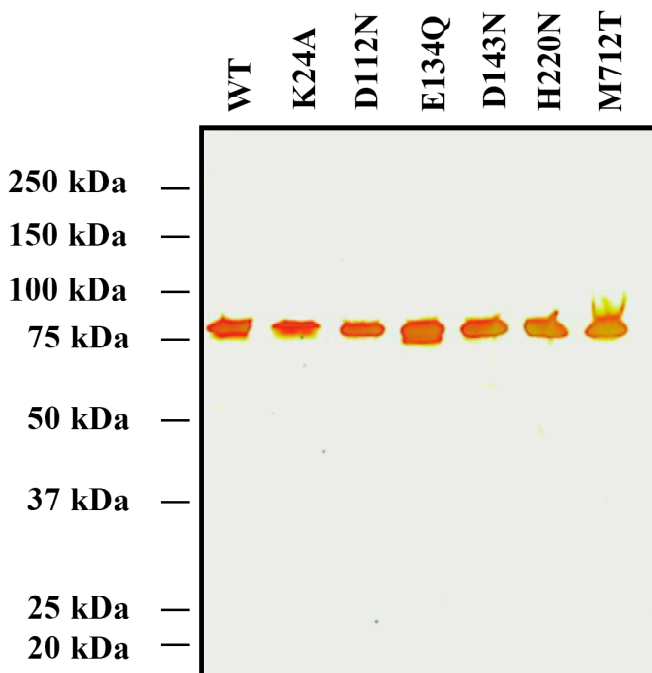


Abbildung 2.18: Gereinigtes Wildtyp-His₆-rGNE-Protein sowie die Mutanten K24A, D112N, E134Q, D143N, H220N und M712T. Die Proteine wurden mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. In jeder Spur des 7,5%-igen SDS-Gels ist jeweils 1 µg Protein aufgetragen.

2.3.3 Enzymatische Aktivitäten der Punktmutanten

Um den Einfluss der Punktmutationen auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase- bzw. ManNAc-Kinase-Aktivität zu charakterisieren, wurden die gereinigten Proteine mit Hilfe des colorimetrischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase- bzw. des gekoppelt-optischen ManNAc-Kinase-Assays analysiert (Abbildung 2.19). Der rekombinant exprimierte Wildtyp besitzt eine Epimeraseaktivität von 950 mU/mg und eine Kinase-Aktivität von 1800 mU/mg. In Bezug zum Wildtyp zeigen die generierten Mutanten keine signifikanten Unterschiede in der Kinase-

Aktivität, die bei ihnen zwischen 1300 (K24A) und 2200 mU/mg (M712T) liegt. Bei der Epimeraseaktivität dagegen sind die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten z.T. beträchtlich, so konnte bei den Punktmutanten D112N, E134Q und D143N keine Epimeraseaktivität nachgewiesen werden. Die Mutante K24A weist einen Aktivitätsverlust von über 90% auf, und H220N besitzt eine um etwa 50% reduzierte Epimeraseaktivität. Die HIBM-Mutante M712T zeigt eine um etwa 25% verringerte Epimeraseaktivität.

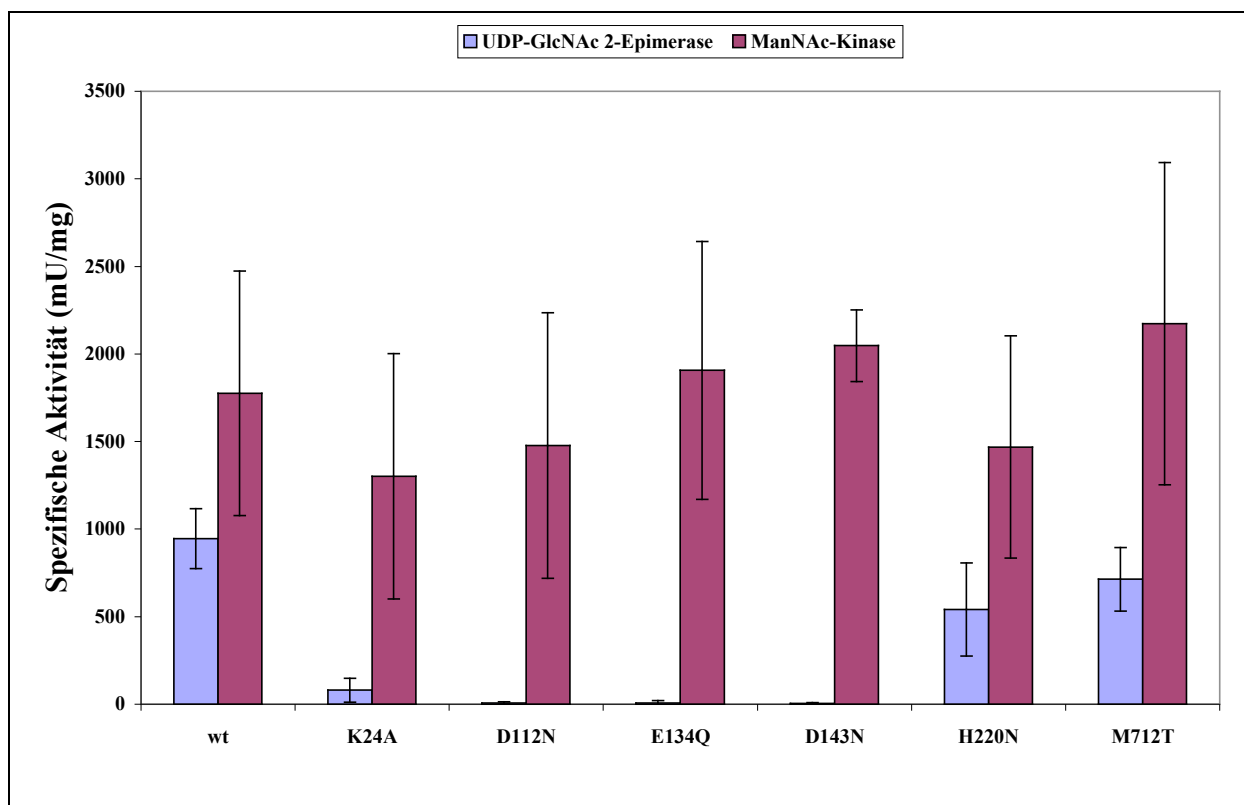


Abbildung 2.19: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Aktivitäten des His₆-rGNE-Wildtyp und seiner Punktmutanten K24A, D112N, E134Q, D143N, H220N und M712T. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten.

2.3.4 Bestimmung der Enzymkinetiken der Punktmutanten

Weiterführend wurden die Kinetiken der Enzymreaktionen mittels des gekoppelt-optischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase- bzw. ManNAc-Kinase-Assays ermittelt (Tab. 2.7). Das rekombinante Wildtypenzym besitzt für UDP-GlcNAc einen K_M -Wert von 86 μM , der im Vergleich zum bereits charakterisierten Rattenleberenzym fast 8-mal höher liegt (Hinderlich *et al.*, 1997). Bei den Mutanten D112N, E134Q und D143N konnten aufgrund des Totalverlustes der Epimerase-Aktivität keine K_M -Werte ermittelt werden. Die UDP-GlcNAc-

K_M -Werte für die Mutanten K24A und H220N zeigen eine 61% bzw. 36%ige Erhöhung gegenüber des K_M -Wertes für den Wildtyp. Der K_M -Wert der HIBM-Mutante M712T liegt mit 69 μ M im Bereich des Wildtyps.

Die K_M -Werte für ManNAc und ATP liegen beim rekombinanten Wildtypprotein mit 59 μ M und 2 mM in etwa im Bereich des aus Rattenleber isolierten Proteins (Hinderlich *et al.*, 1997). Die K_M -Werte der Mutanten für ATP bewegen sich alle um den ermittelten Wert des rekombinanten Wildtyps (1,8-2,8 mM), während die K_M -Werte für ManNAc deutlichere Unterschiede zeigen. So sind die K_M -Werte der Mutanten D112N und E134Q um mehr als die Hälfte gegenüber dem rekombinanten Wildtyp reduziert. Die HIBM-Mutante M712T weist zum nativen Wildtyp auch beim ManNAc- K_M -Wert keinen wesentlichen Unterschied auf.

Tabelle 2.7: K_M -Werte der Wildtyp-His₆-rGNE sowie der Mutanten K24A, D112N, E134Q, D143N, H220N und M712T. Die kinetischen Daten wurden nach 3.4.7.3 bzw. 3.4.8.1 ermittelt.

| | K_M | | |
|----------------|--------------------------|----------------------|---------------|
| | UDP-GlcNAc (μ M) | ManNAc (μ M) | ATP (mM) |
| Wildtyp | 86 \pm 16 | 59 \pm 15 | 2,0 \pm 0,1 |
| K24A | 139 \pm 49 | 47 \pm 25 | 2,8 \pm 0,9 |
| D112N | n.d. | 21 \pm 6 | 2,5 \pm 0,3 |
| E134Q | n.d. | 29 \pm 8 | 1,8 \pm 0,3 |
| D143N | n.d. | 74 \pm 30 | 2,2 \pm 0,9 |
| H220N | 117 \pm 38 | 40 \pm 22 | 2,0 \pm 0,7 |

n.d nicht detektierbar

2.3.5 Gelfiltrationsanalyse der rGNE-Punktmutanten

Das Einführen einer Punktmutation in das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Enzym kann neben den Enzymaktivitäten auch den oligomeren Zustand des Proteins beeinflussen (Tab. 2.8). Bei den Punktmutanten K24A, D143N, H220N und M712T lag das Protein wie beim Wildtyp vorwiegend als Tetramer vor (Subpopulation Nr. 3). Die Mutante K24A zeigte im Elutionsprofil, wie schon bei den StrepII-rGNE-Konstrukten beobachtet (Abbildung 2.12), neben der Tetramersubpopulation Nr. 3 noch zwei weitere Absorptionsmaxima (Subpopulation Nr. 2 und Nr. 4), die einem Molekulargewicht von 215

bzw. über 1000 kDa entsprechen. Die Quotienten aus den ermittelten Molekulargewichten und dem berechneten Molekulargewicht eines Monomers ergaben 2,5 und über 15. Bei der Subpopulation Nr. 4 handelt es sich um Aggregate, während die Subpopulation Nr. 2 rechnerisch sowohl Di- als auch Trimere sein könnten. Aus Assemblierungsgründen erscheint jedoch ein Trimer als unwahrscheinlich. Die Mutanten D112N und E134Q liegen zum einen aggregiert vor (Subpopulation Nr. 4), des Weiteren bilden sie wie K24A wahrscheinlich Dimere (Subpopulation Nr. 2). Der Quotient aus den ermittelten Molekulargewichten der Subpopulation Nr. 2 und dem berechneten Molekulargewicht eines Monomers liegt bei 1,5 bzw. 1,8. Im Elutionsprofil der Mutante E134Q wurde weiterhin noch ein Absorptionsmaximum gemessen (Subpopulation Nr. 1), das mit einer berechneten Größe von 97 kDa der Größe eines Monomers (85,4 kDa) sehr nahe kommt.

Tabelle 2.8: Molekulargewichte und oligomerer Zustand des Wildtyps und der sechs Punktmutanten

| | Subpopulationen: $M_{W \text{ gemessen}}$ in kDa | | | Quotient aus $M_{W \text{ gemessen}} / M_{W \text{ mono}}$ | | |
|----------------|---|-----------------------------|-----------------------------|---|----------------------------|----------------------------|
| | Subpopu- lation Nr.1 und Nr. 2 | Sub- population Nr. 3 | Sub- population Nr. 4 | Subpopu- lation Nr.1 und Nr. 2 | Sub- population Nr.3 | Sub- population Nr.4 |
| Wildtyp | — | 345 | — | — | 4,0 | — |
| K24A | 215 | 306 | >1000 | 2,5 | 3,6 | >15 |
| D112N | 125 | — | >1000 | 1,5 | — | >15 |
| E134Q | 97/153 | — | >1000 | 1,1/1,8 | — | >15 |
| D143N | — | 390 | — | — | 4,5 | — |
| H220N | — | 333 | — | — | 3,9 | — |
| M712T | — | 320 | — | — | 3,7 | — |