

2.4 Strukturanalyse des GNE-Proteins

Zur Analyse der Sekundär bzw. Tertiärstruktur der GNE wurden die CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie (2.4.1 bzw. 2.4.3) eingesetzt. Des Weiteren wurden zur Klärung der rGNE-Proteinstruktur bioinformatische (2.4.2), elektronenmikroskopische (2.4.4) und kristallographische Methoden (2.4.5) angewandt.

2.4.1 CD-Spektroskopie des His₆-rGNE-Wildtyps und der HIBM-Mutanten

Die erbliche Einschlusskörperchen-Myopathie HIBM wird durch eine Reihe verschiedener Punktmutationen ausgelöst. Da die HIBM-Punktmutationen die Enzymaktivität beeinflussen, sollen diese mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht werden. Durch diese Methode können die Sekundärstrukturanteile eines Proteins in Lösung berechnet werden. Gravierende Änderungen in den Anteilen zwischen dem His₆-rGNE-Wildtyp und einzelnen Punktmutanten geben Aufschluss, ob es sich bei den mutierten Aminosäuren um Struktur gebende Bereiche des Proteins handelt. Es wurden 7 verschiedene HIBM-Mutanten mit dem Wildtyp verglichen. Des Weiteren wurde die funktionelle Punktmutante D143N mittels der CD-Spektroskopie untersucht, die als einzige funktionelle Mutante trotz des einheitlich tetrameren Zustands einen Totalverlust der Epimerase-Aktivität aufweist. Die Sekundärstrukturanteile wurden mit der Software CDPro berechnet, welche auf 43 Referenzspektren löslicher Proteine basiert, deren Sekundärstrukturen bekannt sind. Für den rGNE-Wildtyp wurde ein α -Helix-Anteil von 33% und ein β -Faltblatt-Anteil von 17% ermittelt, die damit ungefähr den Sekundärstrukturanteilen der bioinformatischen Vorhersage entsprechen (37% α -Helix und 15% β -Faltblatt; siehe 2.4.2). Änderungen der einzelnen Sekundärstrukturen von 5 bis 10% sind als niedrig signifikant definiert, eine hohe Signifikanz gilt bei Änderungen von über 10%. In Tabelle 2.9 sind die mittels CD-Spektroskopie berechneten Sekundärstrukturanteile vom Wildtyp und von den Mutanten aufgelistet. Die HIBM-Mutanten I200F, C303V, D378Y und F528C zeigten leichte, jedoch keine signifikanten Änderungen der α -Helix-Anteile im Vergleich zum Wildtyp. Über 10% Differenz zu einem Wildtyp-Sekundärstrukturanteil besaß lediglich die HIBM-Mutante N519S, die einen α -Helix-Anteil von nur 15% und einen β -Faltblatt-Anteil von 31% aufwies.

Tabelle 2.9: Sekundärstrukturanteile des His₆-hGNE-Wildtyps, der funktionellen Mutante D143N, und 7 weiterer HIBM-Mutanten. Die Ermittlung erfolgte über CD-Spektroskopie. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile basiert auf 43 Referenzspektren löslicher Proteine und wurde mit der CDPro-Software durchgeführt.

	α -Helix	β -Faltblatt	β -Turn	Random Coil
WT	33%	17%	21%	29%
D143N	29%	21%	21%	29%
I200F	37%	16%	19%	28%
C303V	29%	19%	23%	29%
D378Y	27%	23%	21%	29%
N519S	15%	31%	22%	32%
F528C	40%	13%	20%	27%
A631Y	28%	20%	24%	28%
M712T	32%	19%	22%	27%

2.4.2 Sekundärstrukturvorhersage des rGNE-Proteins mittels bioinformatischer Methoden

Zur weiteren Strukturanalyse des rGNE-Wildtyps wurde die Jnet-Software angewandt, die aus der Proteinprimärstruktur Vorhersagen über die Sekundärstruktur berechnen kann. Die mittels CD-Spektroskopie gewonnenen prozentualen Sekundärstrukturanteile des His₆-rGNE-Wildtyps entsprechen annähernd den theoretisch berechneten Anteilen, nämlich 37% α -Helix und 15% β -Faltblatt. Grundlage der Berechnung ist die Eigenschaft der Sekundärstrukturelemente charakteristische Aminosäurefolgen aufzuweisen. Zur Überprüfung der Vorhersagequalität wurde parallel dazu auch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase von *E. coli* analysiert, deren Struktur bereits aufgeklärt ist (Campbell *et al.*, 2000). In Abbildung 2.21 sind die vorhergesagte Sekundärstruktur des rGNE-Proteins sowie die tatsächliche und vorhergesagte Sekundärstruktur der bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase (bGNE) dargestellt.

		1	b1	a1	b2	50
Vorhersage	rGNE	MEKNGN	NRKLRVCVAT	CNRADYSK	LAPIMFGIK	TEPAFFELDVVVLGSHL
Kristallstruktur	bGNE		MKVLTVF	GTRPEAIK	MAPLVHALAK	DPF.FEAKVCVTAQHR
Vorhersage	bGNE		MKVLTVF	GTRPEAIK	MAPLVHALAK	DPF.FEAKVCVTAQHR
Oberflächenvorhersage		B--BBB--	B-B-BBBB	BBBBBBBBBBBBBB	BBB-BB--	--BBBBBBBBBBBB
		51	a2	b3	a4	100
Vorhersage	rGNE	IDDYGN	TYRMIEQDD	FDINTRL	HITIVRGEDEA	AMVESVGLALVKLPDVLN
Kristallstruktur	bGNE	EMLDQV	LKLF	SIVPDY	DLNI.....	MQPGQLTEITCRILEGLKPILA
Vorhersage	bGNE	EMLDQV	LKLF	SIVPDY	DLNI.....	MQPGQLTEITCRILEGLKPILA
Oberflächenvorhersage		B--B--	BB-BBB	BBBBBBBBBBBBBB	BBB-BB--	BB-BB--BBB-BBBBBB
		101	b4	a4	b5	145
Vorhersage	rGNE	RLKPD	IMIVHGDR	FDALALATS	SAALMNIRILHI	EGGE....VSGTIDDS
Kristallstruktur	bGNE	EFK	PDVVLVHGD	TTTLATS	LAAFYQRIPVGHV	EAGLRTGDLYSPWPEEA
Vorhersage	bGNE	EFK	PDVVLVHGD	TTTLATS	LAAFYQRIPVGHV	EAGLRTGDLYSPWPEEA
Oberflächenvorhersage		-BB--	BBBBB	-BBB	BBBBBBBBBB	--BBBB-BB--BB....BBBB-BBB

Ergebnisse

		146	a5	b6	a6	b7	a7	195
Vorhersage	rGNE	IRHAI	TKLA	HYHVCC	TRSAEQHLISM	CEDHDRILLA	GCPS	YDKLLSAKNK
Kristallstruktur	bGNE	NRTL	TGHLAMYHFSPT	TETSRQNL	LRRENVADSRIFITGN	TVIDALLWVRDQ		
Vorhersage	bGNE	NRTL	TGHLAMYHFSPT	TETSRQNL	LRRENVADSRIFITGN	TVIDALLWVRDQ		
Oberflächenvorhersage		BBBBB	--B	BBBBB	B	--BBB	--B	BBBBB
		196	a8	b8	a9	240		
Vorhersage	rGNE	DYMSIIRMWL	GDDV	...KCKDYIVALQ	HPVTTDIKHS	IKMFELTLDAL		
Kristallstruktur	bGNE	VMS	SKLRSELAAN	YFPIDPDK	KMILVTGHRRESF	GRGFEEI	CHALADIA	
Vorhersage	bGNE	VMS	SKLRSELAAN	YFPIDPDK	KMILVTGHRRESF	GRGFEEI	CHALADIA	
Oberflächenvorhersage		-B	-B	BBB	-B	BBB	...	BBBBB
		241	b9	a10	b10	a11	290	
Vorhersage	rGNE	ISFNKRT	LVLFPN	IDAGSKE	MVRVMRKKG	IEHHPN	FRAVKHVP	FDQFIQL
Kristallstruktur	bGNE	TTH	.QDIQIVYPVHLNP	...NVREP	VNRILGHVKNVILI	DPQ	EYLPFVWL	
Vorhersage	bGNE	TTH	.QDIQIVYPVHLNP	...NVREP	VNRILGHVKNVILI	DPQ	EYLPFVWL	
Oberflächenvorhersage		B	--B	B	BBBBB	BB	--B	BBB
		291	b11	a12	b12	a13	b13	337
Vorhersage	rGNE	VAHAG	CMIGNSSCG	VRE	VGAFGTP	VINL	G...TRQIG	RETGENVLHVRDA
Kristallstruktur	bGNE	MNH	AWLILTD	SGGIQEEA	P	SLGKPVLM	RD	TTERPEAVT
Vorhersage	bGNE	MNH	AWLILTD	SGGIQEEA	P	SLGKPVLM	RD	TTERPEAVT
Oberflächenvorhersage		BBB	-B	BBB	BB	BBB	BB	BBB
		338	a14	a15	a16	384		
Vorhersage	rGNE	DTQDKILQALH	..LQFGK	QYPCSKIYGDGNA	VPRILKFLKSIDLQ	EPLQ		
Kristallstruktur	bGNE	QRIVEE	VTRLLK	DENEYQAM	SRAHNPYGDG	OACSRILEALKNNRISL		
Vorhersage	bGNE	QRIVEE	VTRLLK	DENEYQAM	SRAHNPYGDG	OACSRILEALKNNRISL		
Oberflächenvorhersage		-BBBBB	-BB	...	-BB	-B	-BBB	-B
		385				434		
Vorhersage	rGNE	KKFCFP	PKENIS	QDI	DHILETL	SALAVD	LG	GTNLRVAIVSMKGEIVK
Oberflächenvorhersage		-B	----	B	--BB	-BB	-BB	----
		435				484		
Vorhersage	rGNE	TQFNPK	TYEER	ISLILQMC	VEAAEA	VKLNCRIL	GVGIST	GGRVNPQEGV
Oberflächenvorhersage		-B	----	B	-BBB	-BB	-BBBB	-B
		485				534		
Vorhersage	rGNE	VLH	STKLIQ	EWN	SVDLR	TPLSDT	LHLF	VWVDND
Oberflächenvorhersage		BBB	-BB	--BB	-BB	-BB	-BB	----
		535				584		
Vorhersage	rGNE	ENFVTLIT	GTGIG	GGIIHQ	HEL	IHGSSFCAAE	L	GHLVV
Oberflächenvorhersage		BBBBB	BBBBB	BBBBB	BB	--BB	----	BBB
		585				634		
Vorhersage	rGNE	GCIEAYA	SGMALQ	REAKKLH	DEDLLLV	EGMSVPKDEAV	GALHLIQA	AKLIG
Oberflächenvorhersage		BB	BBBBB	BBBBB	BB	----	BBB	----
		635				684		
Vorhersage	rGNE	NVKAQ	SILRTAG	TALGLGV	VNILH	TMNPS	LVIL	SGVLA
Oberflächenvorhersage		--	BBBBB	BBBBB	BBBBB	BBBBB	BB	----
		685				722		
Vorhersage	rGNE	QALSSV	QDV	DVVV	SDLVDP	ALLGAAS	MVLDY	TTR
Oberflächenvorhersage		-BB	--BB	-B	BBBBB	BBBBB	BB	----

Abbildung 2.21: Vorhersage der Sekundärstruktur und der im Proteinkern lokalisierten Aminosäuren von rGNE-Proteins. Zur qualitativen Analyse der rGNE-Sekundärstrukturvorhersage wurde zusätzlich die Sekundärstruktur der homologen bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase (bGNE) vorhergesagt, die aus der Kristallstruktur bereits bekannt ist. Die Sekundärstrukturen wurden mit der Jnet-Vorhersage-Software berechnet. Vorhergesagte bzw. aus der Kristallstruktur ermittelte α -Helices sind rot gekennzeichnet, β -Faltblätter sind türkis markiert. Hervorgehoben sind Aminosäuren, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 75% (B = buried) bzw. über 95% (**B**) nicht an der Proteinoberfläche lokalisiert sind. Grün gekennzeichnet sind die bisher bekannten HIBM-Mutanten. Die von Campbell *et al.* (2000) eingeführte Nummerierung der Sekundärstrukturen der bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist oberhalb des jeweiligen Sequenzbereichs aufgeführt.

2.4.3 Fluoreszenzspektroskopie des His₆-rGNE-Wildtyps und zweier HIBM-Mutanten

Informationen über die Veränderung der Tertiärstruktur eines Proteins können mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie gewonnen werden. Dabei wird die Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan genutzt, die nach Anregung mit 280 nm langwelligem Licht maximal bei einer Wellenlänge von 355 nm fluoresziert. Da die Polarität der Umgebung eines Tryptophanrestes die Wellenlänge seines Fluoreszenz-Maximums beeinflusst, lassen sich Rückschlüsse über die räumliche Umgebung der analysierten Tryptophanreste machen. Untersucht wurden der Wildtyp und die zwei HIBM-Mutanten I587T und M712T. Ein Ausschnitt der drei Fluoreszenz-Spektren ist in Abbildung 2.20 dargestellt. Der Wildtyp und die Mutante M712T hatten beide ihr Fluoreszenz-Maximum bei 335,3 nm, während die Mutante I587T ihr Maximum bei einer Wellenlänge von 333,7 nm erreichte. Die detektierte Blauverschiebung des Maximums um 1,6 nm ist jedoch nicht signifikant.

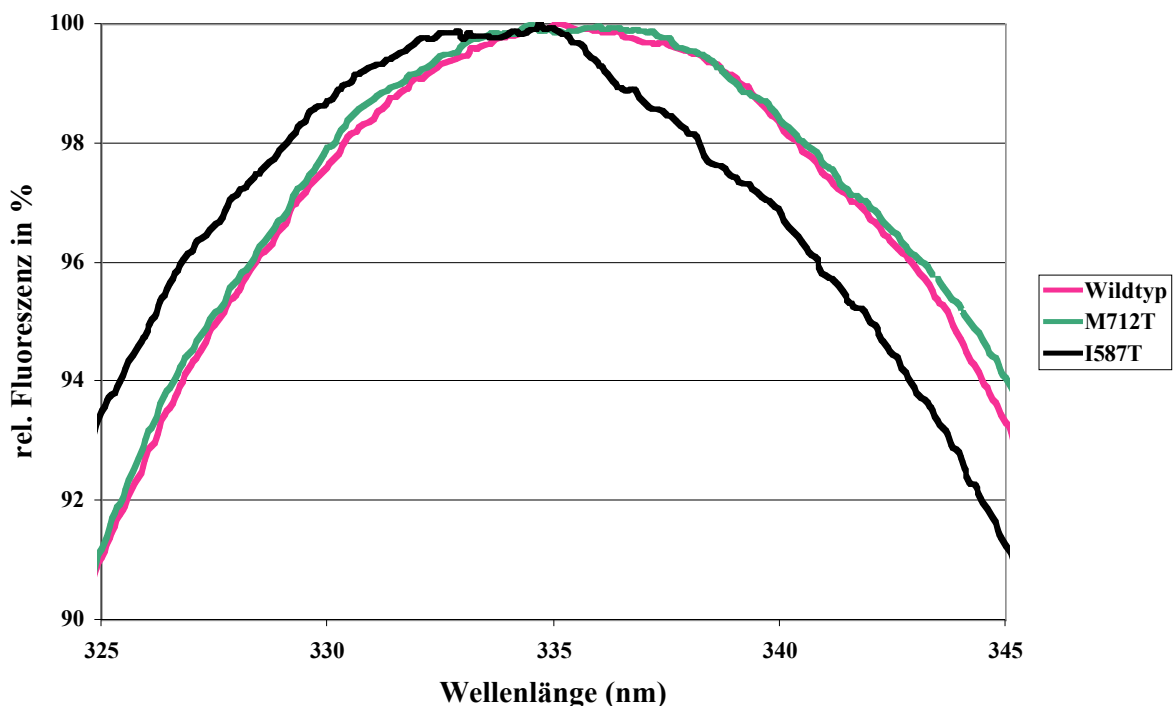


Abbildung 2.20: Ausschnitt der Trp-Fluoreszenz-Spektren des His₆-hGNE-Proteins sowie der HIBM-Mutanten I587T und M712T. Angeregt wurde die Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 295 nm. Die jeweiligen Fluoreszenz-Maxima wurden gleich 100% gesetzt.

2.4.4 Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie des His₆-rGNE-Fusionsproteins

Mit Hilfe der Technik der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie kann von einer gereinigten Proteinlösung die Proteinpartikelgröße bestimmt oder durch Einzelpartikelanalyse die dreidimensionale Struktur eines Proteins im einstelligen nm-Bereich geklärt werden. Voraussetzung für die Strukturaufklärung ist eine monomodale Proteinlösung. Hierfür wurde gereinigtes His₆-rGNE-Protein über eine Gelfiltrationssäule gegeben und lediglich der Tetramerpeak innerhalb von 15 min für die TEM-Experimente eingesetzt. Für die Messungen wurde die Probe mit 2% Phosphowolframat (PTA) negativ gefärbt. In Abbildung 2.22 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme mit einer 270000-fachen Vergrößerung dargestellt.

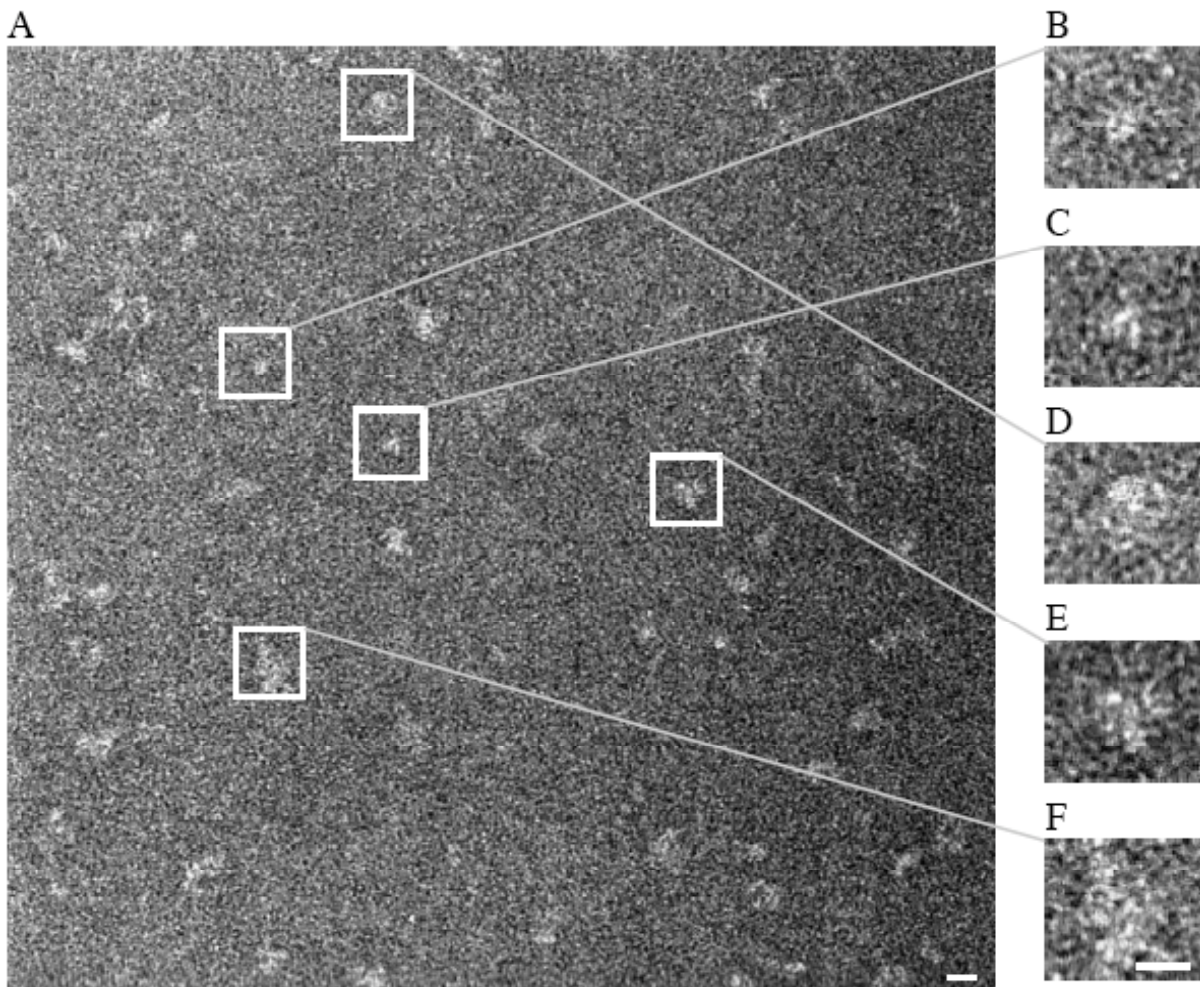


Abbildung 2.22: Ausschnitt einer cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahme des gereinigten His₆-rGNE-Proteins. A: 270000-fache Vergrößerung. Einzelne Proteine sind wegen der Negativfärbung mit 2% PTA als helle Flecken in der Elektronendichteverteilung zu erkennen. B-F: 540000-fache Vergrößerung. Auswahl verschieden großer Partikel. B und C: Partikel mit einem Durchmesser von unter 10 nm. D und E: Partikel mit einem Durchmesser von etwa 15 nm, F: Partikel mit einem Durchmesser von über 20 nm. Die weißen Balken unten rechts entsprechen 10 nm.

Trotz des Einsatzes von offensichtlich tetramerem His₆-rGNE-Protein besaß die visualisierte Proteinpoptulation einen polymorphen Charakter. Es wurden verschieden große Partikel detektiert, die nicht allein auf die Orientierung der Partikel im Raum zurückzuführen sind. Die Einzelpartikeldurchmesser schwanken dabei von unter 10 bis 30 nm, wobei drei Einzelpartikelsubpopulationen wiederholt beobachtet werden konnten. Subpopulation Nr. 1 (Abb. 2.22, B und C) weist einen Durchmesser von etwa 7 nm auf, Subpopulation Nr. 2 (Abb. 2.22, D und E) hat einen Einzelpartikeldurchmesser von etwa 15 nm und Subpopulation Nr. 3 (Abb. 2.22, F) von über 20 nm. Nimmt man für die Kryo-TEM eine globuläre Struktur des His₆-rGNE-Proteins an, müsste der Durchmesser eines Tetramers mit einem ermittelten Stokes-Radius von 7,1 nm (siehe 2.2.1) bei etwa 14 nm liegen. Tatsächlich weisen die 15 nm-Partikel eine globuläre Struktur auf. Die 7 nm-Partikel wären demnach kleinere oligomere Zustände des rGNE-Proteins, die über 20 nm großen Partikel Aggregate. Aufgrund der Oligomodalität der Proteingrößen war die Einzelpartikelanalyse zur Strukturaufklärung nicht möglich.

2.4.5 Kristallisations-Screening des gereinigten His₆-rGNE-Fusionsproteins

Trotz der Oligomodalität des rGNE-Proteins, die durch analytische Ultrazentrifugation, DLS und TEM nachweisbar war, wurden Kristallisations-Screenings angesetzt. Gereinigtes His₆-rGNE-Protein mit einer Konzentration von 4 mg/ml in 20 mM HEPES, 1 mM DTT, pH 7,5, diente als Proteinlösung für die Kristallisations-Screenings. Das Screening wurde im Hanging-Drop-Verfahren mit vier verschiedenen Kristallisations-Screening-Kits (Hampton, USA), welche aus jeweils 48 unterschiedlichen Kristallisations-Puffern bestehen, bei 25°C durchgeführt. Damit wurden insgesamt 192 Pufferbedingungen getestet. Bei allen Kristallisationsansätzen bildeten sich innerhalb weniger Minuten Präzipitate, die keinerlei kristalline Strukturen aufwiesen. Kristalle oder Kristall-ähnliche Partikel konnten nicht identifiziert werden.