

**Kristallisation von GGA-Proteinen
und röntgenkristallographische Untersuchungen
am C_α-Formylglycin Generierenden Enzym**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Dirk Röser
aus Hildburghausen

Göttingen 2006

D7

Referent: Prof. Dr. Ralf Ficner

Korreferent: Prof. Dr. Oliver Einsle

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2006

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abkürzungsverzeichnis	6
A KRISTALLISATION VON GGA-PROTEINEN	8
A.1 Einleitung	8
A.1.1 GGA-Proteine	9
A.1.2 Funktion und Struktur der GGA-Domänen	10
A.1.2.1 VHS-Domäne	10
A.1.2.2 GAT-Domäne	12
A.1.2.3 GAE-Domäne	13
A.1.2.4 Hinge-Region	14
A.1.3 Modell der GGA-Protein Funktion	15
A.1.4 Zielsetzung	17
A.2 Material und Methoden	19
A.2.1 Material	19
A.2.1.1 Chemikalien	19
A.2.1.2 Oligonukleotide	19
A.2.1.3 Bakterienstämme und Insektenzellen	20
A.2.1.4 Kulturmedien	20
A.2.2 Allgemeine mikrobiologische, molekularbiologische und proteinchemische Methoden	21
A.2.2.1 Übertragung von DNS in <i>E. coli</i> (Transformation)	21
A.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	21
A.2.2.3 Reinigung von PCR-Fragmenten	21
A.2.2.4 Bestimmung der DNS-Konzentration und Reinheit	22
A.2.2.5 Konzentration von DNS durch Ethanol- bzw. Isopropanol-Präzipitation	22
A.2.2.6 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen	22
A.2.2.7 Ligation von DNS	22
A.2.2.8 DNS-Agarose-Gelelektrophorese	23
A.2.2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	23

A.2.2.10	Dialyse von Proteinlösungen.....	23
A.2.2.11	Spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration	24
A.2.2.12	Durchmusterung von Transformanten durch Kolonie-PCR	24
A.2.3	Produktion von GGA1/3 Fragmenten in <i>E.coli</i>	24
A.2.3.1	Klonierung in pGEX-6P-1.....	24
A.2.3.2	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	26
A.2.4	Produktionsversuche in Insektenzellen.....	27
A.2.4.1	Zellkultur (Bac-to-Bac [®] Baculovirus Expressionssystem)	27
A.2.4.2	Klonierungen in pFastBac [™] -HT-B	27
A.2.4.3	Präparation rekombinanter Bacmid-DNS.....	27
A.2.4.4	Transfektion von Insektenzellen und Präparation rekombinanter Baculoviren	28
A.2.4.5	Expressionstests in High Five [™] Zellen.....	29
A.2.5	Reinigung von GGA Fragmenten.....	29
A.2.5.1	Zellaufschluss und Herstellung von Rohextrakten	29
A.2.5.2	Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose	29
A.2.5.3	Proteolyse mit PreScission-Protease	30
A.2.5.4	Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie an Phenylsepharose	30
A.2.5.5	Ionenaustauschchromatographie an Source30Q.....	30
A.2.5.6	Konzentrieren von Proteinlösungen	30
A.2.5.7	Grössenausschlusschromatographie	31
A.2.5.8	Lagerung der gereinigten Proben	31
A.2.6	Kristallisation	31
A.2.6.1	Durchmusterung von Kristallisationsbedingungen.....	31
A.2.6.2	Bestimmung der Beugungseigenschaften von Kristallen	32
A.3	Ergebnisse	33
A.3.1	Auswahl von GGA Fragmenten	33
A.3.2	Produktion von GGA1/3 Fragmenten in <i>E. coli</i>	34
A.3.3	Reinigung der in <i>E. coli</i> produzierten GGA1/3 Fragmente	35
A.3.4	Produktionsversuche in Insektenzellen.....	37
A.3.5	Kristallisation der gereinigten GGA1/3 Fragmente.....	39
A.3.5.1	Kristallisation von GGA1_2-361_wt.....	40
A.3.5.2	Kristallisation von GGA1_2-361_Ser354Asp – Vergleich des Kristallisationsverhaltens mit GGA1_2-361_wt.....	42
A.3.5.3	Ermittlung geeigneter Kryolösungen.....	43

A.3.5.4	Manipulation der Kristalle zur Verbesserung ihrer Beugungseigenschaften.....	44
A.3.5.4.1	<i>Annealing</i>	45
A.3.5.4.2	Regulation des Lösungsmittelanteils der Kristalle	45
A.3.5.4.3	Temperaturänderung	47
A.3.5.5	Kristallisation von GGA1_2-326	47
A.3.5.6	Variation des N-Terminus von GGA1_2-361 durch Proteolyse mit Aminopeptidase M.....	48
A.4	Diskussion	51
B	STRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN AM Cα-FORMYLGLYCIN GENERIERENDEN ENZYM.....	55
B.1	Einleitung	55
B.1.1	Sulfatasen	55
B.1.2	Sulfatasedefizienzen	56
B.1.2.1	Multiple Sulfatasedefizienz.....	57
B.1.3	Posttranslationale Modifikation von Sulfatasen	58
B.1.4	Bedeutung des FGly bei der Hydrolyse von Sulfatestem	58
B.1.5	Das C α -Formylglycin generierende Enzym.....	60
B.1.6	Das FGE Paralog pFGE.....	63
B.1.7	Zielsetzung	64
B.2	Material und Methoden	65
B.2.1	Reinigung von FGE.....	65
B.2.2	Limitierte Proteolyse von FGE.....	65
B.2.3	Komplexierung von FGE Cys336Ser mit Substratpeptiden	65
B.2.4	Kristallisation	65
B.2.5	Datensammlung.....	66
B.2.6	Strukturbestimmung	66
B.2.7	Modellbau und Strukturverfeinerung	67
B.2.8	Strukturanalyse	69
B.3	Ergebnisse	70
B.3.1	Proteolyse und Kristallisation von FGE	70
B.3.2	<i>De novo</i> Bestimmung der Struktur von wildtyp FGE durch Calcium/Schwefel SAD-Phasierung unter Verwendung von CuK α Strahlung.....	71
B.3.2.1	Datensammlung und Strukturbestimmung	71

B.3.3	Bestimmung der Struktur von FGE Cys336Ser.....	75
B.3.3.1	Kristallisation und Strukturbestimmung von FGE Cys336Ser.....	75
B.3.3.2	Strukturanalyse.....	77
B.3.3.2.1	Vergleich der Strukturen von FGE Cys336Ser und wildtyp-FGE.....	77
B.3.4	Bestimmung der Struktur von FGE Cys336Ser im Komplex mit Arylsulfatase A abgeleiteten Peptiden.....	77
B.3.4.1	Kristallisation von FGE Cys336Ser/CTPSR- und /LCTPSRA-Peptid-Komplexen.....	78
B.3.4.2	Datenaufnahme, Prozessierung, Strukturbestimmung und Verfeinerung.....	78
B.3.4.3	Strukturanalyse.....	79
B.3.4.3.1	Identifikation der Substratbindestelle von FGE.....	79
B.3.4.3.2	Kovalente Substratbindung durch FGE.....	80
B.3.4.3.3	Sequenzspezifische Substratbindung.....	80
B.3.4.3.4	Mit der Substratbindung einhergehende Konformationsänderungen von FGE.....	85
B.3.4.3.5	Hinweise zum Reaktionsmechanismus.....	86
B.4	Diskussion	88
	Literaturverzeichnis	93
	Anhang.....	107
	Danksagung.....	113
	Lebenslauf	114

Zusammenfassung

GGA-Proteine bilden eine Familie von monomeren Clathrin-Adaptorproteinen, die bei der Sortierung von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren vom *trans*-Golgi-Netzwerk zu den Endosomen eine Rolle spielen. Strukturelle Untersuchungen der GGA-Proteine beschränken sich bisher auf die Beschreibung der isolierten funktionellen VHS-, GAT und GAE-Domäne sowie der Wechselwirkungen, die diese mit ihren jeweiligen Bindungspartnern eingehen. Die Struktur eines intakten GGA-Proteins wurde bisher nicht bestimmt. Es sind auch keine Strukturen verfügbar, die Aussagen über die relative Orientierung der einzelnen Domänen zueinander zulassen. Um neue Strukturen von GGA-Proteinen zu gewinnen, wurden in dieser Arbeit GGA Fragmente, die mehr als eine isolierte Domäne dieser Proteine umfassen, auf ihre Eignung zur Kristallisation und Röntgenstrukturbestimmung geprüft.

Sulfatasen nutzen Formylglycin als katalytischen Rest in ihrem aktiven Zentrum zur Hydrolyse von Sulfateestern. Die posttranslationale Modifikation eines Cysteinrestes zu Formylglycin wird in einer sauerstoffabhängigen Reaktion durch das Formylglycin Generierende Enzym (FGE) katalysiert. Wie die Oxidation eines Cysteinrestes durch FGE vermittelt wird ist bisher nicht im Detail verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Strukturen der katalytisch inaktiven Mutante FGE Cys336Ser alleine, sowie im Komplex mit pentameren bzw. heptameren Peptiden, die anhand der Aminosäuresequenz von Arylsulfatase A abgeleitet wurden, durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die erhaltenen Strukturen zeigen die molekulare Basis für die spezifische Bindung aller humanen Sulfatasen durch FGE und unterstützen einen vorgeschlagenen Katalysemechanismus der Formylglycin-Bildung durch FGE.

Abkürzungsverzeichnis

×g	vielfaches der Erdbeschleunigung
Å	Angström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Abb.	Abbildung
AP	Adaptorprotein
Arf	<i>ADP ribosylation factor</i>
bp / kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
COP	<i>Coatomer Protein</i>
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FGE	C _α -Formylglycin Generierendes Enzym
FGH	Formylglycin-Hydrat
FGly	Formylglycin
FGS	Formylglycin-Sulfat
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatographie</i>
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GDP, GTP	Guanosin-5'-diphosphat, Guanosin-5'-triphosphat
GEF	<i>Guaninenucleotide Exchange Factor</i>
GGA (-Protein)	<i>Golgi-localized, Gamma-Adaptin-ear containing, ARF-binding (-Protein)</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktosid
K	Kelvin
MAD	<i>Multiple-wavelength Anomalous Dispersion</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure

min	Minuten
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptor
MWCO	<i>Molecular Weight Cutoff</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SAD	<i>Single-wavelength Anomalous Dispersion</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SIR	<i>Single Isomorphous Replacement</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
XGal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid

A Kristallisation von GGA-Proteinen

A.1 EINLEITUNG

Ein wesentliches Merkmal eukaryotischer Zellen ist ihre Kompartimentierung in membranumhüllte Organellen. Dazu gehören der Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, Lysosomen, Endosomen, Mitochondrien, Chloroplasten (in Pflanzenzellen) und Peroxisomen. Diese Organellen zeichnen sich durch einen spezifischen Satz von Proteinen und Lipiden aus, die für die jeweilige Funktion der einzelnen Organellen von grundlegender Bedeutung sind. In eukaryotischen Zellen werden neusynthetisierte Proteine des sekretorischen Transportweges vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zum *trans*-Golgi Netzwerk transportiert, von wo aus sie zu ihren Zielorten, den Endosomen, Lysosomen und der Plasmamembran sortiert werden. Der Transport zwischen diesen membranumhüllten Kompartimenten erfolgt mittels Protein-umhüllter Membranvesikel, die von einem Kompartiment (der Donormembran) abgeschnürt werden und schliesslich mit einem anderen Kompartiment (der Zielmembran) verschmelzen. Diese Vesikel sind mit spezifischen Hüllproteinen bedeckt, die eine Schlüsselfunktionen bei der Bildung der Transportvesikel und der Auswahl der Ladung, die in solche Vesikel verpackt wird, haben (Kirchhausen, 2000, Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003). Die Hüllen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Proteinkomponenten und Vesikel werden darauf basierend in verschiedene Typen eingeteilt. Zur Zeit sind drei Typen umhüllter Vesikel bekannt: COPI, COPII und Clathrin-beschichtete Vesikel, die an unterschiedlichen Transportwegen in der Zelle beteiligt sind (*Abb. 1*). Vesikel mit einer COPII-Hülle transportieren Proteine vom rauhen ER zum Golgi-Apparat. Vesikel mit einer COPI-Hülle transportieren Proteine in der umgekehrten Richtung zwischen den Golgi-Zisternen und vom *cis*-Golgi zurück zum rauhen Endoplasmatischen Retikulum. Clathrin-beschichtete Vesikel sind an Transportprozessen von der Plasmamembran bzw. dem *trans*-Golgi-Netzwerk zu Endosomen beteiligt (Kirchhausen, 2000).

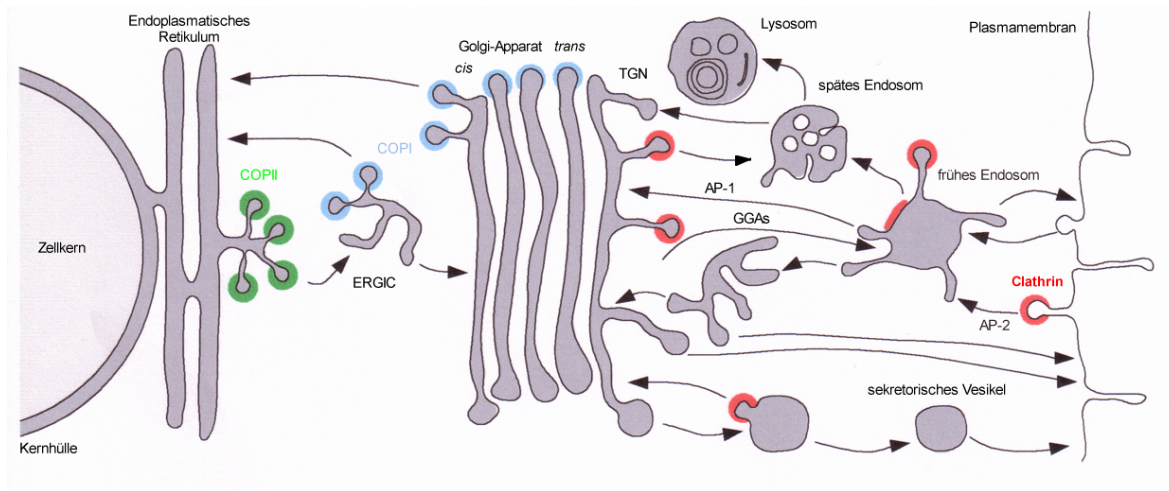


Abb. 1 Intrazelluläre Transportwege unter Beteiligung von COPI- (blau), COP II- (grün) und Clathrin- (rot) umhüllten Transportvesikeln. Modifiziert nach Bonifacino & Glick (2004).

Obwohl an den verschiedenen Transportprozessen Vesikel mit unterschiedlichen Proteinhüllen beteiligt sind, sind die dem Aufbau dieser Hüllen zu Grunde liegenden Mechanismen vergleichbar. Der Prozess wird durch die Markierung des entsprechenden Membranbereiches mit einer kleinen GTPase, die an die Membran in ihrer GTP-Form bindet, eingeleitet. Die GTPase dient als Andockstelle für sogenannte Adaptorproteine. Diese Adaptorproteine sind an der Auswahl Ladung, die in das Vesikel verpackt wird, beteiligt. Darüberhinaus binden sie Gerüstproteine, die sich zur äußeren Schicht der Hülle zusammenlagern, sowie unterstützende Proteine, die verschiedene Funktionen der Hülle vermitteln.

Clathrinhüllen sind bezüglich ihrer Proteinkomponenten heterogen. Clathrin kommt an Membranen typischer Weise zusammen mit einem heterotetrameren Komplex vor, der als Adaptorprotein (AP)-Komplex bezeichnet wird. Die vier Untereinheiten dieser AP-Komplexe werden als Adaptine benannt. Es gibt mehrere Adaptine, die in Kombination verschiedene Klassen von AP-Komplexen bilden. Jeder AP-Komplex besteht aus zwei großen, einer mittleren und einer kleinen Untereinheit (Robinson & Bonifacino, 2001).

A.1.1 GGA-Proteine

Lange Zeit glaubte man, dass es sich bei den heterotetrameren AP-Komplexen um die wichtigsten – wenn nicht gar einzigen – Adaptorproteine handelt, die für den Aufbau von

Clathrinhüllen sowie die Auswahl der Vesikelfracht verantwortlich sind. Neuere Studien führten zur Identifikation von Proteinen, die teilweise Sequenzhomologie mit den Adaptinen zeigen, aber nicht Bestandteil der AP-Komplexe sind – den GGA (*Golgi-localized, γ -Adaptin-ear containing, Arf-binding*)-Proteinen (Boman *et al.*, 2000; Dell’Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000; Poussu *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu den heterotetrameren AP-Komplexen handelt es sich bei den GGA-Proteinen um monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 65 – 80 kDa. Zur Zeit sind drei GGA-Protein Isoformen in *Homo sapiens* bzw. Säugetieren, zwei in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und jeweils ein GGA-Protein in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* identifiziert. Eine der wichtigsten Eigenschaften der GGA-Proteine ist ihre konservierte modulare Organisation. Sie bestehen aus einer Anordnung von drei konservierten Domänen – VHS, GAT und GAE – welche durch zwei variable Sequenzabschnitte verbunden sind (*Abb. 2*). Die lange Verbindungssequenz zwischen der GAT und GAE-Domäne wird als Hinge-Region bezeichnet.



Abb. 2 Schematische Darstellung der GGA-Protein Domänenorganisation.

A.1.2 Funktion und Struktur der GGA-Domänen

A.1.2.1 VHS-Domäne

Die etwa 140 Aminosäurereste umfassende N-terminale VHS-Domäne findet sich auch in anderen Proteinen, die eine Rolle in Membrantransportprozessen spielen und wurde ursprünglich in den Proteinen Vps27 (*vacuolar protein sorting*), Hrs (*hepatocyte-growth-factor-receptor substrate*) und Stam (*signal-transducing adaptor molecule*) gefunden (Lohi & Lehto, 1998; Mao *et al.*, 2000). Die VHS-Domäne stellt ein Erkennungsmodul für Sortiersignale in den cytosolischen Teilen von Sortilin (Nielsen *et al.*, 2001) und den beiden Mannose-6-Phosphat Rezeptoren (MPR) – dem Kation-unabhängigen MPR und dem Kation-abhängigen MPR – dar (Puertollano *et al.*, 2001a; Takatsu *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001). Die MPR sind an der Sortierung von Vorstufen lysosomaler Hydrolasen zu den

Lysosomen beteiligt. Sie verkehren zwischen dem *trans*-Golgi Netzwerk und Endosomen (Gosh *et al.*, 2003). Dieser Verkehr ist abhängig von Signalen, die als „*acidic-cluster-dileucine*“ oder „DXXLL“ (X steht für einen beliebigen Aminosäurerest) bezeichnet werden. Diese Sortiersignale sind nahe des C-Terminus beider MPR, ein oder zwei Aminosäurereste entfernt vom cytoplasmatischen Ende, lokalisiert. Die Schlüsselemente dieser Signale bilden eine Gruppe von sauren Aminosäureresten, einschliesslich eines essentiellen Asparaginsäurerestes, welcher 3 Reste stromabwärts von einem essentiellen Paar von Leucinresten gefolgt wird. Ein weiteres, wichtiges Element ist ein phosphorylierbarer Serinrest.

Bemerkenswert ist, dass die Hinge-Region von GGA1 und GGA3 ebenfalls ein solches DXXLL-Sequenzmotiv beinhaltet. Diese interne DXXLL-Sequenz tritt mit der VHS-Domäne in Wechselwirkung (Doray *et al.*, 2002a). Die Wechselwirkung wird durch die Phosphorylierung eines Serinrestes, der drei Aminosäurereste stromaufwärts der DXXLL-Sequenz lokalisiert ist, durch Caseinkinase 2 moduliert (Gosh & Kornfeld, 2003). Es wird angenommen, dass diese intrinsische DXXLL-Sequenz eine autoinhibitorische Funktion ausübt.

Die strukturelle Basis für die spezifische Erkennung von DXXLL-Signalen durch die VHS-Domäne der GGA-Proteine wurde durch röntgenkristallographische Untersuchungen aufgeklärt (Misra *et al.*, 2002; Shiba *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003a). Die VHS-Domäne der GGA-Proteine besteht aus einer rechtsgängigen Superhelix von acht α -Helices (Abb. 3). Ein DXXLL-Peptid bindet in einer gestreckten Konformation an eine Tasche zwischen der sechsten und achten α -Helix. Der Asparaginsäurerest und die beiden Leucinreste des Peptides binden an eine elektropositive bzw. zwei flache hydrophobe Taschen an der Oberfläche der VHS-Domäne, während ein phosphorylierter Serinrest (Kato *et al.*, 2002) und die terminale Carboxylgruppe (Misra *et al.*, 2002) durch elektrostatische Wechselwirkungen ebenfalls zur Bindung beitragen.

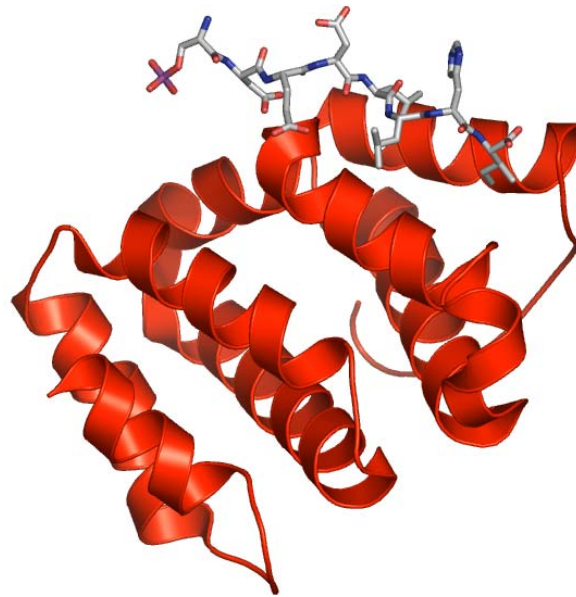


Abb. 3 Kristallstruktur der GGA3 VHS-Domäne im Komplex mit einem phosphoryliertem Peptid (pSDEDLLHI, pS steht für einen phosphorylierten Serinrest), das anhand der Aminosäuresequenz des Kation-abhängigen Mannose-6-Phosphat Rezeptors abgeleitet wurde (PDB-Eintrag 1LF8, Kato *et al.*, 2002).

A.1.2.2 GAT-Domäne

Die etwa 150 Aminosäurereste umfassende GAT-Domäne verdankt ihre Bezeichnung der Tatsache, dass sie Sequenzhomologie zu Tom1 (*Target of myb*) besitzt (GGA and Tom1). GGA-Proteine wurden ursprünglich u.a. aufgrund ihrer Wechselwirkung mit der GTP-gebundenen Form von Arf-Proteinen, speziell Arf1 (Dell'Angelica *et al.*, 2000) und Arf3 (Boman *et al.*, 2000), identifiziert. Die für die Wechselwirkung mit Arf verantwortliche Region der GGA-Proteine konnte auf die Aminosäurereste 170-330 eingegrenzt werden (Boman *et al.* 2000, Zhdankina *et al.* 2001), wobei es sich um die GAT-Domäne handelt.

Die Struktur der GGA1 GAT-Domäne wurde mehrfach bestimmt. Zwei dieser Strukturen zeigen drei α -Helices (Shiba *et al.*, 2003; Suer *et al.*, 2003) während zwei weitere Strukturen vier Helices zeigen (Collins *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2003b). Die Unterschiede finden sich im N-terminalen Bereich. Die erste Helix ist ungeordnet, wenn die GAT-Domäne alleine kristallisiert, während sie bei Kokristallisation mit Arf-GTP α -helical ist. Demzufolge werden eine N-terminale (N-GAT) und eine C-terminale (C-GAT) Unterdomäne, die durch eine lange α -Helix verbunden sind (Shiba *et al.*, 2003; Shiba *et*

al., 2004) unterschieden (*Abb. 4*). Die Struktur der GGA1 N-GAT Unterdomäne wurde im Komplex mit Arf1-GTP bestimmt (Shiba *et al.*, 2003).

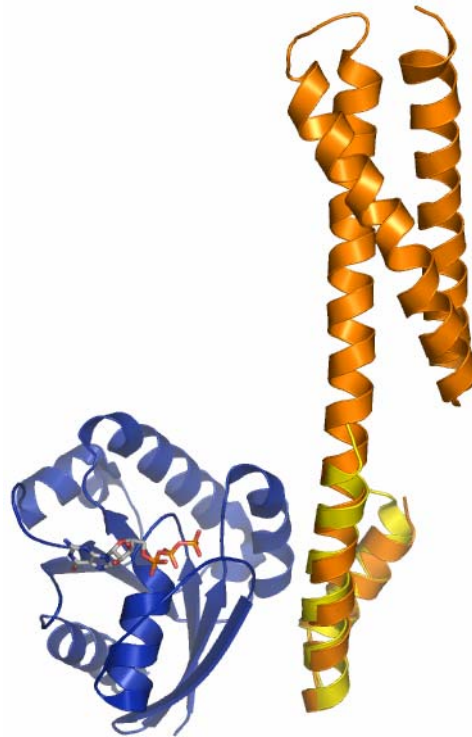


Abb. 4 Überlagerung der Kristallstruktur der GGA1 GAT-Domäne (orange, PDB-Eintrag 1J2H, Shiba *et al.*, 2003) und der Struktur des Komplexes Arf1(Δ 17-Q71L)–GGA1-GAT-Domäne (Arf1 in blau, GGA1 N-GAT Unterdomäne in gelb, PDB-Eintrag 1J2J, Shiba *et al.*, 2003).

Interessanterweise zeigt die Struktur der GAT-Domäne Ähnlichkeit mit den C-terminalen Helices der rechthändigen Superhelix der ANTH (*AP180 N-terminal homology*)-Domäne. Diese ANTH-Domäne enthält zusätzlich eine VHS-ähnliche Unterdomäne C-terminal der Superhelix. Deshalb wird vermutet, dass die VHS- und GAT-Domänen der GGA-Proteine zusammen eine große rechthändige Superhelix ähnlich der gesamten ANTH-Domäne bilden könnten (Shiba *et al.*, 2003).

A.1.2.3 GAE-Domäne

Die GAE-Domäne der GGA-Proteine ist an Wechselwirkungen mit verschiedenen Proteinen beteiligt. Dazu gehören γ -Synergine (Hirst *et al.*, 2000), p56 (Lui, 2003), und Rababtin5 (Hirst *et al.*, 2000; Mattera *et al.*, 2003). Diese Proteine besitzen alle ein DFGX \emptyset -Motif (wobei \emptyset ein grosser hydrophober Aminosäurerest ist) welches für die

Wechselwirkung mit der GAE-Domäne verantwortlich ist (Mattera *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2003; Duncan *et al.*, 2003).

Die verfügbaren Kristallstrukturen der GAE-Domänen von GGA1 und GGA3 zeigen, dass die GAE-Domäne die Form eines achtsträngigen β -Sandwich, bestehend aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt und einem dreisträngigen β -Faltblatt, aufweist (Abb. 5).

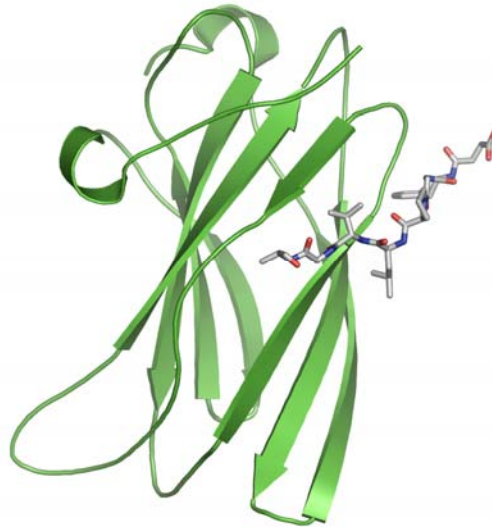


Abb. 5 Kristallstruktur der GGA3 GAE-Domäne im Komplex mit einem Peptid (DFGPLVGA), das anhand der Aminosäuresequenz von Rabartin-5 abgeleitet wurde (PDB-Eintrag 1P4U, Miller *et al.*, 2003).

Die GAE-Domäne von GGA1 wechselwirkt auch mit Clathrin. Die biochemischen und strukturellen Grundlagen dieser Wechselwirkung wurden bisher nicht bestimmt.

A.1.2.4 Hinge-Region

Obwohl die Hinge-Region verschiedener GGA-Proteine nicht konserviert vorliegt, finden sich in diesem Bereich kurze Sequenzabschnitte, bei denen es sich um potentielle Clathrin-Bindemotive (Clathrinboxen) handelt. Die Hinge-Region der GGA-Proteine aus Säugetieren (Puertollano *et al.*, 2001b) und Hefe (Costaguta *et al.* 2001; Mullins & Bonifacino, 2001) wechselwirken mit Clathrin *in vitro* und die Überexpression der GGA-Proteine resultiert in einer zunehmenden Rekrutierung von Clathrin zum TGN (Puertollano *et al.*, 2001b). Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass die GGA-Proteine eine Rolle bei der Bildung Clathrin-beschichteter Vesikel am TGN spielen.

Die Hinge-Region von GGA1 und GGA3, aber nicht von GGA2, beinhaltet ein potentiell DXXLL-Motiv mit einer Caseinkinase2 (CK2) Phosphorylierungsstelle. Ist ein Serinrest stromaufwärts der DXXLL-Sequenz phosphoryliert, kommt es zu einer autoinhibitorischen intramolekularen Wechselwirkung zwischen der VHS-Domäne und dem Motiv, wodurch die Wechselwirkung der GGA-Proteine mit DXXLL-Motiven in cytosolischen Teilen transmembranaler Frachtrezeptoren unterbunden wird (Doray *et al.*, 2002a; Gosh & Kornfeld, 2003). Die Hinge-Region der GGA-Proteine kann darüber hinaus auch an die ear-Domäne von AP-1 γ 1-Adaptin binden und es wird angenommen, dass GGA-Proteine und AP-1 bei der Verpackung von MPRs in Clathrin-beschichtete Vesikel am TGN kooperieren (Doray *et al.*, 2002b).

A.1.3 Modell der GGA-Protein Funktion

Die zur Zeit beschriebenen Eigenschaften der einzelnen GGA-Protein Domänen stehen im Einklang mit der Annahme, dass es sich bei diesen Proteinen um Arf-abhängige Clathrinadaptor handelt, die an der Sortierung von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren in Clathrin-beschichtete Vesikel am *trans*-Golgi Netzwerk beteiligt sind. Im Unterschied zu den heterotetrameren AP-Komplexen werden die zahlreichen Wechselwirkungen, die hierfür notwendig sind, durch verschiedene funktionelle Domänen einer einzelnen Polypeptidkette vermittelt. Die zur Zeit verfügbaren Daten erlauben die Formulierung eines Modelles, das die Funktion der GGA-Proteine bei der Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln und der Auswahl der Fracht, die in diese Vesikel verpackt wird, beschreibt (*Abb. 6*).

Wie bei anderen Adaptorproteinen, wird die Rekrutierung der GGA-Proteine an die Golgi-Membran durch die lokale Aktivierung von Arf eingeleitet. Dabei konvertiert ein Arf-GEF Arf-GDP zu Arf-GTP, wodurch eine myristoylierte α -Helix von Arf exponiert wird und Arf-GTP an die Golgi-Membran bindet. Die mit der Konvertierung in Arf-GTP einhergehende Strukturänderung von Arf erlaubt das Binden von Arf-Effektoren, in diesem Falle der GGA-Proteine, welche durch Wechselwirkung der GAT-Domäne mit Arf-GTP an die Membran gebracht werden (Shiba *et al.*, 2003). Die Bindung der GGA GAT-Domäne an Arf-GTP verhindert die Inaktivierung von Arf durch Arf-GAP, wodurch der GGA/Arf-GTP-Komplex stabilisiert wird. Durch die Bindung des GGA-Proteins an die Membran wird die Erkennung von Sortiersignalen in den cytoplasmatischen Teilen transmembranaler Frachtrezeptoren, z.B. Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, ermöglicht.

Die Bindung des GGA-Proteins an membrangebundenes Arf bringt die VHS-Domäne in unmittelbare Nähe zur Membran, wo sie mit DXXLL-Signalsequenzen in den cytoplasmatischen Teilen der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren und anderer transmembranaler Proteine wechselwirken kann.

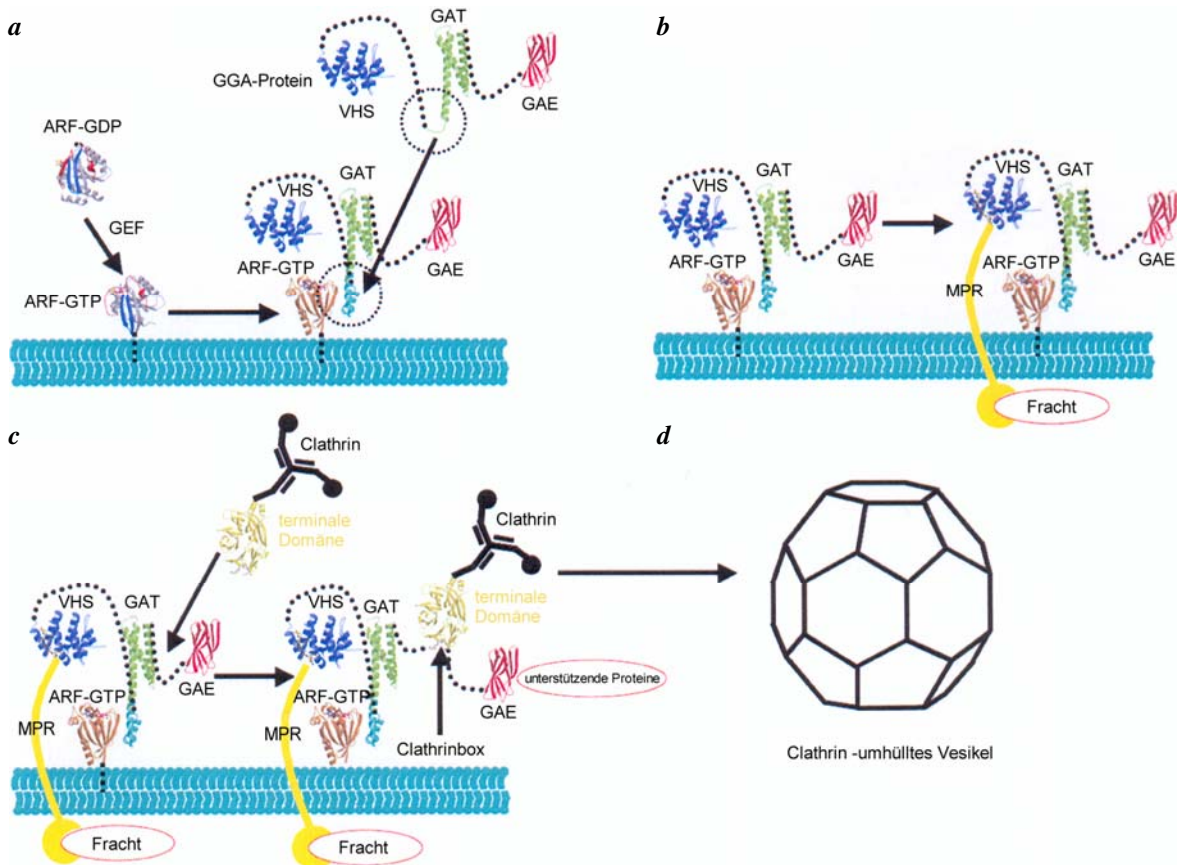


Abb. 6 Modell der GGA-Protein Funktionsweise als monomere Clathrinadaptor. (a) Die lokale Aktivierung von Arf führt zur Rekrutierung der GGA-Proteine an die Membran. (b) Wechselwirkung der GGA VHS-Domäne mit den cytoplasmatischen Teilen transmembranaler Frachtrezeptoren, z.B. Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR). (c) Rekrutierung von Clathrin und unterstützenden Proteinen. (d) Clathrin-umhülltes Vesikel. Modifiziert nach Nakayama & Wakatsuki (2003).

Diese Wechselwirkung unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen. GGA1 und GGA3 liegen im Cytosol in einer autoinhibierten Form vor, wobei die in der GGA-Protein Hinge-Region vorhandene DXXLL-Sequenz nach Phosphorylierung eines Serinrestes durch Caseinkinase 2 an die VHS-Domäne bindet (Doray *et al.*, 2002a). Die Aufhebung der Autoinhibition erfordert die Dephosphorylierung durch eine Proteinphosphatase, was nach der Bindung des GGA-Proteins an Arf-GTP stattfinden könnte (Gosh & Kornfeld,

2003). Zweitens resultiert die Phosphorylierung eines Serinrestes N-terminal eines DXXLL Signals im transmembranalen Frachtrezeptor in einer festeren Bindung an die VHS-Domäne (Kato *et al.*, 2002).

Durch die Wechselwirkung zwischen Clathrinbox-ähnlichen Sequenzabschnitten in ihrer Hinge-Region mit der terminalen Domäne der schweren Kette von Clathrin (Zhu *et al.*, 2001; Puertollano *et al.*, 2001b; Mullins & Bonifacino, 2001) tragen die GGA-Proteine schliesslich zur Rekrutierung von Clathrin zum TGN bei. Die GGA VHS-Domäne könnte dabei ebenfalls an der Clathrinbindung beteiligt sein. Zur Zeit ist unklar, ob die GGA-Proteine alleine oder in Kooperation mit anderen Clathrin-bindenden Proteinen wie AP-1 und Enthoprotin/Ent5, die Rekrutierung von Clathrin an das TGN bewerkstelligen.

Die Bindung weiterer Proteine erfolgt durch die GAE-Domäne der GGA-Proteine. In den meisten Fällen ist die Funktion dieser Proteine nicht bekannt. Sie könnten den Auf- und Abbau der Vesikelhülle, die Knospung und Abschnürung des Vesikels von der Donormembran, Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett, die Steuerung des Vesikels zu seinem Zielort sowie die Fusion des Vesikels mit der Akzeptormembran vermitteln.

A.1.4 Zielsetzung

Die bisher verfügbaren Strukturen von GGA-Proteinen wurden ausschliesslich von isolierten Domänen erhalten. Die Struktur eines intakten GGA-Proteins wurde bisher nicht bestimmt und es sind keine Strukturen verfügbar, die Aussagen über die relative Orientierung der einzelnen GGA-Domänen zueinander zulassen. Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur eines intakten, Vollängen GGA-Proteins sowie seiner verschiedenen Konformationen ist jedoch unerlässlich für das vollständige Verständnis der Funktionsweise dieser monomeren Clathrinadaptor. Einige Aspekte der GGA-Protein Funktion sind bisher nicht strukturell untersucht. Für GGA1 und GGA3 aus Säugetieren wird angenommen, dass es in Abhängigkeit der Phosphorylierung eines Serinrestes zu einer intramolekularen Bindung einer autoinhibitorischen Sequenz des Hinge-Segments an die VHS-Domäne kommt, die mit einer grossen Konformationsänderung einhergeht. Auch die Struktur der verbundenen VHS und GAT-Domäne wäre interessant, da die Möglichkeit besteht, dass diese Domänen zusammen eine grosse rechtsgängige Superhelix bilden.

Ziel dieser Arbeit war die Klonierung, Produktion und Reinigung von GGA Fragmenten, die mehr als eine isolierte Domäne dieser Proteine umfassen. Anschliessend sollte ihre

Eignung zur Kristallisation und Röntgenstrukturbestimmung geprüft, und nach Möglichkeit neue Strukturen der GGA-Proteine gewonnen werden.

A.2 MATERIAL UND METHODEN

A.2.1 Material

A.2.1.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Sigma-Aldrich, Applichem oder Fluka mit dem Reinheitsgrad “p.a.” (zur Analyse) bezogen.

A.2.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und gereinigt.

Tab. 1 Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz
<i>gga1_5'_BamHI</i>	5' -TTCAAGGATCCGAGCCC GCGATGGAGCCGG-3'
<i>gga1_3'_XhoI_2nd</i>	5' -TAATCCTCGAGCTAGAGGCTCCCCCAGGTC-3'
<i>gga1_SLLDDELM_3'_XhoI</i>	5' -TCCGACTCGAGTCACATGAGCTCGTCATCGAGCAGGGA-3'
<i>gga1_DLLDDELM_3'_XhoI</i>	5' -CGACTCGAGTCACATGAGCTCGTCATCGAGCAGGTCCACCGAGGCA-3'
<i>gga1_3'_XhoI_3rd</i>	5' -ATGCTCTCGAGCTACTCCTCGCCCCGGACCAGCTGC-3'
<i>gga1_3'_XhoI_4th</i>	5' -ACATTCTCGAGTCAGAGGTCCAGGCCTGAGAGGTCC-3'
<i>gga3_5'_BamHI_2nd</i>	5' -CCCATGGATCCGCGGAGCGGAAGGGGAGAGC-3'
<i>gga3_3'_XhoI_2nd</i>	5' -CCTAACTCGAGTCATAGGTTCCCCCACTGC-3'
<i>gga3_SLLDEELL_3'_XhoI</i>	5' -ACGACTCGAGTCAGAGGAGCTCCTCATCCAGCAAGGA-3'
<i>gga3_DLLDEELL_3'_XhoI</i>	5' -GGACTCGAGTCAGAGGAGCTCCTCATCCAGCAAGTCGAGGGCATTG-3'
M13_forward	5' -GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13_reverse	5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'

A.2.1.3 Bakterienstämme und Insektenzellen

E. coli Stämme

- *Escherichia coli* XL1-Blue

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]

- *Escherichia coli* Rosetta2(DE3)

F' *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) pRARE2 (Cam^R)

pRARE2 enthält die tRNA Gene *argU*, *argW*, *ileX*, *gluT*, *leuW*, *proL*, *metT*, *thrT*, *tyrU*, *thrU* und *argX*, die die Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA und CGG erkennen

- *Escherichia coli* DH10BacTM

F' *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7679 galU galK λ-rpsL nupG* / bMON14272 / pMON7124

Insektenzellen

- Sf21 (Invitrogen, Karlsruhe)
- High FiveTM (Invitrogen, Karlsruhe)

A.2.1.4 Kulturmedien

Medien für die Kultivierung von E. coli

- *Luria-Bertani (LB)-Medium*

10 g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10 g NaCl, mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml. Sterilisation durch autoklavieren.

- *SOC-Medium:*

2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose. Das Medium wurde ohne Zusatz von Glukose hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert. Parallel wurde eine 1 M Glukoselösung hergestellt und sterilfiltriert. Glukose wurde dann aus dieser Stammlösung zu einer Endkonzentration von 20 mM zum Medium zugesetzt.

Medien für die Kultivierung von Insektenzellen

- Sf-900 II SFM (Invitrogen, Karlsruhe)
- Express Five[®] SFM (Invitrogen, Karlsruhe)
- Grace's Insect Medium (Invitrogen, Karlsruhe)

A.2.2 Allgemeine mikrobiologische, molekularbiologische und proteinchemische Methoden

A.2.2.1 Übertragung von DNS in *E. coli* (Transformation)

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode kompetent gemacht. Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 angezogen. Durch Zentrifugation (10 min, 4000×g) wurden die Zellen sedimentiert, in 100 ml eiskaltem 0,1 M MgCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 200 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und wiederum für 20 min auf Eis inkubiert. Die nochmals abzentrifugierten Zellen wurden in 5 ml einer Mischung aus 85% (v/v) 0,1 M CaCl₂ und 15% (v/v) Glycerin aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

Transformation durch Hitzeschock

Aliquots kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, Plasmid-DNS oder Ligationsansatz zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Anschliessend wurde für 5 min auf Eis inkubiert, 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 37 °C angezogen. 50-100 µl Zellsuspension wurden auf Selektivmedium (LB-Agarplatten, unter Zusatz geeigneter Antibiotika) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C angezogen.

A.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNS aus *E. coli* wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* oder das *QIAGEN Plasmid Midi Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers (QIAGEN, Hilden) verwendet.

A.2.2.3 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die Reinigung von DNS aus PCR-Reaktionsansätzen erfolgte mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

A.2.2.4 Bestimmung der DNS-Konzentration und Reinheit

Die Konzentration von doppelsträngiger DNS in wässriger Lösung wurde photometrisch durch Messung der OD_{260} bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNS. Die Verunreinigung von DNS-Proben mit Protein wurde durch Messen der OD_{280} und Berechnung des Verhältnisses OD_{260}/OD_{280} beurteilt. Dieses sollte für reine Proben mindestens 1,8 betragen.

A.2.2.5 Konzentration von DNS durch Ethanol- bzw. Isopropanol-Präzipitation

Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 ml eiskaltem Ethanol (bei Volumina kleiner als 0,4 ml) bzw. Isopropanol (bei Volumina grösser als 0,4 ml) wurde die DNS etwa 20 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ präzipitiert und anschliessend 5 min bei $14000\times g$ zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde der Niederschlag mit 1 ml 70% Ethanol versetzt, geschüttelt und nochmals 5 min bei $14000\times g$ zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde der Niederschlag getrocknet und in einem geeigneten Volumen bidestilliertem Wasser resuspendiert.

A.2.2.6 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

DNS wurde zu analytischen und präparativen Zwecken mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die verwendeten Enzyme *Bam*HI und *Xho*I stammten von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt) oder MBI Fermentas (St. Leon-Roth). Es wurden die von den Herstellern empfohlenen Puffer und Reaktionsbedingungen angewandt.

A.2.2.7 Ligation von DNS

Die Ligation von linearisierter Plasmid-DNS mit einem 3-fachen molaren Überschuss von DNS-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von T4 DNS-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt a.M.), wobei die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Reaktionsbedingungen angewandt wurden.

A.2.2.8 DNS-Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von DNS-Fragmenten erfolgte in 1% (w/v) Agarosegelen in 1× TBE-Puffer (90 mM TRIS, 90 mM Borsäure, 10 mM EDTA) in Horizontal-Elektrophorese-Anlagen der Firma BioRad (München), wobei die Proben mit 1/10 Volumen 10×Probenpuffer (0,02% (w/v) Bromphenolblau, 50% (v/v) Glycerin, 0,1% 1 M EDTA) versetzt wurden. Die Detektion der DNS erfolgte nach Inkubation des Geles in Ethidiumbromid (2 µg/ml) enthaltendem 1× TBE-Puffer unter UV-Licht ($\lambda=256$ nm).

A.2.2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinpräparationen wurden zu analytischen Zwecken unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das Trenngel enthielt 12,5% Acrylamid, 0,28% Bisacrylamid, 375 mM TRIS/HCl, pH 8,8, das Sammelgel 4,5% Acrylamid, 0,1% Bisacrylamid, 125 mM TRIS/HCl, pH 6,8. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 50 µl 10% Ammoniumpersulfatlösung und 5 µl TEMED pro 10 ml Volumen gestartet. Proteinproben wurden 1:1 mit 2×SDS-Probenpuffer (20% (v/v) 0,625 M TRIS/HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 1% (v/v) Bromphenolblau (1%ig in Ethanol)) gemischt und vor dem Auftrag auf das Gel 3 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 40 mA pro Gel in Biorad Gelkammern. Als Elektrophoresepuffer diente 25 mM TRIS, 192 mM Glycin und 0,01% SDS. Zwecks Detektion durch SDS-PAGE getrennter Proteine wurde das Gel unter Schütteln etwa 20 min in 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250 inkubiert. Anschliessend erfolgte eine mehrfache Entfärbung des Gels in 45% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig, bis einzelne Banden deutlich sichtbar wurden. Abschliessend wurde das Gel in Wasser überführt und an einer Geldokumentationsanlage (Biorad, München) dokumentiert.

A.2.2.10 Dialyse von Proteinlösungen

Zum Anpassen der Pufferzusammensetzung einer Proteinlösung wurde die Probe über Nacht gegen den gewünschten Puffer dialysiert. Dabei wurden SPECTRA/POR Dialyseschläuche mit einem MWCO von 6-8000 Da (Spektrum Medical Industries, INC., Los Angeles) verwendet.

A.2.2.11 Spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinpräparationen erfolgte nach der Methode von Ehresmann (Ehresmann *et al.* 1973) mit einem Ultrospec2100Pro Spektralphotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Die Messung erfolgte bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (228,5 nm und 234,5 nm), für die Bestimmung der Proteinkonzentration in mg/ml gilt die Beziehung:

$$c(\text{mg / ml}) = \frac{A_{228,5} - A_{234,5}}{3,14}$$

A.2.2.12 Durchmusterung von Transformanten durch Kolonie-PCR

Nach Transformation von *E. coli* XL1-Blue erhaltene Klone wurden hinsichtlich der Präsenz des zu klonierenden DNS-Abschnittes durch Kolonie-PCR untersucht. Eine geringe Menge Zellmaterial wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß abgestrichen und anschliessend 25 µl PCR-Reaktionsansatz (je 10 pmol der verwendeten Oligonukleotide, 400 µM jedes dNTPs, 2,5 µl 10×*Taq*-Puffer, 1 U *Taq*-Polymerase und bidestilliertes Wasser auf das Endvolumen von 25 µl) zupipettiert. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Angaben in A.2.3.1, Tab. 2.

A.2.3 Produktion von GGA1/3 Fragmenten in *E.coli*

A.2.3.1 Klonierung in pGEX-6P-1

Für die verschiedenen GGA1/3 Fragmente (Tab. 2) kodierende DNS-Sequenzabschnitte wurden mittels PCR amplifiziert, wobei die Konstrukte pCR2.1–GGA1 (im Falle der GGA1 Fragmente) oder pCR2.1–GGA3 (im Falle der GGA3 Fragmente) als DNS-Matrize dienten. Dabei wurden für die Klonierung notwendige 5′-*Bam*HI sowie 3′-*Xho*I Erkennungssequenzen, Stopkodons und gewünschte Mutationen durch die jeweils verwendeten Oligonukleotide eingeführt (Tab. 2).

Tab. 2 Während der Klonierung verschiedener GGA1/3 Fragmente bei der Amplifikation entsprechender DNS-Sequenzabschnitte eingesetzte Oligonukleotide.

GGA 1/3 Fragment	Oligonukleotid	Oligonukleotid dient der Einführung von	PCR-Produkt	Angepasste PCR-Reaktionsbedingungen Hybridisierungstemperatur/ Verlängerungszeitraum
GGA1	<i>gga1_5'_BamHI</i>	5'- <i>BamHI</i> Erkennungssequenz	1927 bp	65 °C / 120 s
	<i>gga1_3'_XhoI_2nd</i>	3'- <i>XhoI</i> -Erkennungssequenz		
GGA1_2-361_wt	<i>gga1_5'_BamHI</i>	5'- <i>BamHI</i> Erkennungssequenz	1105 bp	65 °C / 90 s
	<i>gga1_SLLDDELM_3'_XhoI</i>	TGA Stopkodon, 3'- <i>XhoI</i> -Erkennungssequenz		
GGA1_2-361_Ser354Asp	<i>gga1_5'_BamHI</i>	5'- <i>BamHI</i> Erkennungssequenz	1103 bp	65 °C / 90 s
	<i>gga1_DLLDDELM_3'_XhoI</i>	Ser354Asp Mutation, TGA Stopkodon, 3'- <i>XhoI</i> -Erkennungssequenz		
GGA1_2-326	<i>gga1_5'_BamHI</i>	5'- <i>BamHI</i> Erkennungssequenz	1000 bp	60 °C / 60 s
	<i>gga1_3'_XhoI_4th</i>	TGA Stopkodon, 3'- <i>XhoI</i> -Erkennungssequenz		
GGA1_2-301	<i>gga1_5'_BamHI</i>	5'- <i>BamHI</i> Erkennungssequenz	925 bp	55 °C / 60 s
	<i>gga1_3'_XhoI_3rd</i>	TAG Stopkodon, 3'- <i>XhoI</i> -Erkennungssequenz		
GGA3	<i>gga3_5'_BamHI_2nd</i>	5'- <i>BamHI</i> Erkennungssequenz	2176 bp	65 °C / 120 s
	<i>gga3_3'_XhoI_2nd</i>	3'- <i>XhoI</i> -Erkennungssequenz		
GGA3_2-391_wt	<i>gga3_5'_BamHI_2nd</i>	5'- <i>BamHI</i> Erkennungssequenz	1195 bp	65 °C / 90 s
	<i>gga3_SLLDEELL_3'_XhoI</i>	TGA Stopkodon, 3'- <i>XhoI</i> -Erkennungssequenz		
GGA3_2-391_Ser384Asp	<i>gga3_5'_BamHI_2nd</i>	5'- <i>BamHI</i> Erkennungssequenz	1193 bp	65 °C / 90 s
	<i>gga3_DLLDEELL_3'_XhoI</i>	Ser384Asp Mutation, TGA Stopkodon, 3'- <i>XhoI</i> -Erkennungssequenz		

Eine PCR-Reaktion enthielt dabei etwa 10 ng DNS-Matritze, je 10 pmol der verwendeten Oligonukleotide, 400 µM jedes dNTPs, 2,5 µl 10×*Pfu*-Puffer, 1 U *Pfu*-Polymerase und bidestilliertes Wasser auf das Endvolumen von 25 µl. Die PCR-Reaktion wurde in einem Eppendorf Thermocycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) unter Anwendung des folgenden Temperaturprogrammes durchgeführt:

- Denaturierung	96 °C	180 s
- 30 Zyklen		
- Annealing	angepasst	120 s
- Extension	72 °C	angepasst
- Denaturierung	96 °C	30 s
- Annealing	angepasst	60 s
- Extension	72 °C	15 min

Die Hybridisierungstemperatur und der Verlängerungszeitraum wurden entsprechend den Angaben in *Tab. 2* angepasst. Die PCR-Produkte wurden gereinigt, einer Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xho*I unterzogen und nach erneuter Reinigung in den ebenfalls *Bam*HI/*Xho*I geschnittenen Expressionsvektor pGEX-6P-1 ligiert.

Nach Transformation von *E. coli* XL1-Blue erhaltene Klone wurden durch Kolonie-PCR analysiert, wobei die in der PCR-Amplifikation des jeweiligen DNS-Sequenzabschnittes verwendeten Oligonukleotide erneut zum Einsatz kamen. Plasmid-DNS positiv identifizierter Klone wurde zunächst in kleinem Massstab präpariert und einer Restriktionsanalyse unterzogen, wobei unter Restriktion mit *Bam*HI oder *Xho*I DNS-Fragmente entsprechend den vorab berechneten Gesamtgrößen der erzeugten Plasmide, bei *Bam*HI/*Xho*I Restriktion DNS-Fragmente entsprechend der Größe des einklonierten DNS-Fragments und *Bam*HI/*Xho*I-geschnittenen pGEX-6P-1 resultierten. Somit fehlerfreie Plasmide wurden in grösserem Massstab präpariert und das Auftreten unerwünschter Mutationen im einklonierten DNS-Sequenzabschnitt durch Sequenzierung der erzeugten Expressionsvektoren pGEX-6P-1-GGA1, pGEX-6P-1-GGA1_2-361_wt, pGEX-6P-1-GGA1_2-361_Ser354Asp, pGEX-6P-1-GGA1_2-326, pGEX-6P-1-GGA1_2-301, pGEX-6P-1-GGA3, pGEX-6P-1-GGA3_2-391_wt und pGEX-6P-1-GGA3_2-391_Ser384Asp ausgeschlossen. Dabei wurde auch die erfolgreiche Einführung der Ser354Asp Mutation bzw. Ser384Asp Mutation bestätigt. Die Kenndaten der erzeugten Expressionsvektoren sind in *Tab. 13* im Anhang dieser Arbeit zusammengefasst.

A.2.3.2 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Alle GGA1/3 Fragmente wurden im *E. coli* Expressionstamm Rosetta2(*DE3*) als N-terminale Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* überproduziert. Zwecks Produktion der verschiedenen GGA1/3 Fragmente wurde der *E. coli* Expressionstamm Rosetta2(*DE3*) mit den Vektoren pGEX-6P-1-GGA1, pGEX-6P-1-GGA1_2-361_wt, pGEX-6P-1-GGA1_2-361_Ser354Asp, pGEX-6P-1-GGA1_2-326, pGEX-6P-1-GGA1_2-301, pGEX-6P-1-GGA3, pGEX-6P-1-GGA3_2-391_wt oder pGEX-6P-1-GGA3_2-391_Ser384Asp transformiert. Die Bakterien wurden in LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (20 µg/ml) im Schüttelinkubator bei 37 °C (28 °C im Falle von GGA1) angezogen. Die Expression wurde in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,1 mM induziert. Die Zellernte erfolgte

3 h (12-16 h im Falle von GGA1) nach Induktion durch Zentrifugation bei 6000×g für 10 min. Das Medium wurde verworfen und die Zellen in 50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

A.2.4 Produktionsversuche in Insektenzellen

A.2.4.1 Zellkultur (Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystem)

Das Bac-To-Bac® Baculovirus Expressionssystem (Invitrogen, Karlsruhe) bietet eine schnelle und effiziente Methode der Erzeugung rekombinanter Baculoviren (Ciccarone *et al.*, 1997) für die Expression eines Gens in Insektenzellen. Die Methode basiert auf der ortsgerichteten Transposition einer Expressionskassette von einem Donorplasmid (z.B. pFastBac™-HT-B) in einen Baculovirus Transfervektor (Bacmid) der in *E. coli* vermehrt wird (Luckow *et al.*, 1993).

A.2.4.2 Klonierungen in pFastBac™-HT-B

In der vorliegenden Arbeit wurde pFastBac™-HT-B als Donorplasmid verwendet, in das für GGA1, GGA3 sowie GGA1_2-361 und GGA3_2-391 kodierende DNS-Sequenzabschnitte unter Verwendung der *Bam*HI und *Xho*I-Restriktionsschnittstellen inkloniert wurden. Dabei wurde analog der Klonierung dieser DNS-Sequenzabschnitte in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 vorgegangen (A.2.3.1).

A.2.4.3 Präparation rekombinanter Bacmid-DNS

Zur Erzeugung rekombinanter Bacmid-DNS wurde *E. coli* DH10Bac™ mit den erzeugten Donorplasmiden pFastBac-HT-B-GGA1, pFastBac-HT-B-GGA3, pFastBac-HT-B-GGA1_2-361 oder pFastBac-HT-B-GGA3_2-391 transformiert. Die Transformanten wurden auf Selektivmedium (LB-Agar mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µg/ml X-Gal und 40 µg/ml IPTG) ausplattiert. Die Identifikation von Kolonien mit rekombinantem Bacmid erfolgte durch Blau/Weiss-Selektion nach 48 h Inkubation bei 37 °C. Weisse Einzelkolonien wurden erneut auf das Selektivmedium übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei Bestätigung des weissen Phänotyps

wurde der entsprechende Klon in 100 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetracyclin angezogen, Bacmid-DNS präpariert (A.2.2.2) und die erfolgreiche Transposition durch PCR-Analyse der Bacmid-DNS verifiziert. Eine PCR-Reaktion enthielt dabei 100 ng Bacmid-DNS, je 10 pmol der Oligonukleotide M13_forward und M13_reverse, 400 µM jedes dNTPs, 2,5 µl 10×*Taq*-Puffer, 1 U *Taq*-Polymerase und bidestilliertes Wasser auf das Endvolumen von 25 µl. Die PCR-Reaktion wurde in einem Eppendorf Thermocycler Gradient unter Anwendung des folgenden Temperaturprogrammes durchgeführt:

- Denaturierung	93 °C	3 min
- 30 Zyklen		
- Denaturierung	94 °C	45 s
- Hybridisierung	55 °C	45 s
- Verlängerung	72 °C	5 min
- Verlängerung	72 °C	7 min

Die Präsenz des klonierten DNS-Sequenzabschnittes in der präparierten Bacmid-DNS wurde durch DNS-Agarose-Gelelektrophorese anhand des Auftretens eines PCR-Produktes mit einer Grösse von etwa 2430 bp + der Grösse des klonierten DNS-Sequenzabschnittes verifiziert.

A.2.4.4 Transfektion von Insektenzellen und Präparation rekombinanter Baculoviren

Die Transfektion von *Sf21* Zellen erfolgte in 35 mm Zellkulturschalen. Etwa 9×10^5 *Sf21* Zellen wurden in 2 ml Sf-900 II SFM Medium suspendiert und mindestens eine Stunde bei 27 °C inkubiert. Zur Herstellung von DNS:Lipid Komplexen wurden verdünnte Lösungen gereinigter Bacmid-DNS (1 µg Bacmid-DNS in 100 µl Grace's Medium) und des Cellfectin[®]-Reagenz (6 µl in 100 µl Grace's Medium) gemischt und etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Sf-900 II SFM Medium wurden die Zellen einmal mit 2 ml Grace's Medium gewaschen und die DNS:Lipid Komplexe nach Zusatz von 0,8 ml Grace's Medium komplett zu den Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden bei 27 °C wurden die DNS:Lipid Komplexe durch 2 ml Sf-900 II SFM Medium ersetzt. Nach etwa 72 Stunden Inkubation bei 27 °C wurde das Virus-enthaltende

Medium abgenommen, zum Entfernen von Zellmaterial 5 min bei 500×g zentrifugiert und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

A.2.4.5 Expressionstests in High Five™ Zellen

Expressionsversuche mit High Five™ Zellen wurden in 35 mm Zellkulturschalen durchgeführt, wobei die Infektion der Zellen mit rekombinanten Baculoviren in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml erfolgte. Dabei wurde eine Viruslösung mit einem Titer von 1×10^7 pfu/ml verwendet und 1-5 pfu/Zelle eingesetzt. Die Expression des Zielproteins wurde durch Vergleich von Zellproben mit einer nichtinfizierten Kontrolle nach 24, 48 und 72 h durch SDS-PAGE verfolgt.

A.2.5 Reinigung von GGA Fragmenten

A.2.5.1 Zellaufschluss und Herstellung von Rohextrakten

GGA1/3 Fragmente überproduzierende *E. coli* Zellen wurden in 50 mM TRIS/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF im Microfluidizer 110 S bei einem Druck von 550 kPa unter Kühlung der Druckzelle aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 30000×g für 30 min sedimentiert, der geklärte Überstand abgenommen und weiterverarbeitet.

A.2.5.2 Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose

Alle chromatographischen Reinigungsschritte wurden bei 4 °C an einer ÄKTA *prime* FPLC-Anlage (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Rohextrakte wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min auf eine mit 50 mM TRIS/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT äquilibrierte GSH-Sepharosesäule aufgetragen und solange gewaschen, bis die Absorption der Probe bei 280 nm wieder den Ausgangswert erreicht hatte, also nicht an das Säulenmaterial gebundene Proteine abgetrennt waren. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 50 mM TRIS/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM reduziertem Glutathion.

A.2.5.3 Proteolyse mit PreScission-Protease

GGA1/3 Fragmente wurden nach Anreicherung an GSH-Sepharose durch Proteolyse mit PreScission-Protease aus dem GST-Fusionsprotein freigesetzt. Die Proteolyse erfolgte über Nacht, wobei die Proben gegen 50 mM TRIS/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT dialysiert wurden.

Zur Trennung der GGA1/3 Fragmente von freiem GST sowie der PreScission-Protease, bei der es sich selbst um ein GST-Fusionsprotein handelt, wurden die Proben erneut durch Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt (A.2.5.2).

A.2.5.4 Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie an Phenylsepharose

Nach proteolytischer Abspaltung des GST erfolgte die weitere Reinigung von GGA1 und GGA3 sowie der Fragmente GGA3_2-391_wt und GGA3_2-391_Ser384Asp durch Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie an Phenylsepharose. Die jeweilige Proteinlösung wurde über Nacht gegen Puffer B (50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 1 mM DTT) dialysiert und die Ammoniumsulfat-Konzentration der Probe durch vorsichtige Zugabe von 3 M Ammoniumsulfat in Puffer B auf 0,5 M eingestellt. Die Probe wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min auf eine mit Puffer A (Puffer B + 0,5 M Ammoniumsulfat) äquilibrierte Phenylsepharose 16/10 Säule geladen. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0% - 100% Puffer B über 10 Säulenvolumen.

A.2.5.5 Ionenaustauschchromatographie an Source30Q

Die Reinigung von GGA1_2-361_wt, GGA1_2-361_Ser354Asp und GGA1_2-326 erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie. Die Proteinlösung wurde über Nacht gegen Puffer A (50 mM TRIS/HCl, pH 8,5, 1 mM DTT dialysiert) und bei einer Flussrate von 2 ml/min auf eine mit Puffer A äquilibrierte 15 ml Source30Q Säule aufgetragen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten steigender NaCl-Konzentration (Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl) über bis zu 30 Säulenvolumen.

A.2.5.6 Konzentrieren von Proteinlösungen

Das Volumen von Proteinlösungen wurde durch Ultrafiltration in VivaSpin-Konzentratoren verringert. Die Ausschlussgrösse der Membranen war 30 kDa (GGA1,

GGA3) oder 10 kDa (GGA1_2-361_wt, GGA1_2-361_Ser354_Asp, GGA1_2-326, GGA3_2-391_wt, GGA3_2-391_Ser384Asp).

A.2.5.7 Grössenausschlusschromatographie

Die GGA1/3 Fragmente wurden abschliessend durch Grössenausschlusschromatographie gereinigt und in 20 mM HEPES-NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM DTT überführt. Bei der Reinigung von GGA1, GGA3 und GGA3_2-391 (wildtyp bzw. Ser384Asp) wurde das Gelfiltrationsmaterial Superdex200 verwendet. Die Reinigung von GGA1_2-361 (wildtyp bzw. Ser354Asp) erfolgte unter Verwendung von Superdex75.

A.2.5.8 Lagerung der gereinigten Proben

Die gereinigten GGA1/3 Fragmente wurden nach Konzentration auf 10 mg/ml aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A.2.6 Kristallisation

A.2.6.1 Durchmusterung von Kristallisationsbedingungen

In der Abteilung standen verschiedene Reihentests zur Verfügung, die zwecks Durchmusterung möglicher Kristallisationsbedingungen zum Einsatz kamen.

- *Crystal Screen 1, 2, Lite; PEG/Ion Screen* (Hampton Research, USA)
- *JB Screens 1-10* (Jena Biosciences, Jena)
- *Magic Screen 1-4* (Biogenova, Kanada)
- *Footprint Screens 1-3*
- *Structure Screens 1-3* (Molecular Dimensions, England)

In Kristallisationsversuchen kam bevorzugt die Kristallisation durch Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen, unter Verwendung von Cryschem-Platten (Hampton-Research, USA) zur Anwendung. Teilweise wurde auch die Kristallisation durch Dampfdiffusion im hängenden Tropfen angewandt.

A.2.6.2 Bestimmung der Beugungseigenschaften von Kristallen

Kristalle wurden zum Testen ihrer Beugungseigenschaften bei 100 K mit Hilfe einer Nylonschleife aus dem Kristallisationsansatz entnommen, eventuell in eine geeignete Kryolösung überführt, in flüssigem Stickstoff oder im Kühlstrahl der Kryoanlage am Röntgendiffraktometer verglast und auf einem Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls mit der Rotationsachse montiert. Für Tests bei Raumtemperatur wurden Kristalle mit Kristallisationslösung in eine Quarzkapillare gesaugt und mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette von der Kristallisationslösung befreit. Um ein Austrocknen des Kristalls zu vermeiden, wurde an einem Ende der Kapillare Kristallisationslösung zugegeben. Die Kapillare wurde mit Hartwachs an beiden Enden versiegelt und mit Knetmasse am Goniometerkopf befestigt. Die Tests erfolgten an einem MicroMax-007 Röntgenerators (Rigaku, Tokio) ausgestattet mit einem mar345dtb Detektor (MAR-Research, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 1,5418 Å (Kupferdrehanode).

A.3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war die Strukturbestimmung eines vollständigen GGA-Proteins bzw. von GGA Fragmenten, die eine Aussage über die relative Orientierung einzelner GGA-Domänen zueinander erlauben. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins durch die Methode der Röntgenkristallographie erfordert zunächst grössere Mengen reinen Proteins für Kristallisationsexperimente. Häufig ist es schwierig, ausreichende Mengen des zu untersuchenden Proteins aus seiner natürlichen Quelle zu isolieren. Eine mögliche Lösung dieses Problems stellt die heterologe Expression des klonierten Gens, beispielsweise in *Escherichia coli* oder Zellkulturen dar.

A.3.1 Auswahl von GGA Fragmenten

Für die Bestimmung der Struktur eines intakten GGA-Proteins wurden GGA1 und GGA3 aus *Mus musculus* gewählt. Eine häufige Vorgehensweise bei der Kristallisation von Proteinen ist die Modifikation des Makromoleküls, beispielsweise durch N- und/oder C-terminale Verkürzung. Dies hat sich zur Verbesserung der Aussichten auf eine erfolgreiche Kristallisation bewährt. Dabei orientiert man sich häufig an Vorhersagen über die Sekundärstruktur des Proteins bzw. seiner Domänenorganisation. Für eine Aussage hinsichtlich der relativen Orientierung der VHS- zur GAT-Domäne sowie zur Untersuchung der Annahme, dass diese Domänen zusammen eine grosse rechtsgängige Superhelix bilden, wäre die Strukturbestimmung eines Fragmentes ausreichend, das nur diese Domänen umfasst. Hierfür wurde das Fragment GGA1_2-301 und das geringfügig längere Fragment GGA1_2-326 gewählt. Zur Strukturaufklärung der verschiedenen Konformationszustände von GGA1 und GGA3, die aus der intramolekularen Bindung der autoinhibitorischen Sequenz im Bereich des Hinge-Segments an die VHS-Domäne resultieren, sind Fragmente erforderlich, die mindestens die N-terminale VHS-Domäne, die GAT-Domäne sowie einen Teil der Hinge-Region umfassen und C-terminal mit der autoinhibitorischen Sequenz enden. Zu diesem Zweck wurden die Fragmente GGA1_2-361 bzw. GGA3_2-391 gewählt. Die Bindung der autoinhibitorischen Sequenz an die VHS-Domäne wird durch die Phosphorylierung eines Serinrestes reguliert (Gosh & Kornfeld, 2003) und der phosphorylierte Serinrestes kann durch Austausch gegen einen

Asparaginsäurerest nachgeahmt werden. Zur Strukturbestimmung der autoinhibierten Form wurden daher die Fragmente GGA1_2-361_Ser354Asp und GGA3_2-391_Ser384Asp gewählt.

A.3.2 Produktion von GGA1/3 Fragmenten in *E. coli*

Für die Produktion in *E. coli* wurden für die verschiedenen GGA1/3 Fragmente kodierende DNS-Sequenzabschnitte in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 kloniert und die GGA1/3 Fragmente als GST-Fusionsproteine (Abb. 7) in *E. coli* Rosetta2(DE3) produziert.

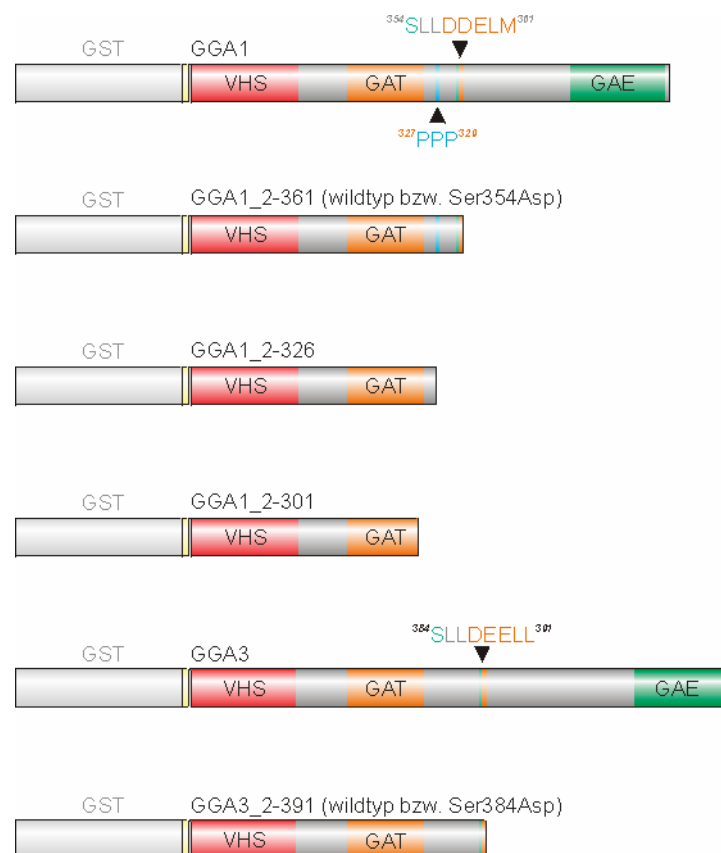


Abb. 7 Schematische Darstellung der in *E. coli* als GST-Fusionsproteine produzierten Fragmente von GGA1 und GGA3.

Mit Ausnahme von GST-GGA1 wurden alle Fragmente nach Induktion der Expression mit 0,1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 über einen Zeitraum von 3 Stunden bei 37 °C deutlich überproduziert. Bei der Produktion des GST-GGA1 Fusionsproteins wurde hauptsächlich ein Produkt mit einem Molekulargewicht von 70 kDa erhalten, während es zu keiner erkennbaren Produktion von GST-GGA1 kam. Durch Verlängerung des

Expressionszeitraumes auf 12 – 16 Stunden und gleichzeitiger Senkung der Temperatur auf 28 °C wurden geringe Mengen des GST-GGA1 Fusionsproteins, daneben jedoch weiterhin das 70 kDa Protein produziert.

A.3.3 Reinigung der in *E. coli* produzierten GGA1/3 Fragmente

Für Kristallisationsexperimente werden möglichst reine Präparationen des zu untersuchenden Proteins benötigt. Deshalb wurden zunächst Protokolle für die Reinigung der verschiedenen GGA1/3 Fragmente etabliert. Die in *E. coli* als GST-Fusion produzierten Fragmente von GGA1/3 (Abb. 7) wurden durch Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose angereichert und durch Proteolyse mit PreScission-Protease aus dem GST-Fusionsprotein freigesetzt, was anhand der Verringerung des Molekulargewichtes um etwa 26 kDa bei gleichzeitigem Auftreten von freiem GST (26 kDa) durch SDS-PAGE verfolgt wurde (Abb. 31 – Abb. 35 im Anhang). Das bei der Produktion von GST-GGA1 beobachtete 70 kDa Protein unterlag ebenfalls dieser Molekulargewichtsänderung. Wahrscheinlich handelte es sich um ein Produkt unvollständiger Synthese von GST-GGA1. Im Falle des Fragmentes GGA1_2-301 führte die proteolytische Abspaltung des GST zu einer dramatisch verringerten Löslichkeit des Fragmentes, und es kam zur Präzipitation des Zielproteins. GGA1_2-301 konnte demzufolge nicht gereinigt werden. Das freigesetzte GST wurde durch erneute Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose abgetrennt. Verbliebene Kontaminationen wurden im Falle der Fragmente GGA1, GGA3 und GGA3_2-391 (wildtyp bzw. Ser384Asp) durch Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie an Phenylsepharose, im Falle der Fragmente GGA1_2-361 (wildtyp bzw. Ser354Asp) und GGA1_2-326 durch Ionenaustauschchromatographie am Anionenaustauscher Source30Q von den GGA1/3 Fragmenten getrennt. Durch Grössenausschlusschromatographie wurden letzte Kontaminationen abgetrennt und die GGA1/3 Fragmente in 20 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT überführt. Interessanterweise eluierten die verschiedenen GGA1/3 Fragmente dabei nicht entsprechend ihrem berechneten Molekulargewicht, sondern bei geringeren Elutionsvolumina (Tab. 3). Beispielsweise eluierte GGA1 bei einem Volumen von 61 ml, entsprechend eines Molekulargewichts von etwa 270 kDa, von der in diesem Fall verwendeten Superdex200 16/60 Gelfiltrationssäule. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen zur Autoinhibition von GGA1 (Gosh & Kornfeld, 2003). Diese zeigten, dass GGA1 in nicht-phosphorylierter Form das Laufverhalten eines 300 kDa-Proteins

aufweist, bei Phosphorylierung jedoch entsprechend seines tatsächlichen Molekulargewichts eluiert und dass das unterschiedliche Laufverhalten nicht mit einer Oligomerisierung von GGA1, sondern durch eine Konformationsänderung des Moleküls zu erklären ist. Somit ist das beobachtete Laufverhalten der GGA Fragmente wahrscheinlich nicht auf eine Oligomerisierung der Fragmente zurückzuführen, sondern mit der gestreckten Form der GGA-Proteine in ihrer nicht-autoinhibierten Form zu erklären. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass die wildtyp und Ser354Asp Varianten des GGA1_2-361 Fragments bei identischen Volumina eluierten. Dies ist auch für die wildtyp und Ser384Asp Varianten des GGA3_2-391 Fragments zutreffend. Dies deutet darauf hin, dass es durch die Einführung der Ser354Asp bzw. Ser384Asp Mutation nicht zu einer Konformationsänderung der Fragmente kam. Wahrscheinlich lagen alle Varianten in der nicht-autoinhibierten Konformation vor.

Tab. 3 Elutionsverhalten der GGA1/3 Fragmente bei der Reinigung durch Grössenausschlusschromatographie.

GGA-Fragment	Molekulargewicht	verwendete Gelfiltrationssäule	Elutionsvolumen / entsprechendes Molekulargewicht
GGA1	70 kDa	Superdex200 16/60	61 ml / 270 kDa
GGA1_2-361_wt	41 kDa	Superdex75 16/60	45 ml / 160 kDa
GGA1_2-361_Ser354Asp	41 kDa	Superdex75 16/60	45 ml / 160 kDa
GGA1_2-326	37 kDa	Superdex75 26/60	150 ml / 60 kDa
GGA3	78 kDa	Superdex200 16/60	55 ml / 410 kDa
GGA3_2-391_wt	44 kDa	Superdex200 16/60	65 ml / 200 kDa
GGA3_2-391_Ser384Asp	44 kDa	Superdex200 16/60	65 ml / 200 kDa

Aufgrund der geringen Produktion von GGA1 war die Ausbeute an sauberem Protein mit etwa 0,05 mg pro Liter *E. coli* Kultur extrem gering und nicht für Kristallisationsexperimente ausreichend. Die Ausbeuten an sauberem GGA3, GGA3_2-391 (wildtyp bzw. Ser384Asp), GGA1_2-361 (wildtyp bzw. Ser354Asp) und GGA1_2-326 (*Abb. 8*) betragen 1 bis 3 mg Protein pro Liter *E. coli* Kultur (*Tab. 4*) und waren ausreichend für die Durchmusterung verschiedener Kristallisationsbedingungen.

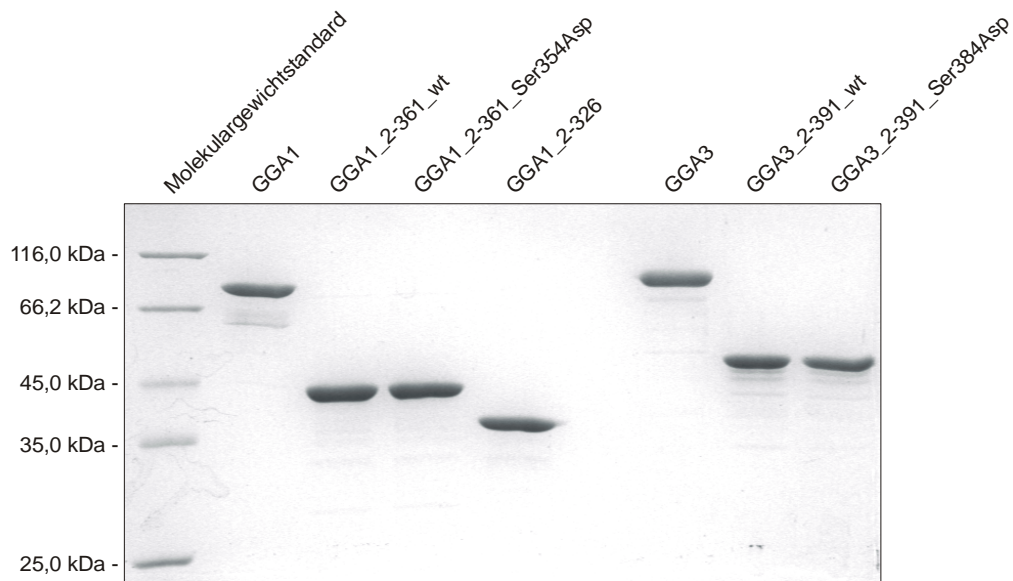


Abb. 8 12% SDS-PAGE der gereinigten GGA1/3 Fragmente.

Tab. 4 Ausbeuten an sauberen GGA1/3 Fragmenten pro Liter *E. coli* Kultur.

gereinigtes Fragment	Ausbeute pro Liter <i>E. coli</i> Kultur
GGA1	0,05 mg
GGA1_2-361_wt	2,5 mg
GGA1_2-361_Ser354Asp	2,5 mg
GGA1_2-326	3 mg
GGA3	1 mg
GGA3_2-391_wt	1,5 mg
GGA3_2-391_Ser384Asp	1,5 mg

A.3.4 Produktionsversuche in Insektenzellen

Neben der Produktion der verschiedenen GGA1/3 Fragmente in *E. coli*, wurde auch eine Produktion der Fragmente GGA1, GGA1_2-361, GGA3 und GGA3_2-391 in Insektenzellen unter Verwendung des Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expressionssystems versucht. Für die Produktion in Insektenzellen wurden für GGA1, GGA1_2-361, GGA3 und GGA3_2-391 kodierende DNS-Sequenzabschnitte durch PCR amplifiziert und in das Donorplasmid pFastBac-HT-B kloniert (Abb. 9). Das Auftreten unerwünschter Mutationen wurde durch Sequenzierung der erhaltenen Plasmide pFastBac-HT-B-GGA1, pFastBac-

HT-B-GGA1_2-361, pFastBac-HT-B-GGA3 und pFastBac-HT-B-GGA3_2-391 ausgeschlossen.

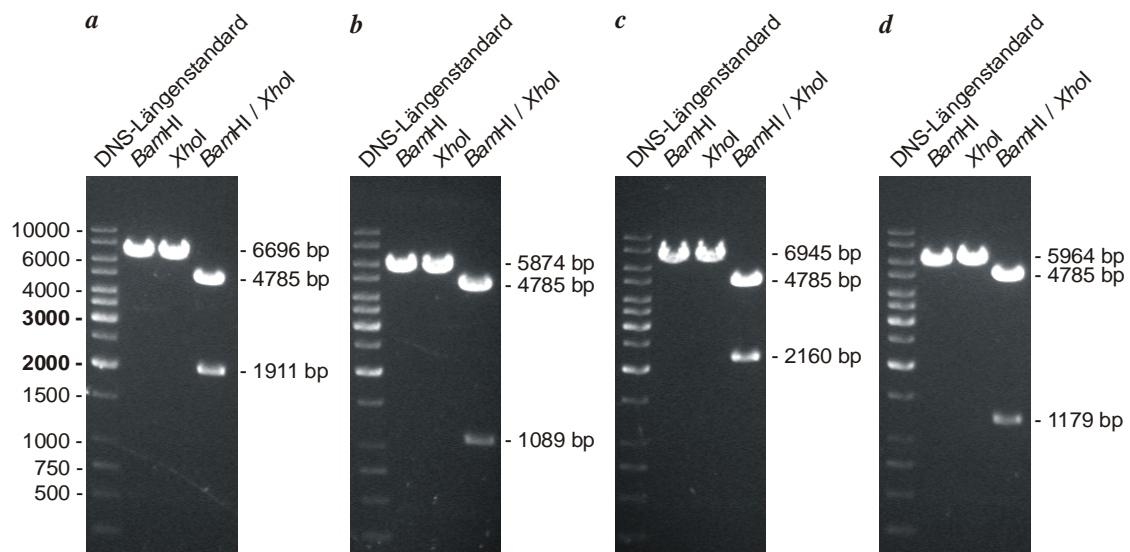


Abb. 9 Restriktionsanalyse der erzeugten Plasmide pFastBac-HT-B-GGA1 (a), pFastBac-HT-B-GGA1_2-361 (b), pFastBac-HT-B-GGA3 (c) und pFastBac-HT-B-GGA3_2-391 (d).

Die Erzeugung rekombinanter Bacmid-DNS in *E. coli* DH10Bac™ wurde durch PCR-Analyse der gereinigten Bacmid-DNS untersucht, wobei die Transposition der für die verschiedenen GGA Fragmente kodierenden DNS-Sequenzabschnitte in das Bacmid anhand des Auftretens eines PCR-Produktes mit einer Grösse von etwa 2430 bp + der Grösse des klonierten DNS-Sequenzabschnittes bestätigt wurde (Abb. 10).

Die Produktion von Baculoviren wurde durch Analyse des Mediums durch SDS-PAGE nachgewiesen. Dabei wurde die prominente Bande eines etwa 64 kDa Proteins sichtbar, bei dem es sich um das virale Hüllenprotein gp64 handelt. Nach Präparation rekombinanter Baculoviren wurde die Expression von GGA1 und GGA3 sowie der Fragmente GGA1_2-361 und GGA3_2-391 Fragmente in High Five™ Zellen versucht. Unter Variation der eingesetzten Virenzahl (1-5 pfu/Zelle) war über einen Zeitraum von 72 h keine Überproduktion der GGA Fragmente durch SDS-PAGE anhand des Auftretens einer zusätzlichen Bande mit einem dem jeweiligen Produkt entsprechenden Molekulargewicht nachzuweisen (Abb. 11). Für eine effiziente Produktion der Fragmente für Kristallisationsexperimente, in denen Proteinmengen im Milligrammaßstab benötigt werden, waren High Five™ Zellen folglich nicht geeignet.

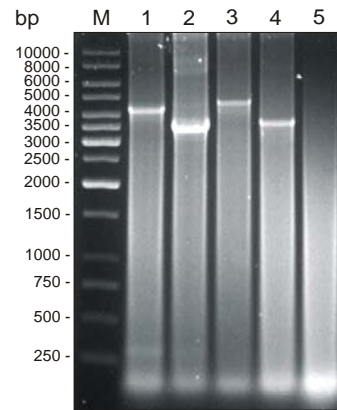


Abb. 10 Analyse von Bacmid-DNS durch PCR. Die Präsenz der für GGA1 [1], GGA1_2-361 [2], GGA3 [3] bzw. GGA3_2-391 [4] kodierenden DNS-Abschnitte in der präparierten Bacmid-DNS wurde durch das Auftreten eines PCR-Produktes mit einer Grösse von etwa 2430 bp + der Grösse des klonierten DNS-Sequenzabschnittes bestätigt. [5] Kontrolle ohne Zugabe von Bacmid-DNS, [M] DNS-Längenstandard.

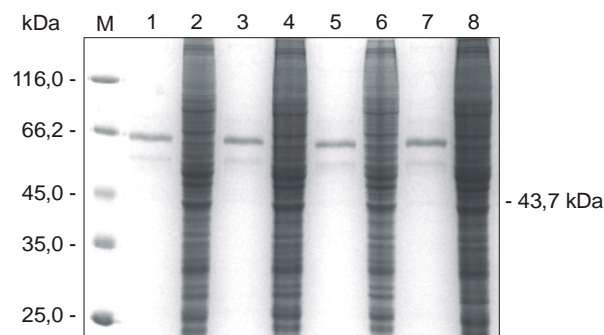


Abb. 11 Analyse der Produktion in High-Five Zellen am Beispiel von His₆-GGA1_2-361 durch SDS-PAGE. Die Produktion des Zielproteins (43,7 kDa) wurde durch Vergleich von Zellproben nach 24 [4], 48 [6] und 72 Stunden [8] mit einer nichtinfizierten Kontrolle [2] verfolgt. Über einen Zeitraum von 72 h konnte keine Überproduktion von His₆-GGA1_2-361 festgestellt werden. Das virale Hüllenprotein gp64 wurde in der Viruslösung [1] als auch im Kulturmedium nachgewiesen [3, 5, 7]. [M] Molekulargewichtstandard.

A.3.5 Kristallisation der gereinigten GGA1/3 Fragmente

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins durch die Methode der Röntgenkristallographie erfordert zunächst die Kristallisation des zu untersuchenden Makromoleküls. Die gereinigten GGA1/3 Fragmente wurden in Kristallisationsexperimenten eingesetzt, wobei für eine erste Durchmusterung möglicher

Kristallisationsbedingungen zunächst die *Footprint Screens* sowie *Crystal Screen 1*, *Crystal Screen 2*, *Crystal Screen Lite* und *PEG/ION Screen* (insgesamt 264 unterschiedliche Bedingungen) zur Ermittlung einer geeigneten Proteinkonzentration verwendet wurden. Anschliessend wurden alle in der Abteilung vorhandenen *Screens* zur Bestimmung einer möglichen Kristallisationsbedingung bei 4 °C und 20 °C eingesetzt. Eine Kristallisationsbedingung konnte dabei lediglich für das GGA1_2-361 Fragment ermittelt werden. In anderen Fällen erhaltene Kristalle erwiesen sich beim Test am Röntgendiffraktometer als Salzkristalle.

A.3.5.1 Kristallisation von GGA1_2-361_wt

Erste Kristalle von GGA1_2-361_wt wurden bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml unter Verwendung des *Crystal Screen 1* bei 20 °C erhalten. In Bedingung 25 (1,0 M Natriumacetat, 0,1 M Imidazol pH 6,5) bildeten sich nach etwa 1 Woche sehr kleine Kristalle in Präzipitat (*Abb. 12a*). Diese Kristalle waren zu klein für Röntgenbeugungsexperimente. Durch die systematische Variation der Kristallisationslösung wurden grössere Kristalle erhalten: Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen von Natriumacetat unter gleichzeitiger Variation des pH-Wertes getestet. Kleine Kristalle wurden reproduzierbar unter Verwendung von 1,0 – 1,2 M Natriumacetat pH 5,5 – 5,9 erhalten, wobei der pH-Wert der Lösung mit Essigsäure eingestellt und auf die Zugabe einer weiteren Puffersubstanz verzichtet wurde (*Abb. 12b*). Auch andere Salze der Essigsäure erwiesen sich als geeignete Präzipitationsmittel. Kristalle wurden bei Verwendung von 1,2 – 1,4 M Ammoniumacetat oder 1,5 – 1,7 M Lithiumacetat erhalten, während Kaliumacetat, Magnesiumacetat oder Zinkacetat das Protein amorph präzipitierten. Der für die Kristallbildung optimale pH-Wert lag bei pH 5,7.

Die Bedeutung des in der Originalbedingung enthaltenen Imidazol-Puffers wurde ebenfalls untersucht. Die Zugabe einer Puffersubstanz hatte Einfluss auf die Bildung der Kristalle. Ohne Zugabe einer Puffersubstanz blieben die Kristalle klein und sehr dünn. War eine Puffersubstanz, speziell MES oder Imidazol, zugesetzt, wurden grössere Kristalle erhalten (*Abb. 12c*). Deshalb wurde in weiteren Experimenten eine der beiden genannten Puffersubstanzen in einer Konzentration von 100 mM zugesetzt.

Das entscheidende Kriterium bei der Optimierung der Kristallisationsbedingungen ist die Beugungsqualität der erhaltenen Kristalle. Die Grösse der Kristalle muss nicht zwangsläufig mit einer besseren Beugungsqualität einhergehen. Die weitere Optimierung

der Kristallisationsbedingung erfolgte deshalb in Abhängigkeit des Streuverhaltens der Kristalle. Dabei wurden weitere Parameter, wie beispielsweise die Zusammensetzung der Kryolösung, optimiert (A.3.5.3).

Bei ersten Tests der erhaltenen Kristalle am Röntgendiffraktometer wurden zunächst kurze Expositionszeiten bei gleichzeitiger Rotation über einen weiten Bereich (5°) angewandt. Auch unter schrittweiser Verlängerung der Expositionszeit wurden keine Reflexe gemessen. Dies ist ein wichtiger Befund, der zeigt, dass es sich bei den erhaltenen Kristallen nicht um Salzkristalle handelt. Allerdings waren die Kristalle von sehr schlechter Qualität und nicht für eine Strukturbestimmung geeignet.

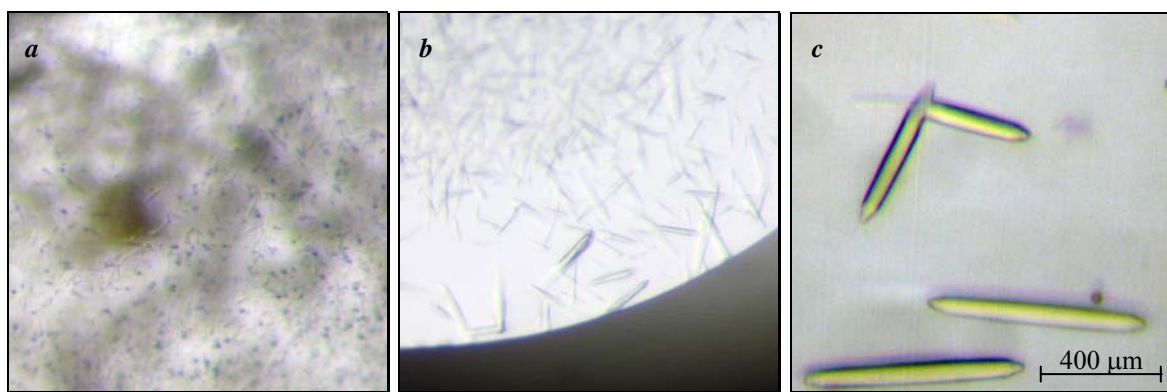


Abb. 12 Verfeinerung der Bedingungen für die Kristallisation von GGA1_2-361. (a) Erste Kristalle in 1 M Natriumacetat, 100 mM Imidazol/HCl pH 6,5. (b) Geringfügig grössere Kristalle in 1,2 M Natriumacetat pH 5,7. (c) Kristalle in 1,3 M Ammoniumacetat pH 5,7, 100 mM Imidazol/HCl pH 5,7.

Zur Verbesserung der Kristallqualität wurden die gefundenen Grundbedingungen durch Zugabe von Additiven weiter modifiziert. Grössere Kristalle wurden unter Verwendung von Ethylenglykol, aber auch verschiedenen PEGs erhalten. Nach Modifikation der Kristallisationsbedingung hin zu 1,3 M Ammoniumacetat pH 5,7, 100 mM Imidazol/HCl pH 5,7, 5% (v/v) Ethylenglykol wurden Kristalle erhalten, die hinsichtlich der Beugungseigenschaften die besten Ergebnisse lieferten (Abb. 13a). Im günstigsten Fall waren einige wenige Reflexe, bis zu einer maximalen Auflösung von etwa 15 \AA zu erkennen (Abb. 13b). Dies zeigte eindeutig, dass es sich bei den erhaltenen Kristallen um Proteinkristalle handelt. Aufgrund der geringen Anzahl der Reflexe war eine Indizierung (Bestimmung der Raumgruppensymmetrie) der Kristalle nicht möglich. Die Qualität der Kristalle liess sich durch Variation der Kristallisationsbedingungen nicht weiter verbessern.

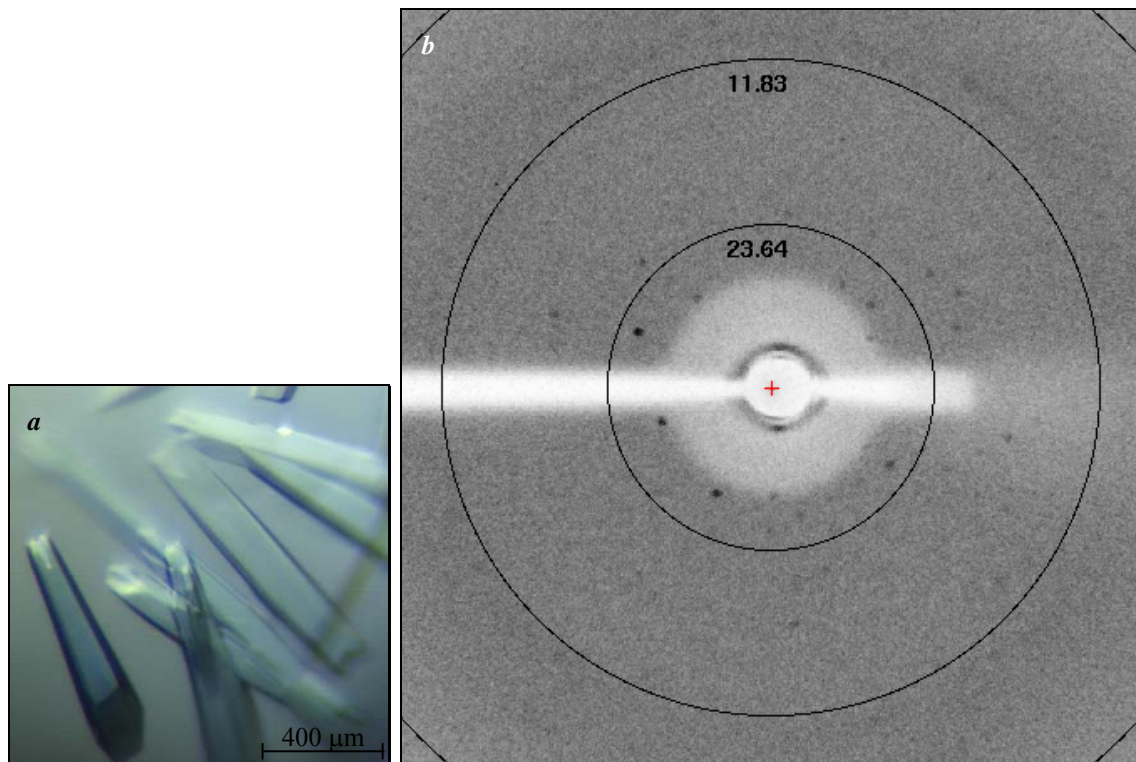


Abb. 13 (a) Kristalle von GGA1_2-361_wt in 1,3 M Ammoniumacetat pH 5,7, 100 mM Imidazol/HCl pH 5,7, 5% (v/v) Ethylenglycol. (b) Beugungsbild eines solchen Kristalls. Die erreichte Auflösung betrug etwa 15 Å.

A.3.5.2 Kristallisation von GGA1_2-361_Ser354Asp – Vergleich des Kristallisationsverhaltens mit GGA1_2-361_wt

GGA1_2-361_Ser354Asp wurde zur Kristallisation und Strukturbestimmung der autoinhibierten Konformation dieses Fragmentes entworfen. Dieses Fragment unterscheidet sich lediglich durch die eingeführte Ser354Asp Mutation von der wildtyp Variante. Obwohl in einer ersten Durchmusterung möglicher Kristallisationsbedingungen keine Kristalle von GGA1_2-361_Ser354Asp erhalten wurden, zeigte das Fragment in den getesteten Kristallisationsbedingungen ein ähnliches Löslichkeitsverhalten wie GGA1_2-361_wt. Folglich wurden die für GGA1_2-361_wt optimierten Kristallisationsbedingungen auch für die Ser354Asp Mutante getestet. Dabei wurden Kristalle erhalten, die hinsichtlich der Beugungsqualität mit den GGA1_2-361_wt Kristallen vergleichbar waren. Offenbar hatte die Einführung der Ser354Asp Mutation keinen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten der GGA1_2-361 Variante sowie die Beugungseigenschaften der Kristalle. Dies ist vermutlich damit zu begründen, dass die Ser354Asp Mutante nicht in

einer autoinhibierten Konformation vorlag. Dies steht im Einklang mit dem während der Reinigung durch Grössenausschlusschromatographie beobachteten identischen Laufverhalten der GGA1_2-361_wt und GGA1_2-361_Ser354Asp Fragmente.

A.3.5.3 Ermittlung geeigneter Kryolösungen

Proteinkristalle sind empfindlich gegenüber Röntgenstrahlung. Zur Verringerung von Strahlenschäden hat sich die Datensammlung bei 100 K bewährt (Hope, 1988, 1990; Rodgers, 1997; Garman, 1999). Dies erlaubt vor allem die Aufnahme ganzer Datensätze von einem einzelnen Kristall. Daneben bietet das Tiefkühlen von Kristallen weitere Vorteile. Beispielsweise trägt es zur Stabilisierung empfindlicher Kristalle bei und macht sie widerstandsfähiger gegen mechanische Beanspruchung. Ausserdem können die Kristalle über längere Zeiträume tiefgekühlt aufbewahrt werden. Das Tiefkühlen von Kristallen ist mit Problemen verbunden. Proteinkristalle zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Wasser (typischerweise 50% der Masse) aus. Werden Kristalle zu langsam abgekühlt, führt die mit dem Übergang von flüssigem Wasser zu hexagonalem Eis verbundene starke Volumenänderung zu einer Verringerung der Kristallqualität (Kriminski *et al.*, 2002). Die Bildung von Eis kann durch sehr schnelles Abkühlen der Kristalle verhindert werden, wodurch eine amorphe Form von Wasser entsteht. Andererseits kann das schnelle Abkühlen die Ordnung des Kristallgitters negativ beeinflussen, was in einer erhöhten Mosaizität und verringerten Beugungsqualität der Kristalle resultiert (Rodgers, 1994; Garman & Schneider, 1997). Diese Effekte sind der ungleichmässigen Abkühlung und unterschiedlichen Ausdehnung des Lösungsmittels und des Kristallgitters (Juers & Matthews, 2001; Kriminski *et al.* 2002) zuzuschreiben und besonders bei grossen Kristallen oder Kristallen mit einem hohen Lösungsmittelanteil von Bedeutung. Ein Ansatz, die durch schnelles Abkühlen induzierten negativen Effekte auszuschliessen, ist die Verwendung geeigneter Kryolösungen, die die Bildung von Eis verhindern.

Um geeignete Kryolösungen zu ermitteln wurde zunächst die Konzentration an Kryoprotektant bestimmt, bei der ein Tropfen der Kristallisationslösung/Kryoprotektant-Mischung amorph verfestigt werden konnte. War dies der Fall, wurde von der tiefgekühlten Kryolösung ein Beugungsbild aufgenommen, wobei 10 Sekunden bei gleichzeitiger Rotation um 5° bestrahlt wurde. Traten im Beugungsbild keine Eisringe auf (scharfe oder diffuse Ringe bei einer Auflösung von 3,44 Å, 3,67 Å oder 3,90 Å) wurde

davon ausgegangen, dass es nicht zu einer Bildung von Eiskristallen kam und die Kryolösung prinzipiell zum Tiefkühlen von Kristallen geeignet ist.

Für die Tieftemperaturmessung von GGA1_2-361 (wildtyp bzw. Ser354Asp) Kristallen waren vor allem Paraton N (Hampton Research), Perfluorpolyether oder Kristallisationslösung, die mit 20-25% (v/v) Glycerin komplettiert wurde, als Kryolösung geeignet. Unter Verwendung dieser Lösungen konnten reproduzierbar wenige Reflexe bei geringer Auflösung gemessen werden. Unter Verwendung anderer Kryolösungen streuten die Kristalle in keinem der durchgeführten Tests, auch wenn in den aufgenommenen Beugungsbildern keine Hinweise auf die Bildung von Eiskristallen sichtbar waren. Im Zuge der Verfeinerung des Prozesses wurden die Kristalle schrittweise in Kristallisationslösung mit ansteigenden Konzentrationen von Glycerin überführt. Diese Vorgehensweise wirkte sich nicht positiv auf die Streueigenschaften der Kristalle aus.

Eine wichtige Frage war, ob das Tiefkühlen der Kristalle einen generell negativen Einfluss auf ihr Streuverhalten hat. Zur Klärung wurden Kristalle in einer Quarzkapillare montiert und bei Raumtemperatur getestet. Dabei wurden in keinem der durchgeführten Tests Reflexe gemessen. Dies spricht dafür, dass das Tiefkühlen der Kristalle nicht verantwortlich für die schlechte Beugungsqualität der Kristalle ist. Vielmehr waren die Kristalle von vornherein ungeordnet. Da unter Verwendung der oben genannten Kryolösungen reproduzierbar Reflexe bei niedriger Auflösung gemessen wurden, scheinen diese einen positiven Einfluss auf die Beugungseigenschaften der Kristalle zu haben.

A.3.5.4 Manipulation der Kristalle zur Verbesserung ihrer Beugungseigenschaften

Das wahrscheinlich grösste Problem im Prozess der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ist der Erhalt von gut streuenden Kristallen. Es kommt häufig vor, dass Kristalle von schlechter Beugungsqualität sind und sich daher nicht für eine Strukturbestimmung eignen. In der Literatur sind verschiedene methodische Ansätze beschrieben, deren Anwendung in Einzelfällen zu einer Steigerung der Streueigenschaften von Kristallen führten. Dazu gehören das sogenannte *Annealing* sowie die Regulation des Lösungsmittelanteils von Kristallen. Da sich die Streueigenschaften der erhaltenen GGA1_2-361 (wildtyp bzw. Ser354Asp) Kristalle nicht durch die Variation der

Kristallisationslösung steigern liess, wurde die Anwendbarkeit dieser Methoden zur Verbesserung der Streueigenschaften der erhaltenen Kristalle untersucht.

A.3.5.4.1 *Annealing*

Eine schnelle und einfache Methode, die durch schnelles Abkühlen verursachte Unordnung von Kristallen zu reduzieren, ist das *Annealing* (Erwärmen und erneute Abkühlen) von Kristallen. In der Literatur sind prinzipiell drei verschiedene *Annealing*-Methoden beschrieben. Beim makromolekularen Kristall-*Annealing* wird der gefrorene Kristall aus dem Kühlstrahl entfernt, zurück in die Kryolösung überführt und nach 3 min Äquilibration erneut tiefgekühlt (Harp *et al.*, 1998). In der Methode des *flash-Annealing* wird der kalte Stickstoffstrahl dreimal für 1,5 – 2 s mit Intervallen von 6 s zwischen jedem Auftauen unterbrochen (Yeh & Hol, 1998). Eine Variation dieses Protokolls stellt das sogenannte *Annealing on the loop* dar, wobei der Kühlstrahl lediglich einmal solange unterbrochen wird, bis der Tropfen komplett aufgetaut ist (Harp *et al.*, 1999). *Annealing* wurde angewandt, wenn ein getesteter Kristall geringfügig streute. Keine der Methoden konnte die erreichte Auflösung steigern. Durch *flash-Annealing* oder *Annealing on the loop* konnten Artefakte, wie das Auftreten diffuser Eisringe, korrigiert werden. Unter Anwendung des makromolekularen Kristall-*Annealing* lösten sich die Kristalle nach ihrer Rückführung in die Kryolösung auf.

A.3.5.4.2 *Regulation des Lösungsmittelanteils der Kristalle*

Wasser spielt eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Struktur und Aktivität von Proteinmolekülen sowohl in Lösung als auch kristalliner Form (Frey, 1994; Timasheff, 1995). Es ist bekannt, dass die Reduzierung des Lösungsmittelanteils in Proteinkristallen in dichter gepackten und besser geordneten Kristallen und damit in einer Verbesserung ihrer Beugungseigenschaften resultieren kann (Salunke *et al.*, 1985; Frey, 1994). Durch Dehydratisierung von Kristallen wurden die wohl bemerkenswertesten Verbesserungen der Beugungsqualität von Proteinkristallen erzielt (Heras *et al.*, 2003; Abergel, 2004). Die Dehydratisierung von Kristallen kann durch den Transfer in Dehydrierungslösung (Kristallisationslösung mit einer erhöhten Konzentration des Präzipitationsmittels oder Kristallisationslösung unter Zusatz von kryoprotektiven Substanzen) erreicht werden. Die zweite Möglichkeit entspricht prinzipiell einer bereits bei der Untersuchung des Effektes

verschiedener Kryoprotektanzen beschriebenen Vorgehensweise des schrittweisen Transfers der Kristalle in Kryolösungen mit höheren Konzentrationen von kryoprotektiven Substanzen. Dabei wurde kein positiver Effekt auf das Streuverhalten der Kristalle festgestellt. Erfolgte der Transfer schrittweise über einen Zeitraum von bis zu 20 min, erwiesen sich die Kristalle von GGA1_2-361 (wildtyp bzw. Ser354Asp) als nicht stabil. Deshalb wurde eine aufwendigere, aber sanftere Methode der Kristalltrocknung getestet. Um die Manipulation der Kristalle zu minimieren, kam die Kristallisation durch Dampfdiffusion im hängenden Tropfen zum Einsatz (*Abb. 14*). Nachdem die Kristalle die für Röntgenbeugungsexperimente notwendigen Dimensionen erreicht hatten, wurden einige der erhaltenen Kristalle als Kontrolle tiefgekühlt. Dabei musste eine Kryolösung verwendet werden. Verwendet wurden die Kryolösungen 20-25% Glycerin, Parathon N oder Perfluorpolyether. Die verbleibenden Kristalle wurden schrittweise über Kristallisationslösung mit einer höheren Konzentration an Präzipitationsmittel (Ammoniumacetat) platziert. Der Transfer erfolgte jeweils nach 8 – 14 h. Vor dem jeweiligen Transfer wurden einige Kristalle tiefgekühlt. Schliesslich wurden die Kristalle am Röntgendiffraktometer hinsichtlich ihrer Beugungseigenschaften analysiert. Beim Test der Kristalle, die als Kontrollen vor einem Transfer tiefgekühlt wurden, konnten wie zuvor in einigen Fällen wenige Reflexe bei geringer Auflösung gemessen werden. Die Messung dehydrierter Kristalle zeigte keine Verbesserung hinsichtlich der Auflösung. In den meisten Fällen wurden keine Reflexe gemessen. Somit war diese Methode nicht für eine Verbesserung der Beugungsqualität der Kristalle geeignet.

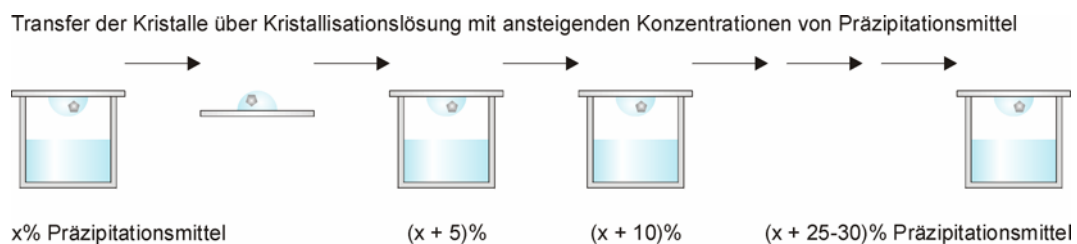


Abb. 14 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Reduzierung des Lösungsmittelanteils der GGA Kristalle.

Eine technische Einrichtung zur Regulation der relativen Feuchtigkeit von Kristallen ist das sogenannte *Free-Mounting-System* (Kiefersauer *et al.*, 2000). Das System steht zur Zeit nur wenigen Einrichtungen in Deutschland zur Verfügung. Tests von GGA1_2-361

(wildtyp bzw. Ser345Asp) Kristallen wurden mit freundlicher Genehmigung von Prof. M. Stubbs am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Auch mit dem *Free-Mounting-System* wurde keine Verbesserung der Beugungseigenschaften der Kristalle erreicht (Dr. M. Rudolph, persönliche Mitteilung).

A.3.5.4.3 *Temperaturänderung*

Weitere Optimierungsversuche umfassten Kristallisationsversuche bei 4 °C. Dabei wurden unter Variation der Präzipitationsmittelkonzentration keine Kristalle erhalten und es kam bevorzugt zur Präzipitation des Proteins. Um einen möglichen Effekt erniedrigter Temperatur auf das Streuverhalten der Kristalle zu prüfen, wurden bei 20 °C erhaltene Kristalle von GGA1_2-361_wt über Zeiträume von 12 h bis mehreren Tagen bei 4 °C inkubiert. Dabei kam es zur Präzipitation von zuvor löslichem Protein. Die Kristalle wurden in Kristallisationslösung, die zusätzlich 25% Glycerin als Kryoprotektant enthielt, im Kühlraum in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und gelagert. Beim Test dieser Kristalle wurden keine Reflexe gemessen. Als Kontrolle dienten Kristalle, die vor der Temperaturänderung entnommen und analog tiefgekühlt wurden. Beim Testen dieser Kristalle wurden einige wenige Reflexe gemessen. Dies spricht für einen negativen Effekt des Temperaturwechsels.

A.3.5.5 **Kristallisation von GGA1_2-326**

GGA1_2-326 wurde als ein Fragment gewählt, das nur die N-terminale VHS-Domäne und die GAT-Domäne umfasst. Kristalle von GGA1_2-326 wurden überraschenderweise unter Variation der für GGA1_2-361 ermittelten Kristallisationsbedingungen erhalten. Die Kristalle zeigten eine ähnliche Morphologie wie die GGA1_2-361 Kristalle, waren jedoch von geringer Grösse (*Abb. 15a*). Versuche, grössere Kristalle zu produzieren, umfassten die Verwendung verschiedener Additive. Die Verwendung von 5% 1,4-Butandiol führte zu einer geringfügigen Steigerung der Kristallgrösse (*Abb. 15b*). Die Dimensionen dieser Kristalle waren gerade ausreichend für die Untersuchung ihres Streuverhaltens am Röntgendiffraktometer.

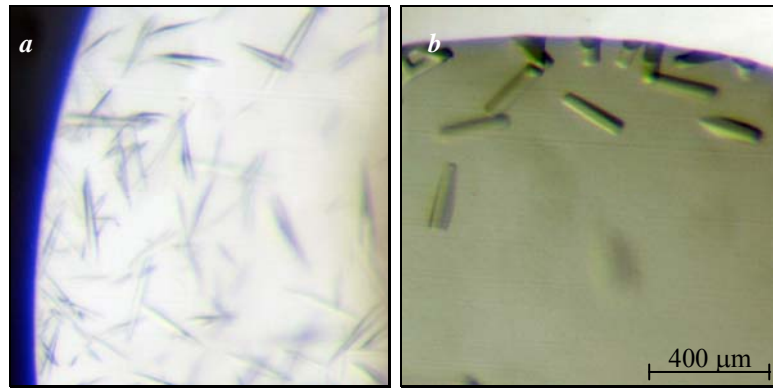


Abb. 15 Kristalle von GGA1_2-326. (a) Erste Kristalle wurden unter Anwendung der für GGA1_2-361 gefundenen Kristallisationsbedingungen (1,3 M Ammoniumacetat, 0,1 M Imidazol/HCl pH 5,7, 5% Ethylenglycol) erhalten. (b) Geringfügig grössere Kristalle (1,6 M Lithiumacetat pH 5,7, 100 mM Imidazol/Malat pH 5,7, 5% 1,4-Butandiol).

Die Kristallisationlösung (1,6 M Lithiumacetat pH 5,5, 100 mM Imidazol/HCl, 5% 1,4-Butandiol) konnte in flüssigem Stickstoff glasartig verfestigt werden und diente in ersten Tests dieser Kristalle am Röntgendiffraktometer gleichzeitig als Kryolösung. Leider wurden dabei keine Reflexe gemessen. Dies spricht dafür, dass es sich um Kristalle von GGA1_236 handelte, deren Beugungsqualität allerdings extrem schlecht war.

A.3.5.6 Variation des N-Terminus von GGA1_2-361 durch Proteolyse mit Aminopeptidase M

GGA1_2-361 und GGA1_2-326, das C-terminal um weitere 35 Aminosäurereste verkürzt ist, kristallisierten unter nahezu identischen Bedingungen. Obwohl dieser Bereich dem langen Hinge-Segment von GGA1 entspricht, der als grösstenteils ungeordnet und flexibel angesehen wird, scheint er nur einen geringen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten auszuüben. Um mögliche Auswirkungen von Variationen des N-Terminus auf die Kristallisation sowie das Streuverhalten der Kristalle zu untersuchen, wurde das Fragment GGA1_2-361 einer Proteolyse mit Aminopeptidase M (Calbiochem, Bad Soden) direkt im Kristallisationsansatz unterzogen. In einem Vorversuch wurde zunächst nach einem günstigem Mengenverhältnis zwischen Protease und GGA1_2-361 gesucht. Dabei wurde Aminopeptidase M 1:100 (w/w) eingesetzt, Proben nach verschiedenen Inkubationszeiträumen bei 20 °C entnommen und durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 16). Es zeigte sich, dass GGA1_2-361 unter den gewählten Bedingungen zunächst geringfügig verkürzt wurde. Nach 1-2 h traten Abbauprodukte mit einem Molekulargewicht von etwa

36 kDa auf. Nach 24 h war etwa die Hälfte des Proteins zu diesem 36 kDa-Produkt verkürzt.

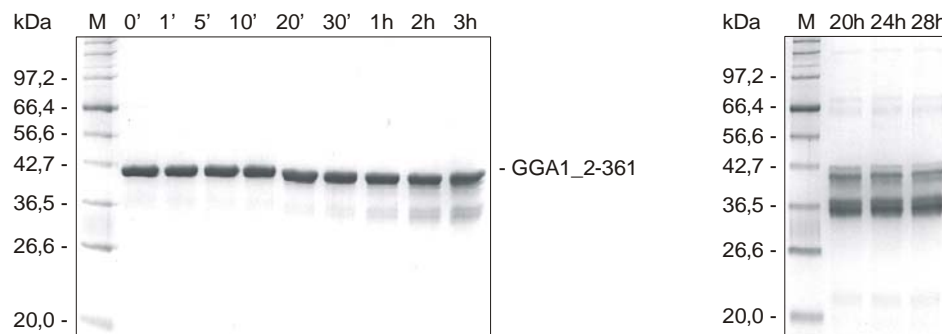


Abb. 16 SDS-PAGE Analyse der Proteolyse von GGA1_2-361 unter Verwendung von Aminopeptidase M. [M] Molekulargewichtstandard; [0'-28h] Inkubationszeitraum bis zur Probenahme. Aminopeptidase wurde 1:100 (w/w) eingesetzt, die Inkubation erfolgte bei 20 °C.

Aminopeptidase M hydrolysiert keine X-Pro Bindungen (Wachsmuth *et al.*, 1966). Eine Analyse der Aminosäuresequenz des GGA1_2-361 Fragments ergab eine Häufung von Prolinresten im N-terminalen Bereich (Abb. 17). GGA1_2-361 wurde dennoch hydrolysiert. An Position 48/49 folgen zwei Prolinreste direkt nacheinander. Das Molekulargewicht des dabei theoretisch resultierenden GGA1_44-361 Fragmentes wurde zu 35,5 kDa berechnet und entspricht dem Molekulargewicht des beobachteten stabilen Abbauproduktes. Demnach handelt es sich dabei um die Abbruchstelle der Enzymreaktion.



Abb. 17 N-terminale Aminosäuresequenz des GGA1_2-361 Fragments. Prolinreste sind unterstrichen, die berechneten Molekulargewichte der Fragmente, die bei Abbruch der Hydrolyse mit Aminopeptidase M an diesen Positionen aus GGA1_2-361 entstehen, angegeben.

Kristalle von GGA1_2-361 wurden reproduzierbar nach etwa 24-48 h erhalten. Die proteolytische N-terminale Verkürzung von GGA1_2-361 erfolgte direkt im Kristallisationsansatz. Um die Bildung von Kristallen aus den proteolytischen Fragmenten zu ermöglichen, wurde Aminopeptidase M 1:100, 1:1000 und 1:10000 (w/w) eingesetzt. Als Kontrolle wurden identische Kristallisationsbedingungen ohne Zugabe der Protease

angesetzt. Kristalle von GGA1_2-361 wurden in den Kontrollen, kleine unregelmässige Kristalle z.T. auch bei starker Verdünnung (1:10000) der Protease erhalten. Das Ausbleiben von Kristallen in den meisten Ansätzen, die Aminopeptidase M enthielten, spricht dafür, dass eine Modifikation von GGA1_2-361 stattfand und der N-terminale Teil von GGA1_2-361 entscheidend für die Kristallbildung unter den angewandten Kristallisationsbedingungen ist.

A.4 DISKUSSION

GGA-Proteine bilden eine Familie von monomeren Clathrin-Adaptorproteinen, die bei der Sortierung von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren vom *trans*-Golgi-Netzwerk zu den Endosomen eine Rolle spielen. Seit ihrer Entdeckung wurden GGA-Proteine intensiv biochemisch als auch durch Strukturanalyse untersucht. Dabei wurden Daten bezüglich der Lokalisation der GGA-Proteine, ihrer Wechselwirkung mit anderen Proteinen und der strukturellen Grundlagen dieser Wechselwirkungen erhalten. Trotzdem ist die detaillierte Funktionsweise der GGA-Proteine im Prozess der Bildung Clathrin-beschichteter Vesikel nicht vollständig verstanden. Eine Ursache ist, dass sich strukturelle Untersuchungen der GGA-Proteine bisher auf die Beschreibung der isolierten VHS-, GAT und GAE-Domäne sowie der Wechselwirkungen, die diese mit ihren jeweiligen Bindungspartnern eingehen, beschränken. Die Struktur eines intakten GGA-Proteins wurde bisher nicht bestimmt. Es sind auch keine Strukturen verfügbar, die Aussagen über die relative Orientierung der einzelnen Domänen zueinander zulassen. Um neue Strukturen von GGA-Proteinen zu gewinnen, wurden in dieser Arbeit GGA Fragmente, die mehr als eine isolierte Domäne dieser Proteine umfassen, auf ihre Eignung zur Kristallisation und Röntgenstrukturbestimmung geprüft.

Etwa 85% der momentan in der PDB verfügbaren Strukturen von Makromolekülen wurden durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Methode erfordert zunächst die Kristallisation des zu untersuchenden Makromoleküls. Zur Zeit existiert kein Algorithmus der es erlaubt Bedingungen, unter denen ein Protein kristallisiert, vorherzusagen. Deshalb ist man auf die Durchmusterung verschiedener Kristallisationsbedingungen angewiesen. Eine Grundvoraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit grösserer Mengen des zu untersuchenden Proteins sowie seine Reinheit.

Nach Klonierung in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 konnte die Mehrzahl der klonierten GGA1/3 Varianten in ausreichenden Mengen als GST-Fusionsprotein in *E. coli* Rosetta2(*DE3*) produziert werden. Eine Ausnahme bildete lediglich GGA1, welches auch nach Optimierung der Expressionsbedingungen nur in sehr geringen Mengen produziert wurde. Stattdessen wurde vor allem ein Protein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa produziert. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein Produkt unvollständiger Synthese

von GST-GGA1. Dafür spricht, dass dieses Protein nicht durch Affinätschromatographie an GSH-Sepharose von GST-GGA1 getrennt wurde und bei Proteolyse mit PreScission-Protease einer Molekulargewichtsänderung von 26 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht des proteolytisch abgespaltenen GST, unterlag.

Eine häufige Vorgehensweise bei der Kristallisation von Proteinen ist die Modifikation des Makromoleküls, beispielsweise durch C- und/oder N-terminale Verkürzung. Dabei sucht man nach Fragmenten, die sich gut kristallisieren lassen, wobei man sich häufig an Vorhersagen über die Sekundärstruktur des Proteins bzw. seiner Domänenorganisation orientiert. Diese Methode kam prinzipiell auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung, allerdings mit einer bedeutsamen Einschränkung. Da die Strukturen der isolierten GGA-Domänen bereits bekannt waren, sollten Aussagen über die relative Orientierung dieser Domänen zueinander bzw. die Struktur eines intakten GGA-Proteins gewonnen werden. Demzufolge mussten die erzeugten GGA Fragmente mehr als eine einzelne Domäne, und damit zwangsläufig die diese Bereiche verbindenden Segmente umfassen. Insbesondere das lange Hinge-Segment, welches die N-terminale VHS- und GAT-Domäne mit der GAE-Domäne verbindet, wird als relativ flexibel angesehen, insbesondere weil ein in diesem Bereich von GGA1/3 lokalisiertes Sequenzmotif unter Ausbildung einer autoinhibierten Form von GGA1/3 an die VHS-Domäne binden kann (Doray *et al.*, 2002a). Diese intramolekulare Bindung könnte jedoch auch zu einer Stabilisierung und verminderten Flexibilität des Makromoleküls führen. Deshalb wurden im Falle der GGA1₂₋₃₆₁ und GGA3₂₋₃₉₁ Fragmente zusätzlich Varianten erzeugt, in denen die Phosphorylierung des natürlich vorkommenden Serinrestes an Position 354 in GGA1 bzw. 384 in GGA3 durch Austausch gegen einen Asparaginsäurerest nachgeahmt wurde. Interessanterweise eluierten die wildtyp und Ser→Asp Varianten von GGA1₂₋₃₆₁ (41 kDa) bzw. GGA3₂₋₃₉₁ (44 kDa) während der Reinigung durch Grössenausschlusschromatographie bei identischen Volumina, entsprechend eines Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 160 kDa (GGA1₂₋₃₆₁ wildtyp bzw. Ser354Asp) bzw. 200 kDa (GGA2₂₋₃₉₁ wildtyp bzw. Ser384Asp). Das beobachtete Laufverhalten ist vermutlich damit zu erklären, dass die GGA Fragmente in der „offenen“, nicht autoinhibierten Form vorlagen (Gosh & Kornfeld 2003). Die Einführung der Ser→Asp Mutation bewirkte offenbar keine Konformationsänderung der Fragmente. Beide Varianten von GGA1₂₋₃₆₁ (wildtyp bzw. Ser345Asp) kristallisierten unter Anwendung derselben Bedingungen. Die eingeführten Ser354Asp Mutation hatte offenbar keinen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten. Dies

spricht ebenfalls dafür, dass es durch Einführung der Ser354Asp Mutation nicht zu einer intramolekularen Bindung der autoinhibitorischen Sequenz an die VHS-Domäne und somit im Vergleich zu GGA1_2-361_wt zu keiner Änderung in der Konformation von GGA1_2-361_Ser345Asp kam.

Möglicherweise spielen bei der Ausbildung der autoinhibierten Konformation neben der Phosphorylierung des Serinrestes N-terminal der internen autoinhibitorischen Sequenz weitere Modifikationen des Proteins eine Rolle. In Untersuchungen zur Autoinhibition wurde GGA1 und GGA3 verwendet, dass in *Sf9* oder COS7 Zellen produziert wurde (Doray *et al.*, 2002a). Ein möglicher Vorteil der Produktion der GGA-Proteine in eukaryotischen Zellen ist die korrekte posttranslationale Prozessierung und Faltung der produzierten Proteine. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Produktion von GGA1 und GGA3 sowie der Fragmente GGA1_2-361 und GGA3_2-391 in Insektenzellen versucht. Für Kristallisationsexperimente werden relativ grosse Mengen Protein benötigt. Da keine deutliche Überproduktion der GGA Fragmente in Insektenzellen durch SDS-PAGE nachzuweisen war ist anzunehmen, dass sich Insektenzellen nicht für eine effiziente Produktion der GGA Fragmente in grösseren Mengen eignen.

Obwohl die erhaltenen Kristalle von GGA1_2-361 (wildtyp bzw. Ser354Asp) nach Optimierung der Kristallisationsbedingungen durchaus für Röntgenbeugungsexperimente brauchbare Dimensionen erreichten, war die Beugungsqualität der Kristalle nicht für eine Strukturbestimmung ausreichend. Gut beugende Kristalle zeichnen sich durch eine hohe Ordnung im Kristallgitter aus. Diese Ordnung wird leichter erreicht, wenn die zu kristallisierenden Moleküle sehr rigide sind. Die erfolgreich kristallisierten Fragmente von GGA1_2-361 umfassten Teile der Hinge-Region, für die eine hohe Flexibilität vorhergesagt wird. Eine mögliche Ursache für das schlechte Streuverhalten der erhaltenen Proteinkristalle ist demnach die mit der Flexibilität der erzeugten Fragmente einhergehende geringe Ordnung des Kristallgitters.

Deshalb wurde eine weitere C-terminale Verkürzung von GGA1 angestrebt. Das Fragment GGA1_2-301, das lediglich die VHS- und GAT-Domäne umfasst, konnte aufgrund seiner geringen Löslichkeit nach proteolytischer Freisetzung aus dem GST-Fusionsprotein nicht gereinigt werden. Offenbar führte die C-terminale Verkürzung von GGA1 bis zum Aminosäurerest 301 zu einer Destabilisierung des Moleküls. Das geringfügig längere Fragment GGA1_2-326 war hingegen löslich und kristallisierte unter ähnlichen

Bedingungen wie die GGA1_2-361 Fragmente. Allerdings waren die erhaltenen Kristalle von GGA1_2-326 von noch schlechterer Qualität.

Versuche, die Beugungseigenschaften der erhaltenen Kristalle durch Variation verschiedener Parameter zu verbessern, führten nicht zum Erfolg. Es kann davon ausgegangen werden, dass die für eine Strukturbestimmung notwendige Steigerung der Beugungsqualität der Kristalle nicht alleine durch die Variation der untersuchten Parameter erreicht werden kann. Vielmehr wird eine weitere Modifikation der verwendeten GGA1 Fragmente erforderlich sein. Die erfolgreiche Kristallisation von GGA1_2-361 und GGA1_2-326 unter sehr ähnlichen Bedingungen bietet eine solide Grundlage für den Entwurf weiterer Fragmente von GGA1. Da GGA1_2-326 und GGA1_2-361 unter nahezu identischen Bedingungen kristallisiert werden konnten, scheinen C-terminale Variationen im Bereich der Aminosäurereste 326 bis 361 von GGA1 die Kristallisationsbedingungen nur gering zu beeinflussen, könnten jedoch entscheidend zur Verbesserung der Beugungseigenschaften von Kristallen beitragen.

Daneben sind auch Variationen im N-terminalen Bereich denkbar. Proteolytische Verkürzung des N-Terminus von GGA1_2-361 führte unter Anwendung der etablierten Kristallisationsbedingungen nicht mehr zu einer Bildung von Kristallen. Somit scheint der N-terminale Bereich entscheidend für die Kristallbildung zu sein und eine Variation des N-Terminus wird vermutlich eine komplette Neudurchmusterung von Kristallisationsbedingungen erforderlich machen.

Die Variation des N- und C-terminalen Bereiches könnten eventuell mit der Klonierung entsprechender Fragmente homologer GGA-Proteine aus anderen Organismen kombiniert werden, die vielleicht besser für eine Strukturbestimmung geeignet sind. Eine Stabilisierung der GGA-Proteine könnte eventuell auch durch Kokristallisation mit seinen Interaktionspartnern erreicht werden. Letzlich bleibt die Kristallisation biologischer Makromoleküle ein iterativer Prozess und konkrete Vorhersagen über den Erfolg solcher Massnahmen sind leider nicht möglich.

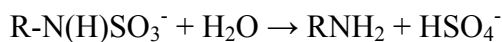
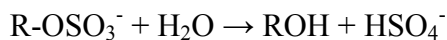
B Strukturelle Untersuchungen am C_α- Formylglycin generierenden Enzym

B.1 EINLEITUNG

Die Struktur und Funktion des Formylglycin generierenden Enzyms (FGE) ist eng mit der Aktivität von Sulfatasen verknüpft, weshalb zunächst auf die Bedeutung dieser Enzyme eingegangen wird.

B.1.1 Sulfatasen

Sulfatester spielen in einem breiten Spektrum biologischer Reaktionen eine bedeutende Rolle. Sie kommen in einer Reihe organischer Verbindungen der Zelle, wie z.B. Glykosaminoglykanen (Dermatansulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Heparansulfat), sulfatierten Glycolipiden (Cerebrosidsulfat), Tyrosin-, Serin- und Threoninsulfat-enthaltenden Proteinen und sulfatierten Hydroxysteroiden (Cholesterolsulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat) vor. Sulfatester werden durch Enzyme modifiziert, die zur Familie der Sulfatester-Sulfohydrolasen (Sulfatasen) gehören. Sulfatasen katalysieren die Hydrolyse von Sulfatestern und Sulfamiden (O- und N-Sulfaten):



Sulfatasen kommen in Pro- und Eukaryoten vor. Sie bilden eine hochkonservierte Familie von Proteinen, die sowohl strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeit zeigen. Sie haben eine Grösse von etwa 500-800 Aminosäureresten, zeigen 20-60% Sequenzhomologie über die gesamte Länge und speziell im N-terminalen Bereich und unterliegen einer

einzigartigen posttranslationalen Modifikation eines Cysteinrestes in C_α-Formylglycin (Hanson *et al.*, 2004).

Das menschliche Genom beinhaltet 17 Sulfatasen (Tab. 5). Während für einige dieser Sulfatasen ihr natürliches Substrat, ihre Rolle im Stoffwechsel und ihre Bedeutung bei der Entstehung von Krankheiten bekannt sind, ist für Andere lediglich die Aminosäuresequenz beschrieben. Basierend auf ihrer Lokalisation in der Zelle, können diese Sulfatasen in zwei Kategorien unterteilt werden: Zum Einen Sulfatasen, die im sauren Milieu der Lysosomen aktiv sind, und zum Anderen Sulfatasen, die im neutralen Bereich des Endoplasmatischen Retikulums, im Golgi-Apparat und an der Zelloberfläche aktiv sind.

Tab. 5 Die 17 Sulfatasen des Menschen.

Sulfatase	Abkürzung	Länge ^a	Lokalisation	Aminosäuresequenz ^{a,b}
Arylsulfatase A	ARSA	507	Lysosom	⁰⁶⁹ CTPSRAALLTGR ⁰⁸⁰
Arylsulfatase B	ARSB	533	Lysosom	⁰⁹¹ CTPSRSQLLTGR ¹⁰²
Arylsulfatase C/Steroidsulfatase	ARSC/STS	583	ER	⁰⁷⁵ CTPSRAAFMTGR ⁰⁸⁶
Arylsulfatase D	ARSD	593	ER	⁰⁸⁹ CTPSRAAFLTGR ¹⁰⁰
Arylsulfatase E	ARSE	589	Golgi	⁰⁸⁶ CTPSRAAFLTGR ⁰⁹⁷
Arylsulfatase F	ARSF	590	ER	⁰⁷⁸ CSPSRSAFLTGR ⁰⁸⁹
Arylsulfatase G	ARSG	525	ER	⁰⁸⁴ CSPSRASLLTGR ⁰⁹⁵
Arylsulfatase H	ARSH	562	unbekannt	⁰⁵⁵ CTPSRAAFLTGR ⁰⁶⁶
Arylsulfatase I	ARSI	569	ER	⁰⁹³ CTPSRSQLLTGR ¹⁰⁴
Arylsulfatase J	ARSJ	599	ER	¹²² CTPSRSQFITGR ¹³³
Arylsulfatase K	ARSK	536	unbekannt	⁰⁸⁰ CCPSRAAMWSGL ⁰⁹¹
Galactosamin-(N-Acetyl)-6-sulfat Sulfatase	GALNS	522	Lysosom	⁰⁷⁹ CSPSRAALLTGR ⁰⁹⁰
Glucosamin-(N-Acetyl)-6-sulfat Sulfatase	GNS	552	Lysosom	⁰⁹¹ CCPSRASILTGR ¹⁰²
Iduronat-2-Sulfatase	IDS	550	Lysosom	⁰⁸⁴ CAPSRVSVFLTGR ⁰⁹⁵
Sulfamidase	SGSH	502	Lysosom	⁰⁷⁰ CSPSRASLLTGL ⁰⁸¹
Sulf1	SULF1	871	Zelloberfläche	⁰⁸⁷ CCPSRSSMLTGR ⁰⁹⁸
Sulf2	SULF2	870	Zelloberfläche	⁰⁸⁸ CCPSRSSILTGR ⁰⁹⁹

^a Es wurden die folgenden Genbank-Einträge benutzt: ARSA, NM_000487; ARSB, NM_000046; ARSC, NM_000351; ARSD, NM_001669; ARSE, NM_000047; ARSF, NM_004042; ARSG, NM_014960; ARSH, NM_001011719; ARSI, AY875937; ARSJ, AY875938; ARSK, AY875939; GALNS, NM_000512; GNS, NM_002076; IDS, NM_000202; SGSH, NM_000199; SULF1, NM_015170; SULF2, NM_018837.

^b Der gezeigte 12 Aminosäurereste umfassende Sequenzausschnitt bildet ein Sequenzmotiv, das für die posttranslationale Modifikation des Cysteinrestes (unterstrichen) zu Formylglycin notwendig ist (B.1.3). Grau markierte Aminosäurereste liegen zu 90% konserviert vor.

B.1.2 Sulfatasedefizienzen

Die physiologische Bedeutung von Sulfatasen wird durch das Auftreten von mindestens acht verschiedenen Krankheiten des Menschen, die aus der Beeinträchtigung einzelner Sulfatasen resultieren, deutlich. Sechs lysosomale Speicherkrankheiten sind auf die

Defizienz von lysosomalen Sulfatasen zurückzuführen. Hierzu gehören die Metachromatische Leukodystrophie (MLD) und fünf verschiedene Typen von Mukopolysaccharidosen (MPS II, IIIA, IIID, IVA und VI). Alle Formen von MLD werden durch Mutationen im Arylsulfatase A (ARSA) Gen, die zum Funktionsverlust des Enzyms führen, ausgelöst. Bei MPS handelt es sich um eine Gruppe von lysosomalen Speicherkrankheiten, die durch den Ausfall von Enzymen, die am schrittweisen Abbau von Glykosaminoglykanen (Mukopolysacchariden) beteiligt sind, hervorgerufen werden. Fünf Sulfatasen stehen in Verbindung mit einem bestimmten Typ von MPS: Iduronat-2-Sulfatase mit MPS II (Hunter Syndrom), Sulfamidase mit MPS IIIA (Sanfilippo A Syndrom), Glucosamin-(N-Acetyl)-6-sulfat Sulfatase mit MPS IIID (Sanfilippo D Syndrom), Galactosamin-(N-Acetyl)-6-sulfat Sulfatase mit MPS IVA (Morquio A Syndrom), Arylsulfatase B mit MPS VI (Maroteaux-Lamy Syndrom). Nicht-lysosomale Sulfatasedefizienzen führen beispielsweise zu X-vermittelter Ichtyose (XLI) und *Chondrodysplasia punctata* (CDPX). Die Sulfatasedefizienzen unterstreichen die hohe Substratspezifität der einzelnen Sulfatasen und ihre begrenzte funktionelle Redundanz.

B.1.2.1 Multiple Sulfatasedefizienz

In einer seltenen autosomal-rezessiven Krankheit, bekannt als Multiple Sulfatasedefizienz (MSD), sind im Gegensatz zu den bisher genannten Sulfatasedefizienzen, bei denen die Aktivität einzelner Sulfatasen beeinträchtigt ist, sämtliche Sulfatasen betroffen (Hopwood & Ballabio, 2001). Die Krankheit manifestiert sich als Kombination der klinischen Symptome, die aus der Beeinträchtigung einzelner Sulfatasen resultieren und führt zum Tod. Durch Komplementationsstudien, in denen MSD-Zellen mit Zellen von Patienten mit einzelnen Sulfatasedefizienzen fusioniert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Sulfatase kodierenden Gene nicht betroffen sind (Ballabio *et al.*, 1985; Chang *et al.*, 1980; Fedde *et al.*, 1984; Horwitz, 1979). Die Expression von Sulfatase cDNS in Fibroblasten von MSD Patienten resultierte in Sulfatasen mit verminderter Aktivität (Rommerskirch & von Figura, 1992). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass Sulfatasen einer ko- oder posttranslationalen Modifikation unterliegen, und dass diese Modifikation im Fall von MSD fehlt.

B.1.3 Posttranslationale Modifikation von Sulfatasen

Weitere Studien zeigten, dass Sulfatasen einer ko- oder posttranslationalen Modifikation eines Cysteinrestes, der im aktiven Zentrum der Enzyme lokalisiert ist, in 2-Amino-3-oxopropansäure (α -Formylglycin, FGly) unterliegen (Schmidt *et al.*, 1995). Das dabei modifizierte Cystein liegt hochkonserviert in nahezu allen bekannten Sulfatasen vor. Eine Ausnahme bilden wenige bakterielle Sulfatasen, die einen Serinrest anstelle des Cysteins an dieser Position tragen. Dieses Serin wird ebenfalls zu FGly modifiziert, allerdings über einen anderen Mechanismus (Miech *et al.*, 1998). Die Bildung von FGly aus dem Vorläufer Cystein ist ein Redoxprozess, der Calcium, molekularen Sauerstoff und ein Reduktionsmittel benötigt (Fey *et al.*, 2001; Dierks *et al.*, 2005). Die Modifikation des Cysteinrestes erfolgt ko- oder posttranslational im Endoplasmatischen Retikulum an der noch ungefalteten Sulfatase (Dierks *et al.*, 1997). Die für die Modifikation notwendige Sequenzinformation umfasst 12 Aminosäurereste, beginnend mit dem zu modifizierenden Cysteinrest (Tab. 5). Durch Mutation und Verkürzung dieses Sequenzmotives konnte gezeigt werden, dass ein Kernmotiv - C(X/T)P(X/S)R - ausreicht, um eine geringfügige Modifikation des Cysteinrestes zu erzielen (Dierks *et al.*, 1999; Recksiek *et al.*, 1998, Waldow *et al.*, 1999).

B.1.4 Bedeutung des FGly bei der Hydrolyse von Sulfatestern

Die Strukturen von drei verschiedenen Sulfatasen des Menschen – HARS A (Lukatela *et al.*, 1998), HARS B (Bond *et al.*, 1997) und HARS C (Hernandez-Guzman *et al.*, 2003) sowie der Sulfatase PARS aus dem gramnegativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (Boltes *et al.*, 2001) wurden durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. In den Strukturen dieser pro- und eukaryotischen Sulfatasen ist die Geometrie des aktiven Zentrums nahezu identisch. Der FGly-Rest liegt als FGly-Hydrat (FGH) vor und ist am Boden einer schmalen Spalte lokalisiert, die von geladenen Aminosäureresten flankiert wird. Ein Metallion (Ca^{2+} in HARS B, HARS C, PARS bzw. Mg^{2+} in HARS A) wird durch einen Asparaginrest (bzw. Glutamin in HARS C) und drei Asparaginsäurereste koordiniert (Tab. 6). Strukturelle und enzymatische Studien von HARS A Mutanten, in denen der FGly-Rest gegen einen Serin- oder Alaninrest ausgetauscht wurde (Recksiek *et al.*, 1998; von Bulow *et al.*, 2001) sowie die hochaufgelöste (1,3 Å) Struktur von PARS erlaubten die

Formulierung eines möglichen Reaktionsmechanismus der Sulfatesterhydrolyse durch Sulfatasen (Abb. 18).

Tab. 6 Komponenten des aktiven Zentrums von Sulfatasen sowie ihre mögliche Funktion bei der Hydrolyse von Sulfateestern (modifiziert nach Hanson *et al.*, 2004).

Komponente	PARS	HARSA	HARSB	HARSC	Funktion
Fgly	51	69	91	75	Katalytisches Nukleophil als FGH
Metallion	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Substratbindung und -aktivierung, FGH-Stabilisierung
AsnA	Asn318	Asn282	Asn301	Gln343	Koordination des Metallions, FGH-Aktivierung
AspA	Asp317	Asp281	Asp300	Asp342	Koordination des Metallions
AspB	Asp14	Asp30	Asp54	Asp36	Koordination des Metallions
AspC	Asp13	Asp29	Asp63	Asp35	Koordination des Metallions
ArgA	Arg55	Arg73	Arg95	Arg79	Stabilisierung von FGH
HisA	His115	His125	His147	His136	Stabilisierung von FGH, Eliminierung von FGS
HisB	His211	His229	His242	His290	Substratbindung und -aktivierung, Alkohol-Protonierung
LysA	Lys113	Lys123	Lys145	Lys134	Substratbindung- und -aktivierung, FGH-Stabilisierung
LysB	Lys375	Lys302	Lys318	Lys368	Substratbindung und -aktivierung, Alkohol-Protonierung

FGH, Formylglycin-Hydrat; FGS, Formylglycin-Sulfat.

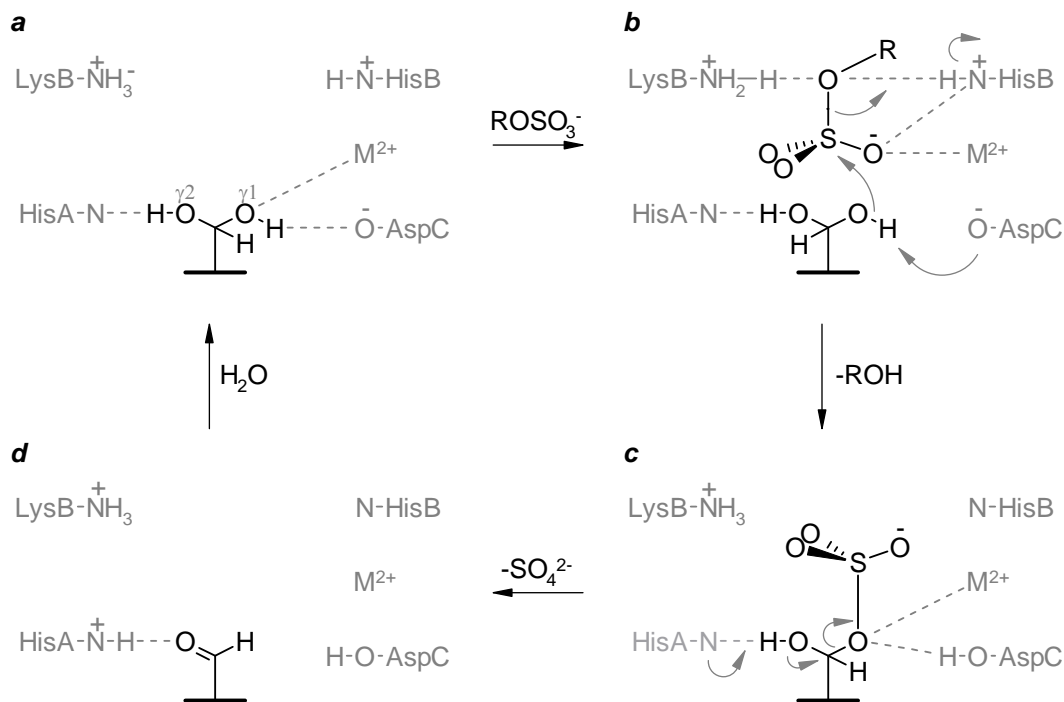


Abb. 18 Schematische Darstellung des vorhergesagten Mechanismus der Hydrolyse von Sulfateestern. (a) Die Hydrolyse des Sulfatesters wird durch die Bildung eines Aldehydhydrates (FGH) am katalytischen FGly-Rest eingeleitet. (a→b) Positiv geladene Aminosäurereste und ein Metallion (M²⁺) binden, orientieren und aktivieren das Substrat für den nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe O^{γ1} des FGH. (b→c) S_N2 Substitution und Freisetzung des Alkohols führt zur kovalenten Bindung des Sulfates an das Enzym. (c→d) Eliminierung von Sulfat und Regeneration des Aldehyds. (d→a) Rehydrierung des FGly zum FGH vervollständigt den Reaktionszyklus.

Die grundlegende Bedeutung des FGH wurde indirekt durch Austausch des FGly-Vorläufers Cystein gegen einen Serinrest nachgewiesen (Recksiek et al., 1998). Diese Mutanten waren in der Lage Sulfatester zu spalten. Da die zweite Hydroxylgruppe fehlte war jedoch die Freisetzung der Sulfatgruppe und Regeneration des Aldehydes blockiert, was in einem Enzym-Sulfat-Intermediat mit einem Serin-Sulfatester in Position 69 (HARSA) bzw. 91 (HARSB) resultierte.

Die strukturelle Ähnlichkeit der Sulfatasen, insbesondere des aktiven Zentrums, legt die Vermutung nahe, dass der vorhergesagte Mechanismus universell für alle Sulfatasen ist. Die Schlüsselfunktion des FGly in diesem Mechanismus erklärt die kritische Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikation in der Biogenese enzymatisch aktiver Sulfatasen.

B.1.5 Das C_α-Formylglycin Generierende Enzym

Sulfatasen, die aus MSD Zellen isoliert wurden, tragen einen Cysteinrest im aktiven Zentrum, der nicht in FGly umgewandelt wurde (Schmidt *et al.*, 1995). Dies wies darauf hin, dass MSD durch die Mutation eines oder mehrerer Gene, die für Faktoren der FGly Synthese kodieren, hervorgerufen wird. Das MSD Gen konnte durch biochemische (Dierks *et al.*, 2003) und genetische Studien (Cosma *et al.*, 2003) identifiziert werden und wurde als Sulfatase modifizierender Faktor (*Sulfatase Modifying Factor 1, SUMF1*) bezeichnet. Das *SUMF1*-Gen liegt hochkonserviert in Pro- und Eukaryoten vor und besitzt ein Homolog in Wirbeltieren, das als *SUMF2* bezeichnet wurde (Cosma *et al.*, 2003; Dierks *et al.*, 2003). *SUMF1* kodiert für ein Protein mit 374 Aminosäureresten, das im ER lokalisiert ist – das Formylglycin Generierende Enzym (FGE). Ein Signalpeptid ist zwischen den Aminosäureresten 22 und 33 lokalisiert und wird nach dem Transport ins ER hydrolysiert. Das Protein wird ausserdem am Aminosäurerest Asn141 glykosyliert (Landgrebe *et al.*, 2003). Die Struktur von FGE wurde durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Dierks *et al.*, 2005). FGE ist ein Monomer, das – entgegen von Vorhersagen, die anhand von Sequenzvergleichen (Landgrebe, *et al.*, 2003) und proteolytischen Analysen (Preusser-Kunze, *et al.* 2005) getroffen wurden – keine offensichtliche Domänenorganisation aufweist (Abb. 19). Auffällig ist der sehr geringe Anteil an Sekundärstrukturelementen, lediglich 13% des FGE-Moleküls liegen in Form von α -Helices, 20% in Form von β -Strängen vor. Zudem sind die β -Stränge 7, 8, 10, 13 und 14 extrem kurz und umfassen nur zwei Aminosäurereste. Die Struktur zeigt zwei Ca²⁺-Ionen, die eine strukturelle Rolle bei der Stabilisierung der Gesamtstruktur des FGE-Moleküls

ausüben. Zwei permanente Disulfidbrücken – Cys218/Cys365 und Cys235/Cys346 – tragen ebenfalls zur Stabilität des Moleküls bei. Die dritte Disulfidbrücke – Cys336/Cys341 – ist redoxaktiv und bildet vermutlich das aktive Zentrum des Enzyms (Dierks *et al.*, 2005).

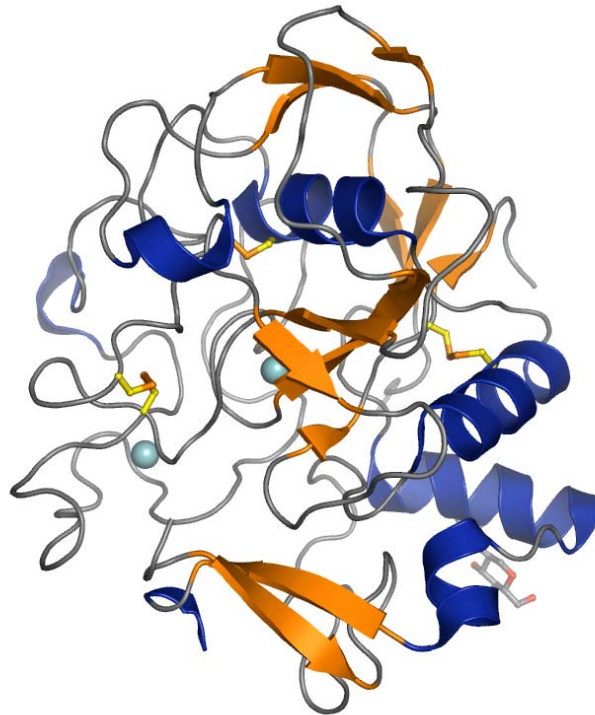


Abb. 19 Sekundärstruktur des Formylglycin Generierenden Enzyms (FGE). 13% des Moleküls liegen in Form von α -Helices (blau), 20% in Form von β -Strängen (orange) vor. Die Gesamtstruktur wird durch zwei Ca^{2+} -Ionen (hellblau) sowie Disulfidbrücken (orange) zwischen den Cysteinresten (Seitenketten in gelb) Cys218/Cys365 und Cys235/Cys346 stabilisiert.

Die Bildung von FGly aus einem Cysteinrest ist ein mehrstufiger Redoxprozess der die Bildung von Disulfidbrücken einschliesst und ein Reduktionsmittel (Fey *et al.*, 2001) sowie molekularen Sauerstoff benötigt (Dierks *et al.*, 2005). Wie die sauerstoffabhängige Oxidation eines Cysteinrestes durch FGE vermittelt wird ist bisher nicht im Detail verstanden. Viele Enzyme, die Redoxprozesse katalysieren, nutzen redoxaktive Metalle zum Elektronenaustausch oder hängen von Nukleotid- oder Proteinkofaktoren ab. Dies ist in FGE nicht der Fall. Kristallstrukturen von FGE in unterschiedlichen Oxidationszuständen zeigten, dass das Cysteinpaar Cys336/Cys341 im Gegensatz zu allen anderen Cysteinresten in FGE oxidationsempfindlich ist (Dierks *et al.*, 2005). Basierend

auf biochemischen und strukturellen Daten wurde ein möglicher Katalysemechanismus für die Bildung von FGly durch FGE vorgeschlagen (Abb. 20).

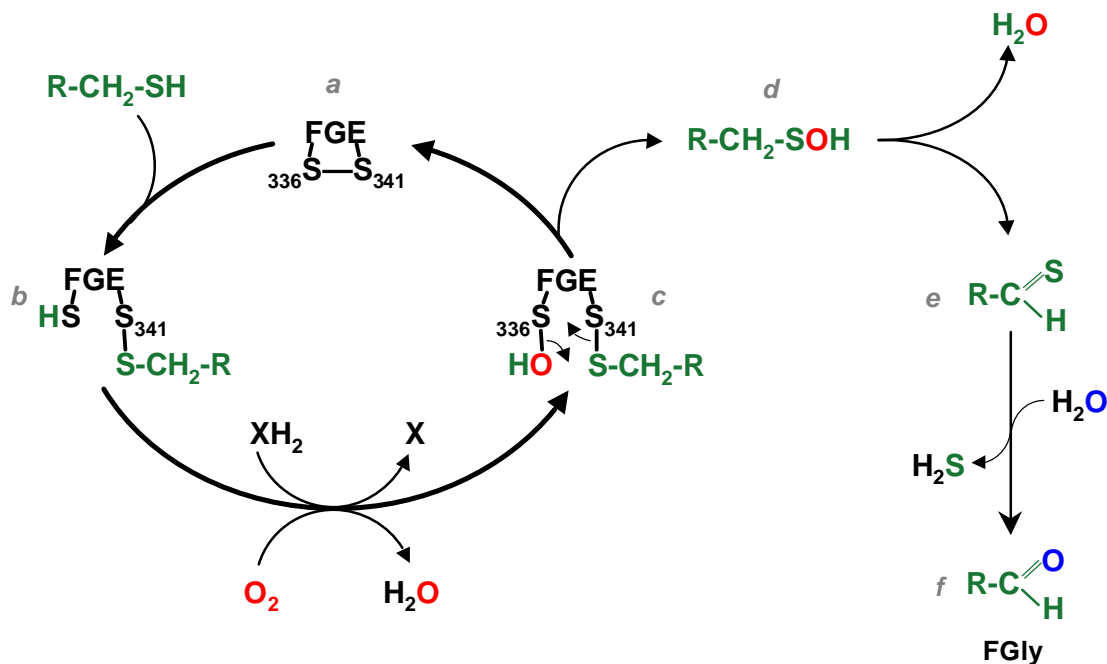


Abb. 20 Möglicher Katalysemechanismus für die Bildung von FGly aus einem Cysteinrest durch FGE. Das FGE Cysteinpaar Cys336/Cys341 liegt im Grundzustand (a) oxidiert in Form einer Disulfidbrücke vor. (a→b) Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen FGE Cys341 und dem zu modifizierenden Cysteinrest des Substrates. (b→c) FGE Cys336 wird zur Sulfensäure oxidiert, wobei molekularer Sauerstoff und ein Reduktionsmittel benötigt und ein Wassermolekül gebildet wird. (c→d) Transfer der Hydroxylgruppe von Cys336 auf den Cysteinrest des Substrates, wobei die Disulfidbrücke zwischen Cys336 und Cys341 des FGE wiederhergestellt wird. (d→e) Angriff einer katalytischen Base (Ser333?) auf das C_β-Atom der Sulfensäure und Eliminierung von Wasser, wobei ein Thioaldehyd entsteht. (e→f) Spontane Hydrolyse des in wässriger Lösung instabilen Thioaldehyds zu FGly.

Die Struktur des FGE erlaubte die Identifikation einer möglichen Substratbindestelle. Eine Oberflächendarstellung des FGE zeigt eine Furche von 20 Å Länge, 10 Å Tiefe und 12 Å Breite (Abb. 21). Diese Furche wird durch das Cysteinpaar Cys336/Cys341 als auch Pro182, für das eine Wechselwirkung mit einem photoreaktiven Substratpeptid nachgewiesen wurde (Preusser-Kunze *et al.*, 2005), begrenzt. Die Furche ist gross genug, um bis zu sechs Aminosäurereste aufzunehmen, und könnte somit die Bindestelle für das Sulfatase Kernmotiv C(X/T)P(X/S)R darstellen.

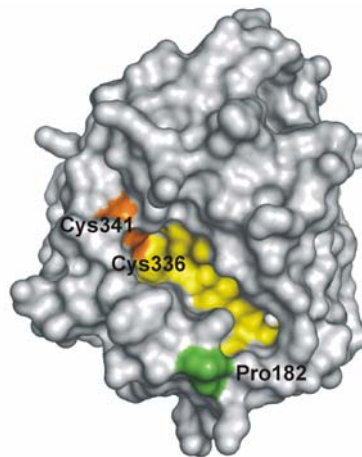


Abb. 21 Die mögliche Substratbindestelle des FGE. Oberflächendarstellung des FGE. Das redoxaktive Cysteinpaar Cys336/Cys341 (orange Bereiche) ist an einem Ende einer ovalen Furche (gelb) von 20 Å Länge, 12 Å Breite und 10 Å Tiefe lokalisiert, Pro182 (grüner Bereich) ist ebenfalls nahe dieser Furche lokalisiert (Dierks *et al.*, 2005).

B.1.6 Das FGE Paralog pFGE

Wie FGE, ist das paraloge pFGE im ER lokalisiert und möglicherweise an der Modifikation von Sulfatasen beteiligt (Mariappan *et al.*, 2005). pFGE zeigt auf Aminosäureebene 50,6% Sequenzidentität mit FGE. Die Struktur von pFGE wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt (Dickmanns *et al.*, 2005) und zeigt Ähnlichkeiten, aber auch signifikante Unterschiede zu FGE. Auch pFGE zeigt einen sehr geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen, 18% des pFGE-Moleküls liegen in Form von α -Helices, 19% in Form von β -Strängen vor. Die Tertiärstruktur von pFGE wird durch zwei Calciumionen und eine Disulfidbrücke zwischen Cys156 und Cys290 stabilisiert. Dabei handelt es sich um die einzigen Cysteinreste in pFGE. Die in FGE vermutlich katalytisch aktiven Cysteinreste Cys336 und Cys341 sind in pFGE durch Ala261 und Asn266 substituiert, und pFGE zeigt keine FGly-generierende Aktivität (Mariappan *et al.*, 2005). Allerdings konnte gezeigt werden, dass pFGE an Peptide bindet, die anhand der Aminosäuresequenz von Sulfatasen abgeleitet wurden und das Kernmotif für die Modifikation eines Cysteins zu FGly enthalten. Während die Produktion von FGE einen stimulierenden Einfluss auf die Aktivierung von Sulfatasen hat, übt pFGE einen inhibitorischen Effekt aus. Daraus ergibt sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung von pFGE. Eventuell konkurriert pFGE mit FGE um neusynthetisierte Sulfatasen, daneben ist auch eine direkte

Wechselwirkung von FGE und pFGE denkbar. Interessanterweise liegt pFGE in der Kristallstruktur als Dimer vor. Darüberhinaus wurde kürzlich eine Homo- und Heterodimerisierung von pFGE/FGE und die Bildung eines trimolekularen Komplexes von FGE, pFGE und Sulfatasen beschrieben (Zito *et al.*, 2005). Diese Daten sprechen dafür, dass pFGE unterstützend oder regulatorisch auf die Funktion von FGE einwirkt, indem es direkt mit FGE wechselwirkt.

B.1.7 Zielsetzung

Wie die Sauerstoff-abhängige Oxidation eines Cysteinrestes durch FGE vermittelt wird ist bisher nicht im Detail verstanden. Die Bestimmung der Kristallstrukturen von FGE in verschiedenen Oxidationszuständen weist auf eine mögliche katalytische Bedeutung der Cysteinreste Cys336 und Cys341 hin. Diese Annahme wird durch die Inaktivität der entsprechenden Serin-Mutanten (Dierks *et al.*, 2005) unterstützt. Es war jedoch nicht klar, inwiefern sich die Mutation dieser Cysteinreste auf die Gesamtstruktur des FGE-Moleküls auswirkt. Dies sollte durch Strukturbestimmung der entsprechenden FGE Mutanten untersucht werden. Die verfügbaren Kristallstrukturen von apo-FGE erlaubten die Identifizierung einer möglichen Substratbindungstasche an der Oberfläche von FGE. Für eine genauere Charakterisierung der Substratbindung durch FGE sollte die Struktur eines FGE/Substrat-Komplexes bestimmt werden.

B.2 MATERIAL UND METHODEN

B.2.1 Reinigung von FGE

cDNS von FGE (wildtyp bzw. Cys336Ser) wurde am Institut für Biochemie II der Georg-August-Universität Göttingen kloniert, das Protein wie beschrieben (Preusser-Kunze *et al.*, 2005) in einer glykosylierten Form aus HT1080 Fibrosarcom Zellen gereinigt und in einer Konzentration von 7,6 mg/ml für Kristallisationsexperimente zur Verfügung gestellt.

B.2.2 Limitierte Proteolyse von FGE

Gereinigtes FGE wurde einer limitierten Proteolyse mit Elastase unterzogen (Dierks *et al.*, 2005), wobei das Enzym etwa 1:1000 (w/w) eingesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

B.2.3 Komplexierung von FGE Cys336Ser mit Substratpeptiden

Anhand der Aminosäuresequenz humaner Arylsulfatase A abgeleitete pentamere bzw. heptamere Peptide mit der Sequenz Cys-Thr-Pro-Ser-Arg bzw. Leu-Cys-Thr-Pro-Ser-Arg-Asn (nachfolgend als CTPSR- bzw. LCTPSRA-Peptid bezeichnet) wurden am Institut für Biochemie II der Georg-August-Universität Göttingen synthetisiert, gereinigt und zur Verfügung gestellt. 181 µM FGE Cys336Ser wurde nach limitierter Proteolyse mit Elastase mit einem 5fachen molaren Überschuss des jeweiligen Peptides gemischt, eine Stunde bei 4 °C inkubiert und anschliessend zur Kristallisation eingesetzt.

B.2.4 Kristallisation

Einkristalle von Elastase hydrolysiertem wildtyp-FGE bzw. FGE Cys336Ser alleine, oder nach Komplexierung mit Substratpeptiden wurden bei 20 °C durch Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen durch Mischen von 0,5 µl Proteinlösung mit 0,5 µl Kristallisationslösung – bestehend aus 27-33% PEG4000, 0,1 M TRIS/HCl pH 8,5, 0,2-0,3 M CaCl₂ – erhalten.

B.2.5 Datensammlung

FGE-Kristalle wurden unmittelbar vor der Datensammlung in der verwendeten Kristallisationslösung, ohne Zugabe weiterer kryoprotektiver Substanzen, direkt im Kühlstrahl der Kryoanlage am Röntgendiffraktometer verglast und zur Datensammlung auf einem Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls mit der Rotationsachse montiert. Die Datensammlung erfolgte bei 100 K an einem MicroMax-007 Röntgeneratore (Rigaku, Tokio) bei einer Wellenlänge von 1,5418 Å mit einem mar345dtb Detektor (MAR-Research, Hamburg). Anhand eines ersten Beugungsbildes wurden die Kristalle mit MOSFLM (Leslie, 1992) indiziert und eine Strategie zur Datensammlung berechnet.

B.2.6 Strukturbestimmung

Das Ergebnis der Röntgenstrukturbestimmung ist die Elektronendichteverteilung innerhalb der Einheitszelle der Kristalle. Die Elektronendichte an den Positionen x , y , z in der Einheitszelle ist definiert durch

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)]$$

wobei die Strukturfaktoramplitude $|F(hkl)|$ aus den gemessenen Reflexintensitäten $I(hkl)$ über die Beziehung $|F(hkl)|^2 = I(hkl)$ erhalten werden kann. Der Phasenwinkel $\alpha(hkl)$ kann nicht gemessen werden, ist jedoch für die Strukturbestimmung (Berechnung der Elektronendichte) erforderlich. Dieses sogenannte Phasenproblem kann unter Anwendung verschiedener methodischer Ansätze gelöst werden. Bei kleinen Molekülen kann die zur Berechnung der Elektronendichteverteilung nötige Phaseninformation durch direkte Methoden, im Falle komplexerer Moleküle durch anomale Dispersion bei einer einzelnen (SAD) oder mehreren Wellenlängen (MAD) oder einfachen (SIR) oder multiplen (MIR) isomorphen Ersatz oder molekularen Ersatz indirekt bestimmt werden.

Die Struktur von wildtyp FGE wurde durch molekularen Ersatz gelöst (Dierks *et al.*, 2005), konnte aber auch *de novo* durch SAD Ca²⁺/S Phasierung bestimmt werden (Roeser *et al.*, 2006). Zur Substruktur-Suche wurde SHELXD (Sheldrick & Schneider, 1997)

benutzt, wobei Daten bis zu einer Auflösung von 1,8 Å verwendet wurden. SHELXE wurde zur Ermittlung der korrekten Händigkeit der Struktur, zur Dichtemodifikation und Erweiterung der Phasen auf 1,54 Å benutzt. Modelle wurden unter Verwendung der Standardparameter automatisch mit ARP/wARP (Lamzin & Wilson, 1993) gebaut und mit REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) verfeinert.

Die Strukturen von apo-FGE Cys336Ser sowie der FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplexe wurden durch Moleklaren Ersatz gelöst. Bei der Strukturbestimmung durch molekularen Ersatz werden die Phasen des kristallisierten Moleküls durch die Phasen eines Suchmodelles mit ähnlicher, bekannter Struktur angenähert. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass homologe Proteine eine ähnliche Faltung ihrer Polypeptidkette aufweisen. Zur korrekten Orientierung im Kristallgitter wird das Suchmodell durch Rotation und Translation in der Einheitszelle des gemessenen Datensatzes platziert.

Zur Bestimmung der Strukturen von FGE Cys336Ser alleine, bzw. im Komplex mit Substratpeptiden durch molekularen Ersatz wurde ein Suchmodell verwendet, das auf der zuvor bestimmten Struktur von wildtyp-FGE (PDB-Eintrag 1Y1E, Dierks *et al.*, 2005) basierte. Von diesem Modell wurden alle Einträge für Wassermoleküle und alternative Seitenkettenkonformationen unter Anpassung des Besetzungsgrades entfernt und der mutierte Aminosäurerest Cys336 in einen Alaninrest konvertiert. FGE Cys336Ser und die FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplexe kristallisierten in der selben Raumgruppe wie wildtyp-FGE und die ermittelten Zellkonstanten waren nahezu identisch. Deshalb konnte auf eine Rotations- und Translationssuche verzichtet werden und die Strukturen von FGE Cys336Ser sowie der FGE Cys336/CTPSRA- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplexe wurden durch direkte Verfeinerung des verwendeten Suchmodelles mit REFMAC5 bestimmt.

B.2.7 Modellbau und Strukturverfeinerung

Die Modelle von apo-FGE Cys336Ser sowie der FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplexe wurden mit COOT (Emsley & Cowtan, 2004) gebaut. Die Verfeinerung der Strukturen erfolgte mit REFMAC5. Dabei wurde versucht, die beobachteten den berechneten Strukturfaktoren anzugleichen. Die Qualität des Angleiches wurde durch Vergleich der beobachteten und der anhand des aktuellen Modelles

berechneten Strukturfaktoramplituden eingeschätzt (R-Faktor). Der kristallographische R-Faktor ist der aus diesem Vergleich berechnete Fehler und definiert als:

$$R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

F_{obs} entspricht den beobachteten, F_{calc} den berechneten Strukturfaktoramplituden. Zur weiteren Kontrolle der Strukturverfeinerung wurde der freie R-Faktor herangezogen, der prinzipiell auf dieselbe Weise wie der kristallographische R-Faktor berechnet wird, jedoch von Reflexen Gebrauch macht, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden. Der Vorteil ist, dass der freie R-Faktor somit nicht durch den Verfeinerungsprozess beeinflusst ist.

$$R_T^{free} = \frac{\sum_{hkl \subset T} \left| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl \subset T} |F_{obs}|}$$

Für die Ermittlung des freien R-Faktors wurde für jeden Datensatz dieselbe Auswahl von 5% der Reflexe anhand eines hochaufgelösten Datensatzes reserviert. Damit waren die freien R-Faktoren auch zwischen den Datensätzen vergleichbar.

Auf jeden Verfeinerungszyklus folgte die Berechnung von mF_o-DF_c und $2mF_o-DF_c$ Elektronendichtekarten, anhand derer die Modelle in COOT modifiziert wurden. Wassermoleküle wurden zunächst automatisch unter Verwendung des Programmes ARP/wARP zugefügt, anschliessend manuell in COOT sowie mit WHATCHECK (Hooft *et al.*, 1996) überprüft und gegebenenfalls wieder vom Modell entfernt. Die Verfeinerung erfolgte bis keine signifikanten Signale in der mF_o-DF_c Karte auftraten bis zur Konvergenz der R-Faktoren.

B.2.8 Strukturanalyse

Die Qualität der verfeinerten Modelle hinsichtlich der Geometrie wurde mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) analysiert. Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und van der Waals Kontakte wurden mit HBPLUS (McDonald & Thornton, 1994) und CONTACTSYM (Sheriff *et al.*, 1987) unter Verwendung der Standardparameter detektiert. Bedeckte Oberflächenareale wurden mit MS (Conolly, 1993), Oberflächenkomplementaritätskoeffizienten mit SC (Lawrence & Colman, 1993) berechnet. Elektrostatische Potentiale wurden mit APBS (Baker *et al.*, 2001) berechnet und mit PYMOL (DeLano, 2002) dargestellt.

B.3 ERGEBNISSE

B.3.1 Proteolyse und Kristallisation von FGE

Umfangreiche Kristallisationsversuche mit intaktem FGE waren nicht erfolgreich. Deshalb wurde versucht, stabile Fragmente von FGE durch limitierte Proteolyse mit verschiedenen Proteasen, z.B. Thermolysin und Elastase zu erzeugen. Durch limitierte Proteolyse mit Elastase wurden zwei Fragmente mit einem apparenten Molekulargewicht von 24 und 10 kDa erhalten (*Abb. 22a*), die sich nicht getrennt voneinander reinigen liessen. Dies deutete darauf hin, dass lediglich eine Schleifenregion des FGE durch die Protease entfernt wurde und die erhaltenen Protease-resistenten Fragmente noch in einer gefalteten Form von FGE verbunden vorlagen. Elastase-behandeltes FGE wurde daraufhin in Kristallisationsexperimenten eingesetzt, wobei unregelmässig geformte Kristalle in 30% PEG 4000, 0,1 M TRIS/HCl pH 8,5, 0,2 M MgCl₂ (*Abb. 22b*) erhalten wurden. Durch Verfeinerung dieser Bedingung wurden grosse Einzelkristalle von FGE in 20-25% PEG 4000, 0,1 M TRIS/HCl pH 8,0-9,0, 0,2-0,3 M CaCl₂ erhalten (*Abb. 22c*).

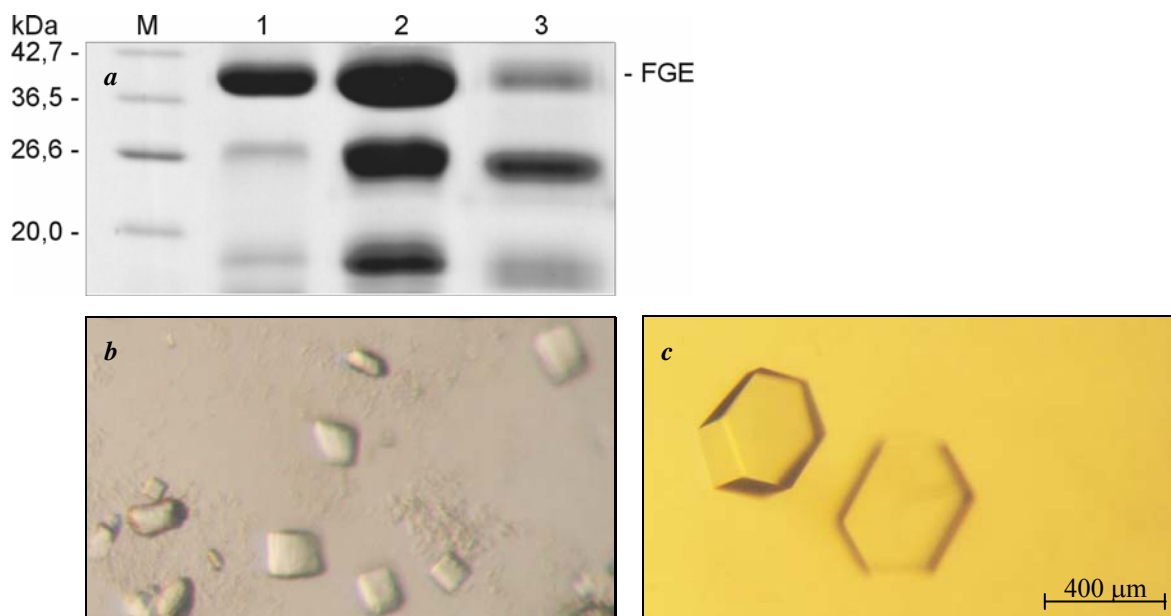


Abb. 22 (a) SDS-PAGE Analyse der Proteolyse von FGE mit Elastase. Probe vor [1] bzw. 1 Stunde nach Inkubation [2] mit Elastase sowie eines aufgelösten FGE-Kristalls [3]. [M] Molekulargewichtstandard. (b) Erste Kristalle von FGE in 30% PEG4000, 0,1 M TRIS/HCl pH 8,5, 0,2 M MgCl₂. (c) Kristalle von FGE nach Verfeinerung der Kristallisationsbedingung in 25% PEG4000, 0,1 M TRIS/HCl pH 8,5, 0,25 M CaCl₂.

B.3.2 *De novo* Bestimmung der Struktur von wildtyp FGE durch Calcium/Schwefel SAD-Phasierung unter Verwendung von CuK α Strahlung

Ein entscheidender Schritt bei der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Makromolekülen durch die Röntgenkristallographie ist die Lösung des Phasenproblems. Die publizierte Struktur von FGE (Dierks *et al.*, 2005) wurde durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst, wobei ein nicht verfeinertes Modell des FGE Paralogs pFGE (Dickmanns *et al.*, 2005) als Suchmodell verwendet wurde. Zur Lösung des Phasenproblems kam jedoch nicht nur die Methode des molekularen Ersatzes zur Anwendung. Noch bevor das FGE Modell neugebaut wurde, war ein hochaufgelöster (1,54 Å) Datensatz hoher Multiplizität (12,2) aufgenommen worden. Motiviert durch die Notwendigkeit höherer CaCl₂-Konzentrationen in der Kristallisationslösung zum Erhalt grosser FGE Kristalle wurde mit diesem Datensatz eine Phasierung auf Basis des anomalen Signales von Calcium versucht (Roeser *et al.*, 2005).

B.3.2.1 Datensammlung und Strukturbestimmung

Von einem FGE-Kristall wurde ein hochaufgelöster Datensatz (1,54 Å, *Abb. 23*) bestehend aus 697 Beugungsbildern aufgenommen (Multiplizität 12,2, *Tab. 7*). Der Kristall-Detektorabstand betrug 100 mm, der Kristall wurde pro Bild um 0,5° gedreht und die jeweilige Expositionszeit betrug 2 min.

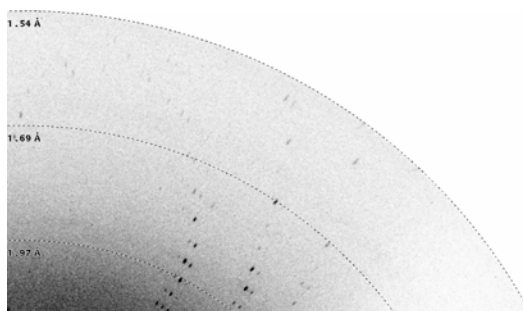


Abb. 23 Ausschnitt eines Beugungsbildes, aufgenommen mit einem mar345dtb Detektor (MAR-Research, Hamburg) bei einem Kristall-Detektorabstand von 100 mm nach einer Expositionszeit von 2 min bei Drehung um 0,5°. Die Auflösung am Detektorrand beträgt 1,54 Å.

Tab. 7 Statistiken der Datensammlung.

Kristall	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2
Elementarzelle, Å bzw. °	a=61,8 b=109,6 c=43,4 $\alpha=\beta=\gamma=90.0$
Datensammlung	
Auflösungsbereich, Å ^a	30,0-1,54 (1,60-1,54)
Zahl der gemessenen Reflexe ^a	528118 (20378)
Zahl der unabhängigen Reflexe ^a	43568 (3439)
Multiplizität	12,2 (5,9)
Vollständigkeit, % ^a	97,8 (78,6)
Anomale Vollständigkeit, % ^a	97,6 (54,8)
Mosaizität, °	0,52
R _{sym} , % ^{a,b}	6,1 (22,8)
Durchschnittliche I/ σ (I) ^a	41,6 (5,6)

^a Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

^b $R_{sym} = 100 \cdot \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_i I_i(h)$, dabei ist $I_i(h)$ der i-te Messwert des Reflexes h und $\langle I(h) \rangle$ der Durchschnittswert der Reflexintensität.

Die Indizierung und Integration der gemessenen Reflexe mit DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) war konsistent mit der Raumgruppensymmetrie P222. Durch Analyse mit XPREP (Tab. 8) konnte aufgrund systematisch abwesender Reflexe auf das Vorliegen einer Raumgruppe mit Schraubenachse geschlossen werden.

Tab. 8 XPREP-Statistik. Entlang der zweiten und dritten Achse wurden keine Reflexe gemessen.

Reflexe	h00	0k0	00l
Zelle / Achse, Å	43	61	109
N	12	17	30
N I>3 σ	7	0	0
<I>	45,1	0,8	1,3
<I/ σ >	10,0	0,4	0,6

Die Daten wurden mit SHELXC hinsichtlich des Auftretens eines anomalen Signales durch Vergleich des auf den Varianzen von F+ und F- basierenden anomalen Signal/Rauschverhältnisses (1,8 insgesamt bzw. 1,5 in der Schale mit der höchsten Auflösung) analysiert.

Eine SAD Ca²⁺-Substruktur Suche mit SHELXD bis zu einer Auflösung von 1,8 Å lieferte 14 Positionen (Tab. 9). Die Suche war nur in der Raumgruppensymmetrie P2₁2₁2 erfolgreich, was die korrekte Zuordnung der Raumgruppe bestätigte.

Tab. 9 Fraktionelle Koordinaten der Schweratome in der FGE Substruktur. Der relative Besetzungsgrad der Schweratome zeigt zwei hochbesetzte und zwölf weniger besetzte Positionen.

Position	u	v	w	relativer Besetzungsgrad	Rest
1	0,396	0,321	0,418	1,00	Ca 1
2	0,535	0,308	0,608	0,99	Ca 2
3	0,310	0,284	0,155	0,43	Cys365
4	0,283	0,355	0,506	0,40	Cys235
5	0,321	0,304	0,126	0,40	Cys218
6	0,266	0,363	0,539	0,39	Cys346
7	0,212	0,249	0,201	0,35	Met91
8	0,186	0,424	0,364	0,35	Met101
9	0,243	0,311	0,302	0,35	Met126
10	0,576	0,371	0,430	0,31	Met335
11	0,634	0,323	0,439	0,29	Met161
12	0,039	0,534	0,590	0,24	Ca 3
13	0,239	0,421	0,614	0,23	Cl ⁻
14	0,461	0,387	0,520	0,25	Cys336

Nach Erweiterung der Phasen auf 1,54 Å mit SHELXE wurden interpretierbare Elektronendichtekarten (*Abb. 24*) erhalten, in die ein nahezu vollständiges Modell von FGE (266 von 287 Aminosäureresten) automatisch mit ARP/wARP einbaut wurde.

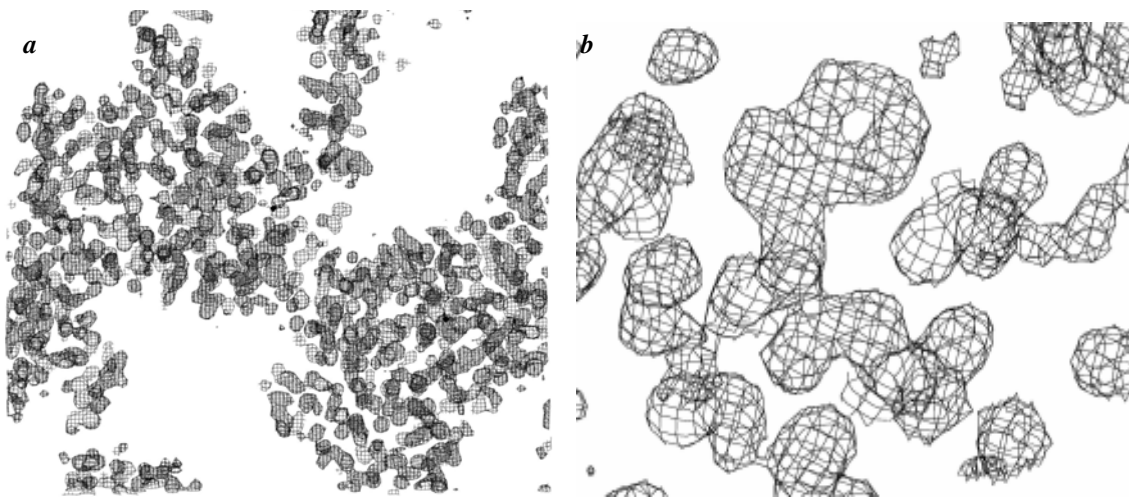


Abb. 24 Experimentelle Elektronendichtekarten nach Dichtemodifikation und Erweiterung der Phasen in SHELXE. (*a*) Ein zwei Moleküle umfassender Ausschnitt zeigt eine klare Abgrenzung gegen das umgebende Lösungsmittel. (*b*) Vergrößerung einer Tryptophanseitenkette. Die Karten wurden bei 1σ konturiert.

Anhand des verfeinerten Modelles wurde ersichtlich, daß die Positionen 1 und 2 der SAD Substruktur zwei Ca^{2+} -Ionen repräsentieren, während die übrigen Positionen vor allem durch Schwefelatome, daneben ein weiteres Ca^{2+} -Ion und ein Chloridion besetzt sind. Bei Verwendung von $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) ist das dispersive Signal von Schwefel etwa halb so gross wie das von Calcium ($f''\text{S}=0,56 e^-$ bzw. $f''\text{Ca}^{2+}=1,29 e^-$). Dies äussert sich durch den geringeren relativen Besetzungsgrad der weniger stark besetzten Positionen.

Eine interessante Frage war, welche minimale Multiplizität der Daten für die SAD Strukturbestimmung ausgereicht hätte. Um das mindestens benötigte anomale Signal herauszufinden, wurde die Multiplizität der Daten schrittweise erhöht. Dazu wurden Datensätze unterschiedlicher Multiplizität erzeugt, indem die insgesamt 697 Beugungsbilder des gesamten Datensatzes ausgehend vom ersten Bild in Schritten von 50 Bildern skaliert wurden. Das anomale Signal dieser Datensätze wurde mit SHELXC berechnet. HKL2MAP (Pape & Schneider, 2004) wurde zur Substruktur Suche, SHELXE zur Dichtemodifikation und Phasenerweiterung, Arp/wArp zum automatischen Modellbau verwendet. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden dabei für alle Datensätze identische Programmparameter verwendet. Die Substruktursuche war mit Daten aus 450 Beugungsbildern ($\Delta\phi=225^\circ$, Multiplizität 7,9, durchschnittliches anomales Signal bis zu einer Auflösung von $1,8 \text{ \AA}$ von $1,60$) das erste Mal erfolgreich. Allerdings blieben Versuche eines automatischen Modellbaus in Elektronendichtekarten, die anhand der erhaltenen Substruktur berechnet wurden, erfolglos. Wurden weitere 50 Beugungsbilder verwendet ($\Delta\phi=250^\circ$, Multiplizität 8,8, durchschnittliches anomales Signal bis zu einer Auflösung von $1,8 \text{ \AA}$ von $1,64$) wurden Elektronendichtekarten erhalten, in die mit Arp/wArp ein Modell mit 266 Aminosäureresten automatisch eingebaut wurde. Bei weiterer Erhöhung der Multiplizität waren die Ergebnisse nahezu identisch und es wurden Modelle mit 260-266 Aminosäureresten erhalten.

Um den relativen Beitrag der Ca^{2+} -Ionen und Schwefelatom Substrukturen zur Phasierung zu untersuchen, wurden unter Verwendung der erzeugten Datensätze unterschiedlicher Multiplizität Phasierungsversuche mit nur einem Atomtyp unternommen. Dazu wurden die von diesen Datensätzen erhaltenen Substrukturen in 2 Ca^{2+} und 10 Schwefel Positionen aufgeteilt und getrennt für die Phasenerweiterung in SHELXE und automatischen Modellbau in Arp/wArp benutzt. Der relative Beitrag der Ca^{2+} -Ionen und Schwefelatome zur erfolgreichen Phasierung war unterschiedlich. Die ausschliessliche Verwendung der

Schwefelatom-Positionen für die Phasierung resultierte nicht in interpretierbaren Elektronendichtekarten, während interpretierbare Elektronendichtekarten unter ausschliesslicher Verwendung der beiden Ca^{2+} Positionen erzeugt werden konnten. Die Qualität dieser Karten war nur geringfügig schlechter als die der Karten, die anhand der kompletten Substruktur berechnet wurden. Dies zeigt eindeutig, dass die Ca^{2+} -Ionen den entscheidenden Beitrag zur Phasierung leisten. Obwohl die Positionen der Schwefelatome alleine nicht in interpretierbaren Elektronendichtekarten resultierten, trugen sie trotzdem zur Phasierung bei. Während unter Verwendung der vollständigen Substruktur ein nahezu vollständiges Modell (266 Aminosäurereste) von einem Datensatz mit einer Multiplizität von 8,8 erhalten wurde, betrug die erforderliche Multiplizität bei ausschliesslicher Verwendung der Ca^{2+} Positionen 9,6 und resultierte in einem Modell mit nur 245 automatisch eingebauten Aminosäureresten.

B.3.3 Bestimmung der Struktur von FGE Cys336Ser

Die Details der O_2 -abhängigen Oxidation eines Cysteinrestes zu einem FGly durch FGE sind bisher nicht verstanden. Die verfügbaren Kristallstrukturen von wildtyp-FGE in verschiedenen Oxidationszuständen (Dierks *et al.*, 2005) wiesen auf die Beteiligung der FGE-Aminosäurereste Cys336 und Cys341 an der Katalyse hin. Der Austausch dieser Reste gegen einen Serinrest führte zur Inaktivität der entsprechenden FGE Cys336Ser bzw. Cys341Ser Mutanten (Dierks *et al.*, 2005). Es war jedoch unklar, inwiefern sich diese Mutationen auf die Struktur des FGE-Moleküls auswirken. Um einen möglichen Einfluss der Mutationen auf die Stabilität des FGE-Moleküls zu prüfen, wurde eine Strukturbestimmung der Mutanten vorgenommen.

B.3.3.1 Kristallisation und Strukturbestimmung von FGE Cys336Ser

Kristalle von FGE Cys336Ser wurden nach limitierter Proteolyse des Proteins mit Elastase unter Anwendung der für wildtyp-FGE beschriebenen Kristallisationsbedingungen (Dierks *et al.*, 2005) erhalten. Ein Datensatz, bestehend aus 204 Beugungsbildern, wurde von einem FGE Cys336Ser Kristall aus 29% PEG4000, 100 mM TRIS/HCl pH 8,5, 300 mM CaCl_2 aufgenommen. Der Kristall-Detektorabstand betrug 120 mm. Die Expositionszeit pro Aufnahme betrug 5 min, wobei der Kristall jeweils um $0,5^\circ$ gedreht wurde. Die Indizierung und Integration der gemessenen Reflexe mit DENZO war konsistent mit der

Raumgruppensymmetrie P222. Durch Molekularen Ersatz stellte sich P₂₁₂₁2 als die richtige Raumgruppe heraus. Zur Abschätzung der Anzahl an Molekülen in der asymmetrischen Einheit wurde das Volumen der Einheitszelle anhand der ermittelten Zellkonstanten zu 293692 Å³ berechnet. Die Raumgruppe P₂₁₂₁2 ist durch vier Symmetrieeoperatoren definiert, somit setzt sich die Einheitszelle aus vier asymmetrischen Einheiten zusammen. Bei einem Molekül pro asymmetrischer Einheit setzt sich die Einheitszelle aus insgesamt 4 Molekülen zusammen. Durch Division des Einheitszellvolumens durch das Molekulargewicht von vier FGE-Molekülen wurde der Matthews-Parameter V_M (Matthews, 1968), der für Proteinkristalle typischerweise im Bereich von 1,7 – 3,0 Å³/Da liegt, zu 2,25 Å³/Da berechnet. Der Lösungsmittelanteil der Kristalle betrug 45%. Die Statistiken der Datensammlung und Strukturverfeinerung sind in *Tab. 10* zusammengefasst.

Tab. 10 Statistiken der Datensammlung und Strukturverfeinerung von FGE Cys336Ser.

Datensatz	FGE Cys336Ser
Kristall	
Raumgruppe	P ₂ ₁ ₂ ₁ 2
Elementarzelle, Å bzw. °	a=61,8 b=109,5 c=43,4 α=β=γ=90.0
Datensammlung	
Auflösungsbereich, Å ^a	30,0-1,66 (1,72-1,66)
Zahl der gemessenen Reflexe ^a	117697 (3763)
Zahl der unabhängigen Reflexe ^a	34103 (2228)
Vollständigkeit, % ^a	95,6 (63,7)
Mosaizität, °	0,45
R _{sym} , % ^{a,b}	6,3 (45,0)
Durchschnittliche I/σ(I) ^a	17,5 (1,5)
Verfeinerung	
Auflösungsbereich, Å ^a	25,17-1,66 (1,71-1,66)
R _{cryst} , % ^{a,c}	14,9 (32,5)
R _{free} , % ^{a,d}	18,7 (40,1)
Anzahl der Reste / Wasser	271/498
Koordinatenfehler	0,062
Standardabweichung Bindungen, Å / Winkel, °	0,012/1,37
Ramachandran Diagramm, % ^e	87,9 / 11,2 / 0 / 0,9
Durchschnittliche B-Werte, Å ²	25,5±9,8

^a Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

^b $R_{sym} = 100 \cdot \sum_i \sum_j |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_i \sum_j I_i(h)$, dabei ist $I_i(h)$ der i-te Messwert des Reflexes h und $\langle I(h) \rangle$ der Durchschnittswert der Reflexintensität.

^c $R_{cryst} = \sum |F_o| - |F_c| / \sum |F_o|$, dabei sind F_o und F_c die Strukturfaktoramplituden der Daten bzw. des Modells

^d $R_{free} = R_{cryst}$ berechnet anhand eines Testsets mit 5% der Strukturfaktoren.

^e Zahlen beziehen sich auf den prozentualen Anteil von Aminosäureresten in Kern-, erlaubten-, generell erlaubten-, und nicht erlaubten Regionen.

B.3.3.2 Strukturanalyse

B.3.3.2.1 Vergleich der Strukturen von FGE Cys336Ser und wildtyp-FGE

Durch Vergleich der Struktur von FGE Cys336Ser mit der Struktur von reduziertem wildtyp FGE (PDB-Eintrag 1Y1E, Dierks *et al.*, 2005) wurde geprüft, inwiefern sich die Mutation des Cysteinrestes Cys336 zu einem Serin auf die Struktur des FGE-Moleküls auswirkt. Eine Überlagerung der Strukturen zeigt lediglich geringfügige Änderungen in der direkten Umgebung des aktiven Zentrums. Die auftretenden Abweichungen im Verlauf des C α -Rückgrates liegen in der Grössenordnung von 0,2 Å und kompensieren die im Vergleich zum natürlichen Cysteinrest etwas geringere Grösse des eingeführten Serinrestes. Die Cys336Ser Mutation hat nahezu keine Auswirkungen auf die Gesamtstruktur des FGE-Moleküls und die strukturelle Integrität des Moleküls bleibt erhalten. Die Inaktivität der FGE Cys336Ser Mutante ist somit nicht auf eine Destabilisierung des FGE-Moleküls zurückzuführen, was die Annahme einer direkten Beteiligung des Cysteinrestes in der Katalyse unterstützt.

B.3.4 Bestimmung der Struktur von FGE Cys336Ser im Komplex mit Arylsulfatase A abgeleiteten Peptiden

Die verfügbaren Kristallstrukturen von FGE erlaubten die Identifizierung einer möglichen Substratbindungstasche an der Oberfläche von FGE (Dierks *et al.*, 2005). Eine genauere Charakterisierung der Substratbindung durch FGE erforderte die Kristallisation und Strukturbestimmung eines FGE/Substrat-Komplexes. Das natürliche Substrat von FGE sind neu synthetisierte Sulfatasen im noch ungefalteten Zustand. Das Substrat kann somit durch Peptide, die anhand der Aminosäuresequenz von Sulfatasen abgeleitet werden können, nachgeahmt werden. In vorangegangenen Experimenten wurde versucht, wildtyp-FGE im Komplex mit Peptiden, die anhand der Aminosäuresequenz von humaner Arylsulfatase A abgeleitet wurden, zu kristallisieren. Dabei wurden Peptide mit einer Länge von 5 bis 13 Aminosäureresten verwendet. In allen Fällen, in denen Kristalle erhalten wurden, enthielten die resultierenden Strukturen jedoch kein gebundenes Peptid – entweder, weil die Peptide nicht von FGE gebunden wurden, oder die Peptide wurden durch FGE umgesetzt (Roeser *et al.*, 2006). Folglich bot sich die Verwendung der zuvor charakterisierten, katalytisch inaktiven FGE Cys336Ser Mutante an.

B.3.4.1 Kristallisation von FGE Cys336Ser/CTPSR- und /LCTPSRA-Peptid-Komplexen

Die verwendeten pentameren bzw. heptameren Peptide entsprachen den Aminosäureresten 69-73 bzw. 68-74 von humaner Arylsulfatase A. Zur Kristallisation eines FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplexes wurde FGE Cys336Ser nach limitierter Proteolyse mit Elastase mit den Peptiden komplexiert und anschliessend zur Kristallisation eingesetzt. Kristalle mit hervorragenden Beugungseigenschaften wurden erneut unter Anwendung der für wildtyp-FGE beschriebenen Kristallisationsbedingungen (Dierks *et al.* 2005) erhalten.

B.3.4.2 Datenaufnahme, Prozessierung, Strukturbestimmung und Verfeinerung

Ein FGE Cys336Ser/CTPSR-Peptid-Komplex Kristall wurde direkt aus der Kristallisationslösung (30% PEG4000, 100 mM TRIS/HCl pH 8,5, 250 mM CaCl₂) im Kühlstrahl bei 100 K tiefgekühlt. Ein Datensatz, bestehend aus 298 Beugungsbildern, wurde bei einem Kristall-Detektorabstand von 100 mm aufgenommen, wobei der Kristall pro Bild um 0,4° gedreht wurde und die jeweilige Expositionszeit 2,5 min betrug.

Von einem FGE Cys336Ser/LCTPSRA-Peptid-Komplex Kristall aus 31% PEG4000, 100 mM TRIS/HCl pH 8,5, 300 mM CaCl₂ wurde ein Datensatz bestehend aus 249 Beugungsbildern bei einem Kristall-Detektorabstand von 150 mm aufgenommen. Pro Bild wurde der Kristall um 1° gedreht, die Expositonszeit betrug jeweils 5 min. Ein weiterer Datensatz des selben Kristalles wurde nach Verringerung des Kristall-Detektorabstandes auf 130 mm (entsprechend einer maximalen Auflösung von 1,73 Å) aufgenommen, wobei der Kristall pro Bild um 0,5° gedreht wurde und die Expostionszeit 5 min betrug.

Die beiden FGE Cys336Ser/LCTPSRA Datensätze wurden getrennt prozessiert und während der Skalierung in einem Datensatz vereint. Die Strukturen der FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplexe wurden durch molekularen Ersatz gelöst.

Tab. 11 Statistiken der Datensammlung und Strukturverfeinerung des FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplexes.

Datensatz	FGE Cys336Ser/CTPSR	FGE Cys336Ser/LCTPSRA
Kristall		
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Elementarzelle, Å bzw. °	a=61,6 b=109,6 c=43,5 α=β=γ=90.0	a=61,7 b=109,5 c=43,5 α=β=γ=90.0
Datensammlung		
Auflösungsbereich, Å ^a	30,0-1,55 (1,61-1,55)	30,0-1,73 (1,79-1,73)
Zahl der gemessenen Reflexe ^a	182700 (12102)	317364 (8425)
Zahl der unabhängigen Reflexe ^a	42603 (3825)	31093 (2688)
Vollständigkeit, % ^a	97,5 (89,3)	97,8 (87,0)
Mosaizität, °	0,60	0,85
R _{sym} , % ^{a,b}	3,3 (18,1)	7,1 (37,3)
Durchschnittliche I/σ(I) ^a	41,2 (5,6)	29,9 (1,8)
Verfeinerung		
Auflösungsbereich, Å ^a	24,5-1,55 (1,59-1,55)	29,7-1,73 (1,78-1,73)
R _{cryst} , % ^{a,c}	14,4 (20,3)	14,1 (0,20)
R _{free} , % ^{a,d}	17,8 (25,5)	17,4 (25,9)
Anzahl der Reste / Wasser	278 / 531	279 / 495
Koordinatenfehler	0,047	0,059
Standardabweichung Bindungen, Å / Winkel, °	0,012 / 1,41	0,012 / 1,34
Ramachandran Diagramm, % ^e	86,7 / 12,4 / 0 / 0,9	87,2 / 11,9 / 0 / 0,9
Durchschnittliche B-Werte, Å ²	24,2 ± 10,6	28,9 ± 10,5

^a Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

^b $R_{sym} = 100 \cdot \sum_i \sum_j |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_i \sum_j I_i(h)$, dabei ist $I_i(h)$ der i-te Messwert des Reflexes h und $\langle I(h) \rangle$ der Durchschnittswert der Reflexintensität.

^c $R_{cryst} = \sum |F_o| - |F_c| / \sum |F_o|$, dabei sind F_o und F_c die Strukturfaktoramplituden der Daten bzw. des Modells

^d $R_{free} = R_{cryst}$ berechnet anhand eines Testsets mit 5% der Strukturfaktoren.

^e Zahlen beziehen sich auf den prozentualen Anteil von Aminosäureresten in Kern-, erlaubten-, generell erlaubten-, und nicht erlaubten Regionen.

Elektronendichte für das Peptid war ausgehend vom S_γ-Atom von Cys341 zu erkennen. und wurde durch Einbau einer Cys-Thr-Pro-Ser-Arg Peptidsequenz interpretiert. Im Falle des FGE Cys336Ser/LCTPSRA-Peptid-Komplexes war ausserdem Elektronendichte für den N-terminalen Leucinrest des Peptides erkennbar, während für den C-terminalen Alaninrest interpretierbare Elektronendichte nur für das N-Atom der Peptidbindung vorhanden war.

B.3.4.3 Strukturanalyse

B.3.4.3.1 Identifikation der Substratbindestelle von FGE

In den FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplex Strukturen war Elektronendichte für das jeweilige Substratpeptid ausgehend vom S_γ-Atom von Cys341 zu

erkennen. Diese setzte sich in Richtung des zuvor als mögliche Substratbindestelle von FGE identifizierten Bereiches (Dierks *et al.*, 2005) fort. Somit konnten die angestellten Vermutungen hinsichtlich der Lokalisation der Substratbindestelle von FGE durch die erhaltenen Strukturen bestätigt werden.

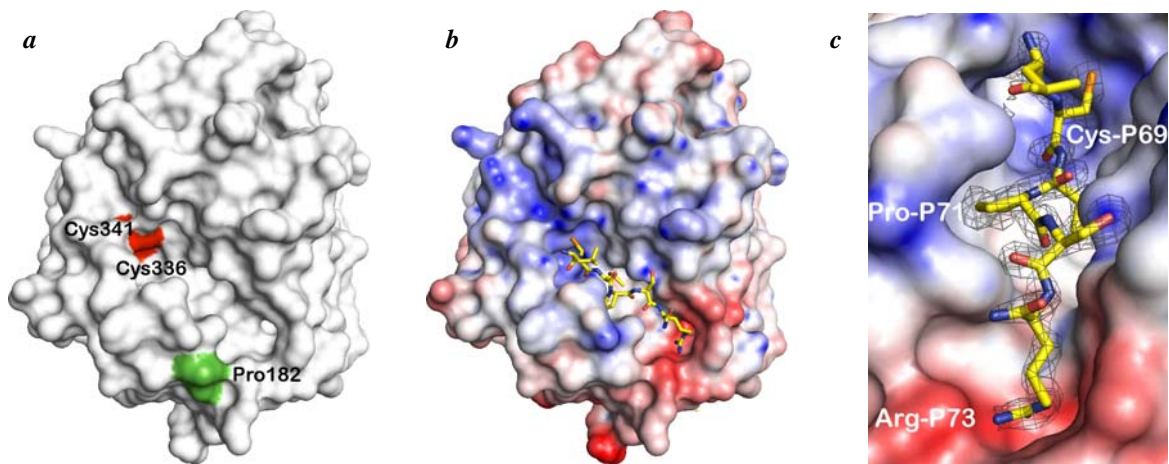


Abb. 25 Die Substratbindestelle von FGE. **(a)** Oberflächendarstellung von FGE. Die katalytisch aktiven FGE Aminosäurereste Cys336 und Cys341 (rote Bereiche) sind an einem Ende einer ovalen Furche von 20 Å Länge, 12 Å Breite und 10 Å Tiefe lokalisiert, Pro182 (grüner Bereich) ist ebenfalls nahe dieser Furche lokalisiert (Dierks *et al.*, 2005). **(b)** FGE/LCTPSRA-Komplex. Das Substratpeptid bindet unter Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke mit Cys341. Die Oberfläche ist entsprechend dem elektrostatischen Potential (± 10 kT) gefärbt, in der Nähe des C-Terminus des Substratpeptides liegt eine negative Ladung vor. **(c)** Vergrösserte Darstellung der Substratbindestelle, wie **b**, etwa 45° im Uhrzeigersinn gedreht.

B.3.4.3.2 Kovalente Substratbindung durch FGE

Die erhaltenen Strukturen zeigen, dass das jeweilige Substratpeptid kovalent, unter Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen FGE Cys341 und dem Cysteinrest des Substratpeptides, gebunden wird.

B.3.4.3.3 Sequenzspezifische Substratbindung

Durch die Bindung des Substratpeptides an FGE werden 80% der Peptid-Gesamtoberfläche (498 \AA^2) bedeckt. Diese Fläche ist kleiner als typische Protein-Protein-Erkennungsstellen, die im Bereich von $1600 \pm 400 \text{ \AA}^2$ liegen (Lo Conte *et al.*, 1999) und entspricht eher der starker Peptid-MHC-Wechselwirkungen (Rudolph *et al.*, 2002). Trotzdem ist die apparente Affinität von Sulfatase-abgeleiteten Peptiden mit K_M Werten im

Bereich von 13 nM hoch (Dierks *et al.*, 2005). Ein weiteres Merkmal spezifischer Wechselwirkung ist eine hohe Komplementarität der interagierenden Oberflächen von Molekülen (Lawrence *et al.*, 1993). Die hohe Oberflächenkomplementarität des Peptids zu FGE kommt durch einen S_c -Wert von 0,64 (bei perfekter Oberflächenkomplementarität würde dieser Wert 1 betragen) zum Ausdruck. Werden zusätzlich Wassermoleküle berücksichtigt, erhöht sich der Wert auf 0,75. Dies zeigt, dass das umgebende Lösungsmittel deutlich zur spezifischen Bindung des Substrates beiträgt und somit von grundlegender Bedeutung bei der Erkennung des Substrates durch FGE ist.

Die hohe Komplementarität der Oberflächen von FGE und dem Substratpeptid resultiert in insgesamt 50 van der Waals Kontakten und 24 Wasserstoffbrückenbindungen (Tab. 12 und Abb. 26). Die Hälfte der Wasserstoffbrückenbindungen wird dabei indirekt, unter Beteiligung von Wassermolekülen, ausgebildet. An der Ausbildung der insgesamt 12 direkten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen FGE und dem Substratpeptid sind lediglich 3 FGE Hauptkettenatome (Thr353 N, Asp154 O und Asp355 O) beteiligt. Demnach kommt den an der Ausbildung der übrigen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten FGE-Aminosäureseitenketten eine besondere Bedeutung bei der Festlegung der Substratspezifität zu. Diese umfassen die konservierten Reste Ala149, Phe152, Phe156, Trp180, Arg343, Asn352, Thr353, Asp355, Ser356, Ser357 und Asn360. Die übrigen Reste liegen in homologen FGEs nicht konserviert vor, die betreffenden Reste sind allerdings durch Reste mit ähnlicher Grösse und ähnlichen chemischen Eigenschaften ersetzt. Beispielsweise sind Asp154 in Seeigel FGE durch Asn, und Ala176 sowie Gln351 durch Ser bzw. Glu in FGE aus Tunikaten ersetzt.

Tab. 12 Nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen FGE und dem LCTPSRA-Peptid.

van der Waals Kontakte			
FGE Aminosäurerest		Peptid Aminosäurerest	Zahl der Kontakte
Ala176		Leu-P68	3
Trp180		Cys-P69	1
Phe156		Pro-P71	8
Ala176		Pro-P71	6
Trp180		Pro-P71	11
Ala149		Arg-P73	2
Asp154		Arg-P73	2
Phe152		Arg-P73	15
Phe156		Ser-P72	2
Wasserstoffbrückenbindungen			
Direkte Wasserstoffbrückenbindungen			
FGE Aminosäurerest		Peptid Aminosäurerest	Bindungslänge, Å
Tyr340 OH		Leu-P68 O	3,0
Asn360 Nδ2		Cys-P69 O	2,9
Arg343 Nη1		Cys-P69 Sγ	2,8
Asn352 Nδ2		Thr-P70 O	2,8
Asn360 Oδ1		Thr-P70 Oγ	2,8
Asn352 Nδ2		Ser-P72 Oγ	2,9
Thr353 N		Ser-P72 Oγ	3,2
Asp154 O		Arg-P73 Nη2	2,9
Asp154 Oδ1		Arg-P73 Nη1	3,0 (Salzbrücke)
Asp355 O		Arg-P73 Nε	3,0
Ser356 Oγ		Arg-P73 N	2,9
Ser357 Oγ		Arg-P73 Nη2	3,1
durch Wassermoleküle vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen			
FGE Aminosäurerest	Wassermolekül	Peptid Aminosäurerest	Bindungslängen, Å
Trp179 Nε1	S130	Leu-P68 O	3,1 / 2,4
Trp180 Nε	S130	Leu-P68 O	3,0 / 2,4
Lys329 Nζ	S296	Thr-P70 N	3,0 / 2,9
Ser350 Oγ	S296	Thr-P70 O	3,0 / 3,0
Gln351 Oε1	S355	Thr-P70 O	3,1 / 3,1
Gln351 O	S355	Thr-P70 O	2,7 / 3,1
Ser357 N	S185	Pro-P71 O	3,0 / 2,9
Ser357 O	S185	Pro-P71 O	2,8 / 2,9
Asp326 Oδ1	S189	Ser-P72 Oγ	3,0 / 2,7
Thr353 Oγ1	S229	Arg-P73 O	2,7 / 2,9
Asp355 Oδ1	S229	Arg-P73 O	2,5 / 2,9
Ser357 Oγ	S70	Arg-P73 Nη2	3,1 / 2,8

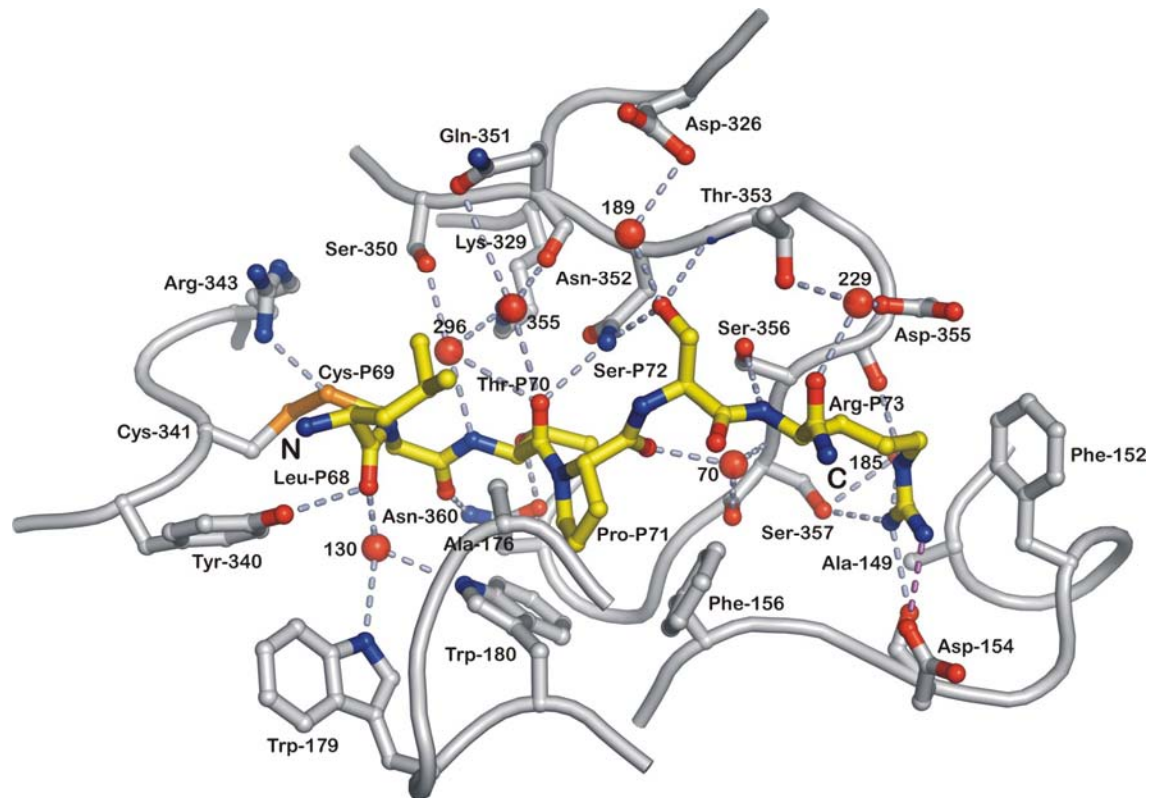


Abb. 26 Wechselwirkungen von FGE mit dem LCTPSRA-Substratpeptid. Wasserstoffbrückenbindungen sind in hellblau, Salzbrücken in violett dargestellt. An indirekten Wasserstoffbrückenbindungen beteiligte Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Alle Reste des Substratpeptides sind an Wechselwirkungen mit FGE beteiligt. Der hochkonserviert vorliegende Aminosäurerest Cys-P69 (nachfolgend werden alle Aminosäurereste des Substratpeptides durch ein P gekennzeichnet, die Numerierung der Reste erfolgt entsprechend den Positionen in humaner Arylsulfatase A) bindet kovalent, unter Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke, an FGE Cys341. Daneben bildet Cys-P69 eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von Asn360 und eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zwischen seinem Schwefelatom und der Guanidinium-Gruppe von Arg343 aus. Der nächste Rest des Substratpeptides, Thr-P70, liegt in verschiedenen Sulfatasen nicht konserviert vor. Neben Thr treten an dieser Position auch Ala, Cys oder Ser auf. Dies ist überraschend, da die Seitenkette von Thr-P70 in die FGE Substratbindestelle zeigt, was auf eine hochspezifische Wechselwirkung schließen liesse. Andererseits bildet Thr-P70 lediglich eine Wasserstoffbrückenbindung mit Asn360. Folglich ginge diese Wechselwirkung lediglich im Falle von Ala an dieser Position (Iduronat Sulfatase) verloren. Von besonderer Bedeutung für die Substratspezifität ist der nächste Aminosäurerest, Pro-P71, der in eine Tasche bindet, die von den konserviert

vorliegenden FGE-Aminosäureresten Phe156 und Trp180 gebildet wird. Die hydrophobe Wechselwirkung, auch mit Ala176, resultiert in insgesamt 25 van der Waals Kontakten. Damit bildet Pro-P70 die mit Abstand grösste Anzahl von van der Waals Kontakten aller Reste des Substratpeptides aus. Pro-P71 bildet allerdings keine direkten Wasserstoffbrückenbindungen mit FGE. Ser-P72 liegt in allen humanen Sulfatasen hochkonserviert vor. Die Seitenkette von Ser-P72 zeigt von der Substratbindungstasche aufwärts und bildet zwei direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit Asn352 und Thr353. Arg-P73 liegt in allen humanen Sulfatasen hochkonserviert vor. Dieser Rest ist an einer Vielzahl von Wechselwirkungen mit FGE beteiligt, wobei die chemischen Eigenschaften dieses Restes eine entscheidende Rolle für die Substratspezifität spielen. Im C-terminalen Bereich des Substratpeptides besitzt die Substratbindestelle von FGE aufgrund des hier lokalisierten Asp154 ein negatives elektrostatisches Potential. Die Guanidiniumgruppe von Arg-P73 neutralisiert die negative Ladung von Asp154 durch Ausbildung einer Salzbrücke. Zusätzlich bildet Arg-P73 Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonylgruppen von Asn154 und Asp355 sowie dem O_γ-Atom von Ser357.

Zusammenfassend sind folgende Strategien zum Erreichen der Substratspezifität erkennbar: Zum Einen bindet Pro-P71 mit hoher Oberflächenkomplementarität in eine hydrophobe Tasche, die durch die FGE-Aminosäurereste Phe156 und Trp180 ausgebildet wird. Zum Anderen zeigt Arg-P73 durch Neutralisation der Ladung von Asp154 elektrostatische Komplementarität (Abb. 27). Diese wenigen, aber starken Wechselwirkungen bieten die Basis für die Konservierung des minimalen Sequenzmotifs C(X/T)P(X/S)R zur Modifikation der Sulfatasen.

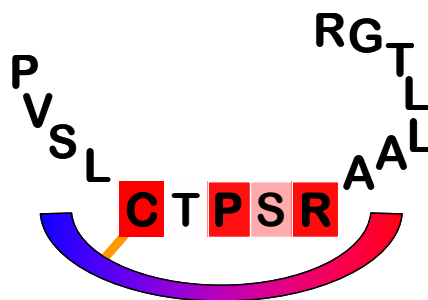


Abb. 27 Veranschaulichung des generellen Mechanismus der Substratbindung durch FGE. Das Substrat wird kovalent, unter Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen dem Substrat-Cystein und FGE Cys341 gebunden. Die Bindung von Prolin in eine komplementäre Tasche von FGE trägt entscheidend zur Substratspezifität bei. Der Argininrest neutralisiert die negative Ladung der Bindungstasche durch Ausbildung einer Salzbrücke mit einem Asparaginsäurerest.

B.3.4.3.4 Mit der Substratbindung einhergehende Konformationsänderungen von FGE

Eine Überlagerung der FGE Cys336Ser/LCTPSRA-Peptid-Komplex Struktur mit Der von apo-FGE ergibt eine Standardabweichung von etwa 0,2 Å über 272 gemeinsame C α -Atome. Grössere Konformationsänderungen beschränken sich auf die direkte Umgebung der Substratbindestelle (*Abb. 28*), wobei sich die FGE-Sequenzabschnitte Ser336-Tyr340 und Phe265-Pro266 0,5 Å bzw. 0,4 Å in Richtung des Substratpeptides bewegen. Während sich in Folge der kovalenten Bindung des Substrates über eine Disulfidbrücke mit Cys341 der FGE-Sequenzabschnitt Ser336-Tyr340 näher in Richtung der Substratbindestelle bewegt, rotiert die Seitenkette von Tyr340 etwa 80° um χ_1 , weg vom Peptid. Diese Änderung in der Seitenkettenkonformation von Tyr340 ist die grösste, während der Substratbindung auftretende Änderung von FGE. Die Anwesenheit des Substrates wirkt sich auch auf die FGE Aminosäurereste Phe156, Trp179, Gln351 und Asn352 aus. Die Seitenketten dieser Reste bewegen sich leicht nach aussen, um Platz für das Substratpeptid zu schaffen. Diese Verschiebungen liegen in einer Grössenordnung von weniger als 0,5 Å, was zeigt, dass nur kleinste Änderungen der Substratbindestelle notwendig sind, um das Peptid zu binden. Demnach bildet apo-FGE eine in ihrer Form bereits festgelegt Substratbindungstasche.

Vergleicht man die verfügbaren Strukturen von apo-FGE, finden sich in mindestens zwei dieser Strukturen 14 Wassermoleküle in der Substratbindestelle, wovon 8 Wassermoleküle strukturell konserviert vorliegen. Diese Wassermoleküle werden durch das Substratpeptid unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den FGE Seitenketten, die zuvor Wassermoleküle gebunden hatten, verdrängt.

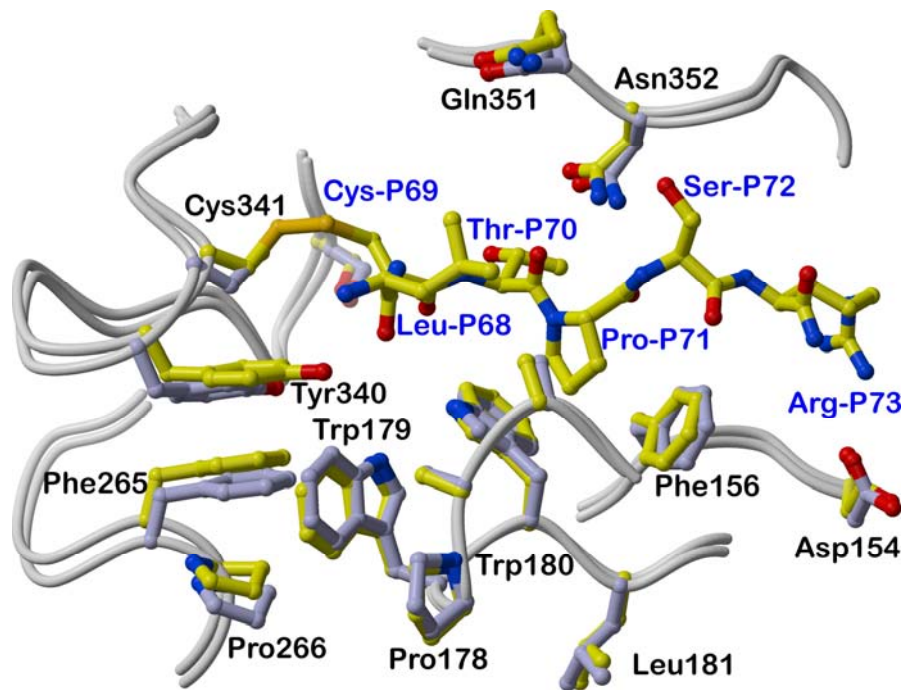


Abb. 28 Mit der Bindung des Substratpeptides einhergehende Konformationsänderungen von FGE. Gezeigt sind die überlagerten Strukturen von wildtyp apo-FGE (PDB-Eintrag 1Y1E, Dierks *et al.*, 2005; Seitenketten in blau) und FGE Cys336Ser/LCTPSRA (Seitenketten in gelb), wobei nur Regionen, die in den Strukturen deutlich voneinander abweichen, gezeigt sind. Das Substratpeptid LCTPSRA ist als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die Disulfidbrücke zwischen FGE Cys341 und Cys-P69 des Substratpeptides ist in orange dargestellt. Die grösste Konformationsänderung ist eine 6,4 Å Reorientierung von Tyr340 (siehe auch *Abb. 29*).

B.3.4.3.5 Hinweise zum Reaktionsmechanismus

Die FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplex Strukturen zeigen, dass das Substratpeptid unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen FGE Cys341 und Cys-P69 (dem Cysteinrest, der zu FGly modifiziert wird) kovalent gebunden wird. Die Ausbildung dieser Disulfidbrücke resultiert in der Abgrenzung eines Raumes mit einem Volumen von etwa 32 \AA^3 , der zwischen Ser336 (bzw. dem katalytisch aktiven Cys336 in wildtyp-FGE) und der neu ausgebildeten Disulfidbrücke lokalisiert ist (*Abb. 29*). Dieser Raum war in den bisher vorliegenden FGE Strukturen durch die Oxidationsprodukte von Cys336 – Sulfensäure bzw. Peroxid – ausgefüllt. In den vorliegenden Strukturen von FGE Cys336Ser im Komplex mit Substratpeptiden ist dieser Raum jedoch durch ein Chloridion besetzt, welches über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Seitenketten von Trp299, Ser333, Ser336 sowie einem Wassermolekül wechselwirkt. Halogenid-Ionen besitzen eine

gewisse Hydrophobizität. Dies ist auch für molekularen Sauerstoff zutreffend. Der Raum, dessen Abgrenzung aus der Bildung der intermolekularen Disulfidbrücke zwischen FGE Cys341 und Cys-P69 resultiert, könnte somit die reaktiven Sauerstoffspezies beherbergen, die vermutlich aus molekularem Sauerstoff durch FGE gebildet werden (Dierks *et al.*, 2005). Der Raum ist nahe zu allen drei Cysteinresten – FGE Cys361 und Cys341 sowie Cys-P69 des Substratpeptides – lokalisiert und grösstenteils gegenüber dem umgebenden Lösungsmittel geschützt.

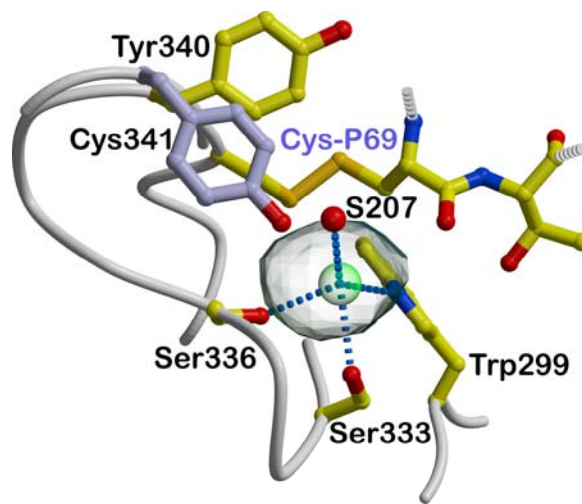


Abb. 29 Ausschnitt aus der Struktur des FGE Cys336Ser/LCTPSRA-Peptid-Komplexes. Es sind nur die Aminosäurereste Cys-P69 und Thr-P70 des Substratpeptides gezeigt. Der Raum, dessen Abgrenzung aus der Bildung der intermolekularen Disulfidbrücke zwischen FGE Cys341 und Cys-P69 resultiert, ist als transparente graue Kugel dargestellt.

Die FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplex Strukturen zeigen eindeutig, dass der FGE Aminosäurerest Cys341 das Substrat kovalent, unter Ausbildung einer Disulfidbrücke mit dem Substrat-Cystein, bindet, was den vorgeschlagenen Katalysemechanismus (Dierks *et al.*, 2005) grundsätzlich bekräftigt. Eine eindeutige Klärung des Reaktionsmechanismus anhand der zur Zeit verfügbaren biochemischen und strukturellen Daten ist nicht möglich.

B.4 DISKUSSION

FGE ist ein Enzym, das im ER lokalisiert ist und den limitierenden Schritt in der Aktivierung neusynthetisierter Sulfatasen – die Bildung eines FGly aus einem Cysteinrest – katalysiert. Der Mechanismus der Katalyse von FGly durch FGE ist noch immer unvollständig verstanden, insbesondere weil das Enzym keine redoxaktiven Kofaktoren oder Metallionen enthält. Dies lässt auf einen neuen Oxygenase Mechanismus schließen. Ein wichtiger Schritt zum Verständnis des molekularen Mechanismus war die Bestimmung der Kristallstruktur von FGE in verschiedenen Oxidationszuständen (Dierks *et al.*, 2005). Dabei wurde ein redoxaktives Cysteinpaar (Cys336/Cys341) identifiziert, das vermutlich das aktive Zentrum des Enzyms bildet. Diese Annahme wurde durch die Inaktivität der entsprechenden Cys336Ser und Cys341Ser Mutanten unterstützt.

Es war jedoch unklar, inwiefern sich die Mutation dieser Cysteinreste auf die Gesamtstruktur des FGE Moleküls auswirkt. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Struktur von FGE Cys336Ser zeigt, dass die strukturelle Integrität von FGE bei Mutation dieses Cysteinrestes gewahrt bleibt. Interessanterweise lag in den unabhängig bestimmten Strukturen von FGE Cys341Ser Cys336 voll oxidiert, in Form der Cystein-Sulfonsäure vor (Roeser *et al.*, 2006). Da FGE Cys336Ser und FGE Cys341Ser unter identischen Bedingungen kristallisiert wurden, weist dieser Befund auf eine erhöhte Redoxaktivität (ein negativeres Potential) von Cys336 im Vergleich mit Cys341 hin. Diese Annahme wurde durch einen Versuch, die relative Reaktivität von Cys336 und Cys341 zu unterscheiden, bestätigt. Dabei wurde die Struktur eines Iodacetamid (IAM)-modifizierten wildtyp FGE Kristalles bestimmt. IAM ist ein starkes Elektrophil, das kovalent und irreversibel Cysteinreste modifiziert (Creighton, 1992). Elektronendichte für die Carboxyamidomethylgruppe war ausschliesslich an Cys336, nicht an Cys341 vorhanden (Roeser *et al.*, 2006). Die ausschliessliche Modifikation von Cys336 durch IAM sowie die Oxidation von Cys336 in der Struktur der FGE Cys341Ser Mutante erlauben die Schlussfolgerung, dass Cys336 reaktiver als Cys341 ist. Demnach zeigen die katalytisch bedeutsamen FGE Cysteinreste Cys336 und Cys341 eine unterschiedliche Redoxaktivität. Beide Cysteinreste sind an Redoxreaktionen beteiligt. Die FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplex Strukturen zeigen eindeutig, dass Cys341 das Substrat kovalent unter Ausbildung einer Disulfidbrücke mit dem Substrat-Cystein bindet. Durch

Kokristallisation von FGE Cys341Ser mit denselben pentameren bzw. heptameren Peptiden erhaltene Strukturen zeigten kein gebundenes Peptid (Roeser *et al.*, 2006). Dies zeigt eindeutig, dass der FGE-Aminosäurerest Cys341 – nicht Cys336 – für die Bindung des Substrates verantwortlich ist. Dieser Befund steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Cys336 reaktiver als Cys341 ist. Demnach bindet Cys341 das Substrat, während das hochreaktive Cys336 als Teilschritt der Oxidation des Substrat-Cysteins mit molekularem Sauerstoff reagieren kann. Die Reaktion mit Sauerstoff könnte die beobachtete Erhöhung der Aktivität von Cys336 erfordern, während die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys341 und dem Substrat-Cystein einen kleinen, abgeschlossenen Reaktionsraum schafft und die Überoxidation und damit einhergehende Inaktivierung von Cys336 verhindert.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Strukturen von FGE im Komplex mit Substratpeptiden zeigen die Grundlagen für die Bindung aller humanen Sulfatasen durch FGE. Die Tatsache, dass das spezifisch erkannte Motiv C(X/T)P(X/S)R – insbesondere die für die Substratspezifität verantwortlichen Aminosäurereste Cys, Pro und Arg – nicht nur in den 17 humanen Sulfatasen, sondern auch in Sulfatasen anderer Organismen bis hin zu Sulfatasen aus Prokaryoten hochkonserviert vorliegen, lässt vermuten, dass die hier beschriebenen Mechanismen der spezifischen Wechselwirkung von FGE mit dem Substratpeptid von universeller Gültigkeit sind, und folglich auch die Modifikation von Sulfatasen durch einen universellen Mechanismus erfolgt.

Aus den FGE/CTPSR bzw. /LCTPSRA Strukturen werden zwei Mechanismen, die der Substratspezifität zugrunde liegen, deutlich. Zum Einen bindet Pro-P71 mit hoher Oberflächenkomplementarität in eine hydrophobe Tasche, die durch die FGE-Aminosäurereste Phe156 und Trp180 ausgebildet wird. Zum Anderen zeigt Arg-P73 durch Neutralisation der Ladung von Asp154 elektrostatische Komplementarität. Die Bedeutung der Oberflächenkomplementarität zwischen der durch die FGE Aminosäurereste Phe156 und Trp180 geformten Tasche und dem hochkonserviert vorliegenden Prolinrest in Sulfatasen (Pro-P71 der Substratpeptide in den FGE Cys336Ser/CTPSR- bzw. /LCTPSRA-Peptid-Komplex Strukturen) wird durch das Auftreten von drei verschiedenen Mutationen in Iduronatsulfatase, bei denen dieser Prolinrest zu Leucin (Balzano *et al.*, 1998), Glutamin (Hopwood *et al.*, 1993) oder Arginin (Bunge *et al.*, 1993) mutiert ist, deutlich. Die genannten Mutationen führen zu mittleren bis schweren Formen des Hunter-Syndroms. Auch die Bedeutung des Argininrestes wird durch die Auswirkungen auftretender Mutationen untermauert. Die Mutation zu einem Glutamin in Arylsulfatase B (Hopwood *et*

al., 1993), Cystein oder Histidin in Sulfamidase (Bunge *et al.*, 1997), bzw. Cystein (Hopwood *et al.*, 1993), Histidin (Balzano *et al.*, 1998), Leucin (Hopwood *et al.*, 1993) oder Prolin (Balzano *et al.*, 1998) in Iduronatsulfatase führen zu mittleren bis schweren Formen von Mucopolysaccharidosen.

Bisher wurden 18 verschiedene Mutationen im FGE kodierenden Gen beschrieben, die zu der seltenen Krankheit MSD führen. Die möglichen Auswirkungen dieser Mutationen auf die Struktur des FGE-Moleküls wurden anhand der Struktur von apo-FGE untersucht (Dierks *et al.*, 2005). Zwei dieser Mutationen – Ala177Pro (Cosma *et al.*, 2004) und Trp179Ser (Dierks *et al.*, 2005) – die in einer Schleife in der Nähe der Substratbindestelle lokalisiert sind, konnten dabei nicht vollständig charakterisiert werden. Die FGE/CTPSR- und /LCTPSRA-Peptid-Komplex Strukturen bestätigen, dass die Aminosäurereste 177 und 179 tatsächlich in unmittelbarer Nähe des gebundenen Substratpeptides lokalisiert sind. Trp179 ist an einer Wassermolekül-vermittelten Wasserstoffbrückenbindung beteiligt, die durch die Mutation zu einem Serin zerstört würde. Ala177 ist nicht direkt an Wechselwirkungen mit dem Substratpeptid beteiligt. Der benachbarte Rest Ala176 bildet allerdings 6 van der Waals Kontakte mit Pro-P71 des Substratpeptides. Möglicherweise wirkt sich die Ala177Pro Mutation auch auf die Konformation des benachbarten Ala177 aus, sodass die Wechselwirkung mit dem Substratpeptid ausbleibt. Der vergleichsweise milde Phänotyp der Ala177Pro Mutation (Cosma *et al.*, 2004) zeigt, dass die Wechselwirkung des Substrates mit den betroffenen Aminosäureresten der Schleifenregion wichtig, aber nicht absolut notwendig für die Bindung des Substrates und Bildung von FGly ist.

Die Modifikation eines Cysteinrestes zu FGly erfolgt posttranslational an der noch ungefalteten Sulfatase im Endoplasmatischen Retikulum. Das Signal zur Modifikation ist offenbar das Auftreten des konserviert vorliegenden CTPSR-Sequenzmotives. Demnach kommt jedes Protein, das dieses Motiv enthält und das ER passiert als Substrat für FGE in Frage. Eine Datenbanksuche unter Verwendung des Motives lieferte 15 Einträge bei denen es sich nicht um Sulfatasen handelt, 9 dieser Proteine konnten bisher funktionell eingeordnet werden (Roeser *et al.*, 2006). Dabei handelt es sich um cytoplasmatische oder mitochondriale Proteine und es ist unwahrscheinlich, dass diese Proteine die zweite wichtige Voraussetzung für eine Modifikation durch FGE – die Passage des ER – erfüllen. Demnach scheint die Funktion von FGE auf die Modifikation neusynthetisierter Sulfatasen beschränkt zu sein.

Wie FGE, ist das paraloge pFGE im ER lokalisiert und möglicherweise an der Modifikation von Sulfatasen beteiligt (Mariappan *et al.*, 2005). pFGE zeigt auf Aminosäureebene 50,6% Sequenzidentität mit FGE und besitzt eine relativ ähnliche Struktur (Dickmanns *et al.*, 2005). Allerdings fehlen die in FGE katalytisch aktiven Cysteinreste Cys336 und Cys341 und pFGE zeigt keine FGly-generierende Aktivität (Mariappan *et al.*, 2005). Daraus ergibt sich die Frage nach der biologischen Funktion von pFGE. Es wurde beschrieben, dass eine Homo- und Heterodimerisierung von pFGE/FGE und darüberhinaus die Bildung eines trimolekularen Komplexes von FGE, pFGE und Sulfatasen stattfinden kann (Zito *et al.*, 2005). Überlagerung der Struktur von pFGE mit den FGE/CTPSR- und FGE/LCTPSRA-Peptid-Komplex Strukturen (Abb. 30) ergibt keine sterischen Konflikte zwischen dem FGE-gebundenen Peptid und pFGE, sodass pFGE prinzipiell in einer ähnlichen Art und Weise wie FGE an Sulfatasen binden könnte. Die meisten Aminosäurereste, die in FGE an der Bindung des Substratpeptides beteiligt sind, liegen in pFGE konserviert vor. Erwähnenswerte Ausnahmen sind pFGE-Trp92 anstelle von FGE-Asp154 und pFGE-Ala282 anstelle von FGE-Ser357. In der Kristallstruktur liegt pFGE als Dimer vor (Dickmanns *et al.*, 2005). Allerdings ist die Bindungstasche zwischen den pFGE-Monomeren eingeschlossen. Ein ternärer Komplex von pFGE, FGE und Sulfatase mit einer pFGE/FGE Geometrie identisch der des beobachteten pFGE-Dimers ist auszuschliessen, da dabei ein Lysinrest von pFGE die Position von Arg-P73 des Substratpeptides einnehmen würde. Sollte ein trimolekularer Komplex von pFGE, FGE und Sulfatasen tatsächlich existieren, ist eine andere pFGE/FGE Anordnung als die des pFGE Dimers anzunehmen. Um die Möglichkeit der Bildung eines Komplexes von pFGE, FGE und Sulfatasen weitergehend einzuschätzen, sind weitere strukturelle und biochemische Untersuchungen notwendig.

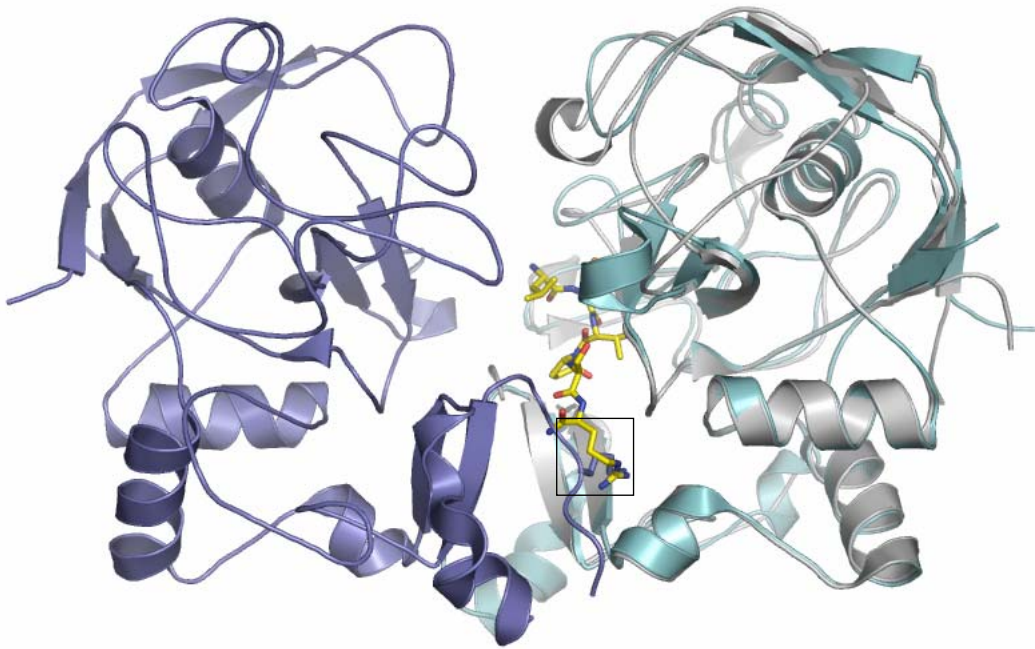
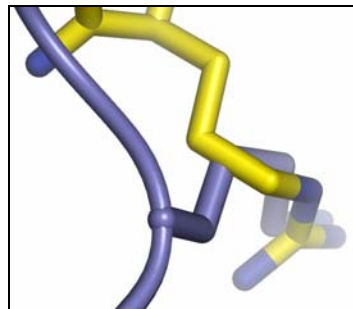
a*b*

Abb. 30 Überlagerung der Kristallstruktur des pFGE-Dimers (Monomere in violett bzw. hellblau) und des FGE/LCTPSRA-Peptid-Komplexes (FGE in grau, LCTPSRA-Peptid in gelb). Ein ternärer Komplex von pFGE, FGE und Sulfatase mit einer pFGE/FGE Geometrie identisch der des beobachteten pFGE-Dimers ist auszuschliessen, da dabei ein Lysinrest von pFGE die Position von Arg-P73 des Substratpeptides einnehmen würde (*b*).

Literaturverzeichnis

Abergel, C. (2004). Spectacular improvement of X-ray diffraction through fast desiccation of protein crystals. *Acta Cryst. D60*, 1413-1416.

Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10037-10041.

Ballabio, A., Parenti, G., Napolitano, E., Di Natale, P., Andria, G. (1985). Genetic complementation of steroid sulphatase after somatic cell hybridization of X-linked ichthyosis and multiple sulphatase deficiency. *Hum. Genet.* 70, 315-17.

Balzano, N., Villani, G. R., Grosso, M., Izzo, P., and Di Natale, P. (1998). Detection of four novel mutations in the iduronate-2-sulfatase gene. *Mutations in brief no. 123. Online. Hum. Mutat.* 11, 333.

Boltes, I., Czapinska, H., Kahnert, A., von Bulow, R., Dierks, T., Schmidt, B., von Figura, K., Kertesz, M. A., and Uson, I. (2001). 1.3 A structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family. *Structure* 9, 483-491.

Boman, A. L., Zhang, C., Zhu, X., and Kahn, R. A. (2000). A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the *trans*-Golgi. *Mol. Biol. Cell* 11, 1241-1255.

Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-166.

Bonifacino, J. S. & Lippincott-Schwartz, J. (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 409–414.

Bond, C. S., Clements, P. R., Ashby, S. J., Collyer, C. A., Harrop, S. J., Hopwood, J. J., and Guss, J. M. (1997). Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* 5, 277-289.

Bunge, S., Steglich, C., Zuther, C., Beck, M., Morris, C. P., Schwinger, E., Schinzel, A., Hopwood, J. J., and Gal, A. (1993). Iduronate-2-sulfatase gene mutations in 16 patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Hum. Mol. Genet.* 2, 1871-1875.

Bunge, S., Ince, H., Steglich, C., Kleijer, W. J., Beck, M., Zaremba, J., van Diggelen, O. P., Weber, B., Hopwood, J. J., and Gal, A. (1997). Identification of 16 sulfamidase gene mutations including the common R74C in patients with mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A). *Hum. Mutat.* 10, 479-485.

Chang, P. L., Davidson, R. G. (1980). Complementaton of arylsulfatase A in somatic hybrids of metachromatic leukodystrophy and multiple sulfatase deficiency fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 6166-70.

Ciccarone, V. C., Polayes, D., and Luckow, V. A. (1997). Generation of Recombinant Baculovirus DNA in *E. coli* Using Baculovirus Shuttle-Vector, Volume 13, Reischt, U. ed. (Totowa, N. J.: Humana Press Inc.).

Collins, B. M., Watson, P. J., and Owen, D. J. (2003). The structure of the GGA1-GAT domain reveals the molecular basis for ARF binding and membrane association of GGAs. *Dev. Cell* 4, 321-332.

Connolly, M. L. (1993). The molecular surface package. *J. Mol. Graph.* 11, 139-141.

Cosma, M. P., Pepe, S., Annunziata, I., Newbold, R. F., Grompe, M., Parenti, G., and Ballabio, A. (2003). The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell* 113, 445-456.

Cosma, M. P., Pepe, S., Parenti, G., Settembre, C., Annunziata, I., Wade-Martins, R., Di Domenico, C., Di Natale, P., Mankad, A., Cox, B. (2004). Molecular and functional analysis of *SUMF1* mutations in multiple sulfatase deficiency. *Hum. Mutat.* 23, 576-581.

Costaguta, G., Stefan, C. J., Bensen, E. S., Emr, S. D., and Payne, G. S. (2001). Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol. Biol. Cell* 12, 1885-1896.

Creighton, T. E. (1992). In: *Proteins, Structure and Molecular Properties* (Freeman).

DeLano, W. L. (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M., and Bonifacino, J. S. (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 149, 81-94.

Dickmanns, A., Schmidt, B., Rudolph, M. G., Mariappan, M., Dierks, T., von Figura, K., and Ficner, R. (2005). Crystal Structure of Human pFGE, the Paralog of the C α -formylglycine-generating Enzyme. *J. Biol. Chem.* 280, 15180-15187.

Dierks, T., Schmidt, B., and von Figura, K. (1997). Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11963-11968.

Dierks, T., Lecca, M. R., Schlotterhose, P., Schmidt, B., and von Figura, K. (1999). Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. *EMBO J.* 18, 2084-2091.

Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L. V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M., and von Figura, K. (2003). Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C α -formylglycine generating enzyme. *Cell* 113, 435-444.

Dierks, T., Dickmanns, A., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Mariappan, M., von Figura, K., Ficner, R., and Rudolph, M. G. (2005). Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell* 121, 541-552.

Doray, B., Bruns, K., Ghosh, P., and Kornfeld, S. A. (2002a). Autoinhibition of the ligand-binding site of GGA1/3 VHS domains by an internal acidic cluster-dileucine motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8072-8077.

Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J., and Kornfeld, S. (2002b). Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the *trans*-Golgi network. *Science* 297, 1700-1703.

Duncan, M. C., Costaguta, G. and Payne, G. S. (2003). Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a γ -adaptin ear-binding motif. *Nature Cell Biol.* 5, 77-81.

Ehresmann, B., Imbault, P., Weil, J. H. (1973). Spectrophotometric Determination of Protein Concentration in Cell Extracts Containing tRNA's and rRNA's. *Analyt. Biochem.* 54, 454-463

Emsley, P., Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D*60, 2126-2132.

Fedde, K., Horwitz, A. L. (1984). Complementation of multiple sulfatase deficiency in somatic cell hybrids. *Am. J. Hum. Genet.* 36, 623-33.

Fey, J., Balleininger, M., Borissenko, L. V., Schmidt, B., von Figura, K., and Dierks, T. (2001). Characterization of posttranslational formylglycine formation by luminal components of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 276, 47021-47028.

Frey, M. (1994). Water structure associated with proteins and its role in crystallization. *Acta Cryst. D50*, 663-666.

Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997). *J. Appl. Cryst.* 30, 211-237.

Garman, E. (1999). Cool data: quantity AND quality. *Acta Cryst. D55*, 1641-1653.

Gosh, P., Dahms, N. M. & Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 202-212.

Ghosh, P., & Kornfeld, S. (2003). Phosphorylation-induced conformational changes regulate GGAs 1 and 3 function at the *trans*-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 278, 14543-14549.

Hanson, S. R., Best, M. D., and Wong, C. H. (2004). Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43, 5736-5763.

Harp, J. M., Timm, D. E., & Bunick, G. J. (1998). Macromolecular crystal annealing: overcoming increased mosaicity associated with cryocrystallography. *Acta Cryst. D54*, 622-628.

Harp, J. M., Hanson, B. L., Timm, D. E. & Bunick, G. J. (1999). Macromolecular crystal annealing: evaluation of techniques and variables. *Acta Cryst. D55*, 1329-1334.

Heras, B., Edeling, M. A., Byriel, K. A., Jones, A., Raina, S. & Martin, J. L. (2003). Dehydration converts DsbG crystal diffraction from low to high resolution. *Structure*, 11, 139-145.

Hernandez-Guzman, F. G., Higashiyama, T., Pangborn, W., Osawa, Y., and Ghosh, D. (2003). Structure of human estrone sulfatase suggests functional roles of membrane association. *J. Biol. Chem.* 278, 22989-22997.

Hirst, J., Lui, W. W., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N., and Robinson, M. S. (2000). A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the *trans*-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* 149, 67-80.

Hooft, R. W. W., Vriend, G., Sander, C., Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381:272-2.

Hope, H. (1988). Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method. *Acta Cryst.* B44, 22-26

Hope, H. (1990). Crystallography of biological macromolecules at ultra-low temperature. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 107-126

Hopwood, J. J., Bunge, S., Morris, C. P., Wilson, P. J., Steglich, C., Beck, M., Schwinger, E., and Gal, A. (1993). Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum. Mutat.* 2, 435-442.

Hopwood, J. J. & Ballabio, A. (2001). Multiple sulfatase Deficiency and the nature of the sulfatase family. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. eds (New York: McGraw-Hill), 3725-3732.

Horwitz A. L. (1979). Genetic complementation studies of multiple sulfatase deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 6496-99.

Juers, D. H. & Matthews, B. W. (2001). Reversible lattice repacking illustrates the temperature dependence of macromolecular interactions. J. Mol. Biol. 311, 851-862.

Kato, Y., Misra, S., Puertollano, R., Hurley, J. H., and Bonifacino, J. S. (2002). Phosphoregulation of sorting signal-VHS domain interactions by a direct electrostatic mechanism. Nat. Struct. Biol. 9, 532-536.

Kiefersauer, R., Than, M. E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J. M., Soulimane, T. & Huber, R. (2000). J. Appl. Cryst. 33, 1223-1230.

Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 1, 187-198.

Kriminski, S., Caylor, C. L., Nonato, M. C., Finkelstein, K. D. & Thorne, R. E. (2002). Flash-cooling and annealing of protein crystals. Acta Cryst. D58, 459-471.

Lamzin, V. S. & Wilson, K. S. (1993). Automated refinement of protein models. Acta Cryst. D49, 129-147.

Landgrebe, J., Dierks, T., Schmidt, B., and von Figura, K. (2003). The human *SUMF1* gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. Gene 316, 47-56.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. und Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Crystallogr. 26, 283-291.

Lawrence, M. C. & Colman, P. M. (1993). Shape complementarity at protein/protein interfaces. J. Mol. Biol. 234, 946-950.

Leslie, A. G. W. (1992) Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26.

Lo Conte, L., Chothia, C., and Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* 285, 2177-2198.

Lohi, O. & Lehto, V. P. (1998). VHS domain marks a group of proteins involved in endocytosis and vesicular trafficking. *FEBS Lett.* 440, 255-257.

Luckow, V. A., Lee, C. S., Barry, G. F., and Olins, P. O. (1993). Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67, 4566-4579.

Lui, W. W., B. M. Collins, et al. (2003). Binding partners for the COOH-terminal appendage domains of the GGAs and gamma-adaptin. *Mol. Biol. Cell* 14, 2385-98.

Lukatela, G., Krauss, N., Theis, K., Selmer, T., Gieselmann, V., von Figura, K., and Saenger, W. (1998). Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* 37, 3654-3664.

Mao, Y., Nickitenko, A., Duan, X., Lloyd, T. E., Wu, M. N., Bellen, H. & Quioco, F. A. (2000). Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell* 100, 447-456.

Mariappan, M., Preusser-Kunze, A., Balleininger, M., Eiselt, N., Schmidt, B., Gande, S. L., Wenzel, D., Dierks, T., and von Figura, K. (2005). Expression, Localization, Structural, and Functional Characterization of pFGE, the Paralog of the C α -Formylglycine-generating Enzyme. *J. Biol. Chem.* 280, 15173-15179.

- Mattera, R., Arighi, C. N., Lodge, R., Zerial, M., and Bonifacino, J. S. (2003).** Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex. *EMBO J.* 22, 78-88.
- Matthews, B. W. (1968).** Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- McDonald, I. K. & Thornton, J. M. (1994).** Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J. Mol. Biol.* 238, 777-793.
- Miech, C., Dierks, T., Selmer, T., von Figura, K., and Schmidt, B. (1998).** Arylsulfatase from *Klebsiella pneumoniae* carries a formylglycine generated from a serine. *J. Biol. Chem.* 273, 4835-4837.
- Miller, G. J., Mattera, R., Bonifacino, J. S., and Hurley, J. H. (2003).** Recognition of accessory protein motifs by the gamma-adaptin ear domain of GGA3. *Nat. Struct. Biol.* 10, 599-606.
- Mills, I. G., G. J. Praefcke, et al. (2003).** EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J. Cell Biol.* 160, 213-22.
- Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino, J. S., and Hurley, J. H. (2002).** Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature* 415, 933-937.
- Mullins, C. & Bonifacino, J. S. (2001).** Structural requirements for function of yeast GGAs in vacuolar protein sorting, α -factor maturation, and interactions with clathrin. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7981-7994.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997).** Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst.* D53, 240-255.
- Nakayama, K. & Wakatsuki, S. (2003).** The structure and function of GGAs, the traffic controllers at the TGN sorting crossroads. *Cell Struct. Funct.* 28, 431-442.

Nielsen, M. S., Madsen, P., Christensen, E. I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R., and Petersen, C. M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20, 2180-2190.

Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, *Methods in Enzymology*, Volume 276: Macromolecular Crystallography, part A, p. 307-326, 1997, Carter, C. W., Sweet, Jr. and R. M. Eds., Academic Press (New York).

Pape, T. & Schneider, T. R. (2004). HKL2MAP: a graphical user interface for phasing with SHELX programs *J. Appl. Cryst.* 37:843-844.

Poussu, A., Lohi, O., and Lehto, V. P. (2000). Vear, a novel Golgi-associated protein with VHS and gamma-adaptin "ear" domains. *J. Biol. Chem.* 275, 7176-7183.

Preusser-Kunze, A., Mariappan, M., Schmidt, B., Gande, S. L., Mutenda, K., Wenzel, D., von Figura, K., and Dierks, T. (2005). Molecular Characterization of the Human C α -formylglycine-generating Enzyme. *J. Biol. Chem.* 280, 14900-14910.

Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J., and Bonifacino, J. S. (2001a). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* 292, 1712-1716.

Puertollano, R., Randazzo, P. A., Presley, J. F., Hartnell, L. M., and Bonifacino, J. S. (2001b). The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* 105, 93-102.

Recksiek, M., Selmer, T., Dierks, T., Schmidt, B., and von Figura, K. (1998). Sulfatases, trapping of the sulfated enzyme intermediate by substituting the active site formylglycine. *J. Biol. Chem.* 273, 6096-6103.

Robinson, M. S. & Bonifacio, J. S. (2001). Adaptor-related proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 444-453.

Roeser, D., Dickmanns, A., Gasow, K., and Rudolph, M. G. (2005). *De novo* calcium/sulfur SAD phasing of the human formylglycine-generating enzyme using in-house data. *Acta Cryst. D61*, 1057-1066.

Roeser, D., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Gasow, K., Wittmann, J. G., Dierks, T., von Figura, K., and Rudolph, M. G. (2006). A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 81-86.

Rommerskirch, W. & von Figura, K. (1992). Multiple sulfatase deficiency: catalytically inactive sulfatases are expressed from retrovirally introduced sulfatase cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 2561-2565.

Rotgers, D. W. (1994). Cryocrystallography. *Structure*, 2, 1135-1140.

Rotgers, D. W. (1997). *Methods Enzymol.* 276, 183-203.

Rudolph, M. G., Stevens, J., Speir, J. A., Trowsdale, J., Butcher, G. W., Joly, E., and Wilson, I. A. (2002). Crystal structures of two rat MHC class Ia (RT1-A) molecules that are associated differentially with peptide transporter alleles TAP-A and TAP-B. *J. Mol. Biol.* 324, 975-990.

Salunke, D. M., Veerapandian, B., Kondandapani, R., and Vijayan, M. (1985). Water-mediated transformations in protein crystals. *Acta Cryst. B41*, 431-436.

Schmidt, B., Selmer, T., Ingendoh, A., and von Figura, K. (1995). A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82, 271-278.

Sheldrick, G., and Schneider, T. (1997). *Methods Enzymol.* 277, 319-343.

Sheriff, S., Hendrickson, W. A., and Smith, J. L. (1987). Structure of myohemerythrin in the azidomet state at 1.7/1.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 197, 273-296.

Shiba, T., Takatsu, H., Nogi, T., Matsugaki, N., Kawasaki, M., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Earnest, T., Nakayama, K., and Wakatsuki, S. (2002). Structural basis for recognition of acidic-cluster dileucine sequence by GGA1. *Nature* 415, 937-941.

Shiba, T., Kawasaki, M., Takatsu, H., Nogi, T., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Nakayama, K., and Wakatsuki, S. (2003). Molecular mechanism of membrane recruitment of GGA by ARF in lysosomal protein transport. *Nat. Struct. Biol.* 10, 386-393.

Shiba, Y., Kato, Y., Shiba, T., Yoshino, K., Takatsu, H., Kobayashi, H., Shin, H. W., Wakatsuki, S., and Nakayama, K. (2004). GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 279, 7105-7111.

Suer, S., Misra, S., Saidi, L. F., and Hurley, J. H. (2003). Structure of the GAT domain of human GGA1: a syntaxin amino-terminal domain fold in an endosomal trafficking adaptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4451-4456.

Takatsu, H., Kato, Y., Shiba, Y., and Nakayama, K. (2001). Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains. *J. Biol. Chem.* 276, 28541-28545.

Timasheff, S. N. (1995). Solvent stabilization of protein structure. *Methods Mol. Biol.* 40, 253-269.

von Bulow, R., Schmidt, B., Dierks, T., von Figura, K., and Uson, I. (2001). Crystal structure of an enzyme-substrate complex provides insight into the interaction between human arylsulfatase A and its substrates during catalysis. *J. Mol. Biol.* 305, 269-277.

Wachsmuth, E.E., Fritze, I., and Pleiderer, G. (1966). An aminopeptidase occurring in pig kidney. An improved method of preparation. Physical and enzymic properties. *Biochemistry* 5, 169-174.

Waldow, A., Schmidt, B., Dierks, T., von Bulow, R., and von Figura, K. (1999). Amino acid residues forming the active site of arylsulfatase A. Role in catalytic activity and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 274, 12284-12288.

Yeh, J. I. & Hol, W. G. (1998). A flash-annealing technique to improve diffraction limits and lower mosaicity in crystals of glycerol kinase. *Acta Cryst. D*54, 479-480.

Zhdankina, O., Strand, N. L., Redmond, J. M., and Boman, A. L. (2001). Yeast GGA proteins interact with GTP-bound Arf and facilitate transport through the Golgi. *Yeast* 18, 1-18.

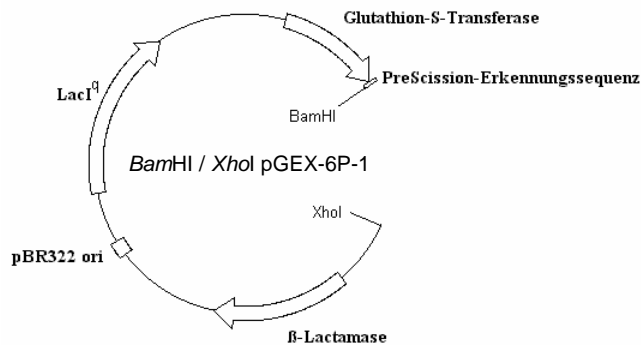
Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V. P., and Kornfeld, S. (2001). Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science* 292, 1716-1718.

Zhu, G., He, X., Zhai, P., Terzyan, S., Tang, J., and Zhang, X. C. (2003a). Crystal structure of GGA2 VHS domain and its implication in plasticity in the ligand binding pocket. *FEBS Lett.* 537, 171-176.

Zhu, G., Zhai, P., He, X., Terzyan, S., Zhang, R., Joachimiak, A., Tang, J., and Zhang, X. C. (2003b). Crystal structure of the human GGA1 GAT domain. *Biochemistry* 42, 6392-6399.

Zito, E., Fraldi, A., Pepe, S., Annunziata, I., Kobinger, G., Di Natale, P., Ballabio, A., and Cosma, M. P. (2005). Sulphatase activities are regulated by the interaction of sulphatase-modifying factor 1 with SUMF2. *EMBO Rep.* 6, 655-660.

Anhang



Tab. 13 Kenndaten der erzeugten pGEX-6P-1 Expressionsvektoren zur Produktion der GGA1/3 Fragmente in *E. coli*.

klonierte DNS-Sequenz kodiert für:	GGA1	GGA1	GGA1	GGA1	GGA3	GGA3
		2-361^a	2-326	2-301		2-391^b
• Grösse	1911 bp	1089 bp	984 bp	909 bp	2160 bp	1179 bp
• Start	946	946	946	946	946	946
	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI
• Ende	2857	2035	1930	1855	3106	2125
	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I
Plasmid						
• Gesamtgrösse	6871 bp	6049 bp	5944 bp	5869 bp	7120 bp	6139 bp
• Glutathione S-Transferase Region						
• tac Promotor						
• -10	205-211	205-211	205-211	205-211	205-211	205-211
• -35	183-188	183-188	183-188	183-188	183-188	183-188
• lac Operator	217-237	217-237	217-237	217-237	217-237	217-237
• GST Ribosomenbindestelle	244	244	244	244	244	244
• GST Startkodon (ATG)	258	258	258	258	258	258
• PreScission Erkennungsequenz	918-938	918-938	918-938	918-938	918-938	918-938
• β -lactamase (Amp^r) Genregion						
• Promotor						
• -10	3232-3237	2410-2415	2305-2310	2230-2235	3481-3486	2500-2505
• -35	3209-3214	2387-2392	2282-2287	2207-2212	3458-3463	2477-2482
• Startkodon (ATG)	3279	2457	2352	2277	3528	2547
• Stopkodon (TAA)	4137	3315	3210	3135	4386	3405
• LacI ^q Genregion						
• Startkodon (GTG)	5220	4398	4293	4218	5469	4488
• Stopkodon (TGA)	6300	5478	5373	5298	6549	5568
• Plasmidreplikationsregion						
• Initiationsstelle	4897	4075	3970	3895	5146	4165
• Notwendige Region	4204-4900	3382-4078	3277-3973	3202-3898	4453-5149	3472-4168

^a Es wurden zwei Varianten von GGA1_2-361 kloniert, wt bzw Ser354Asp.

^b Es wurden zwei Varianten von GGA3_2-391 kloniert, wt bzw Ser384Asp.

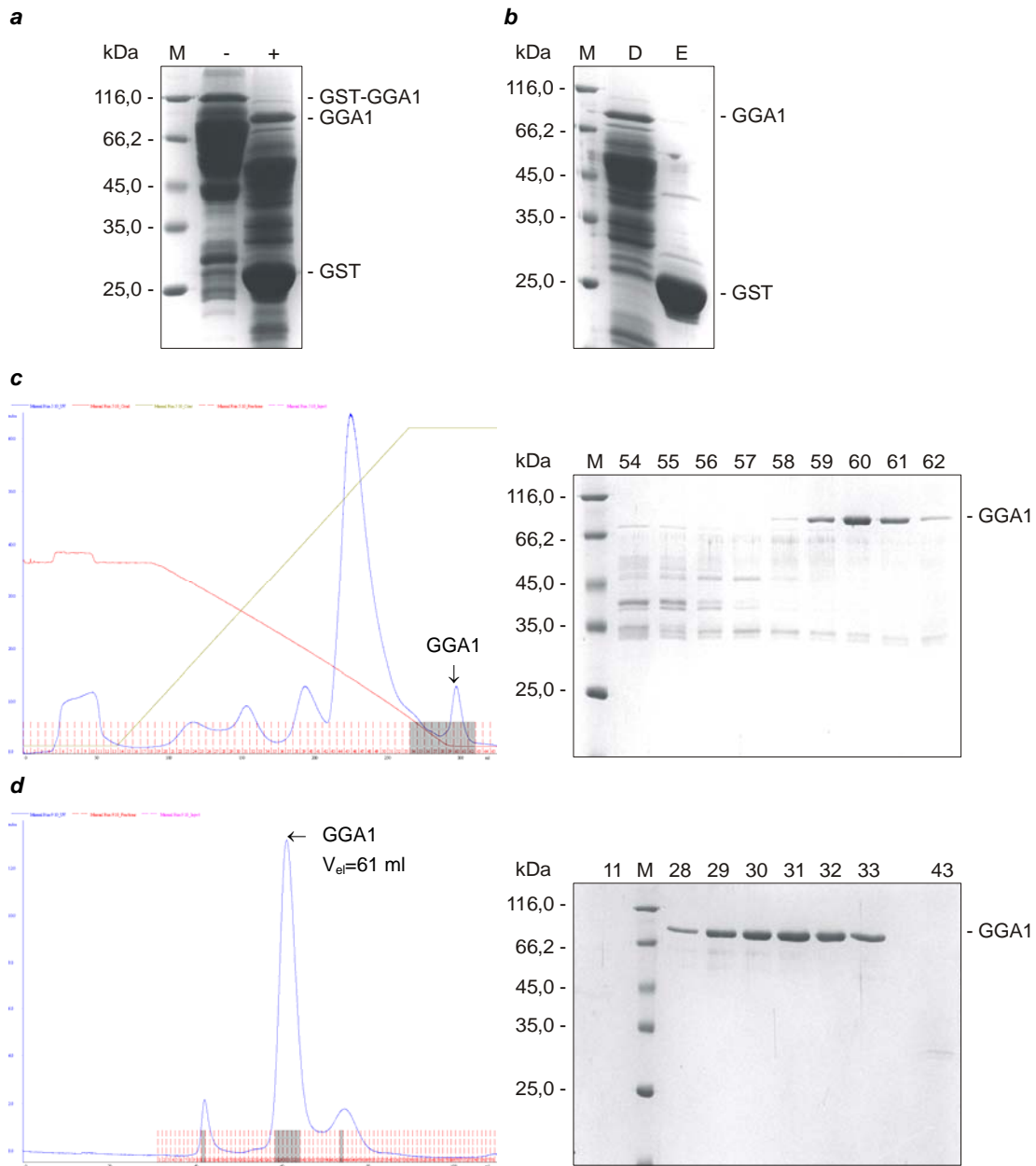


Abb. 31 SDS-PAGE-Analysen und Chromatogramme der Reinigung von GGA1. **(a)** Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. [M] Molekulargewichtstandard, [-] Eluat, [+] Eluat nach Proteolyse mit PreScission-Protease. **(b)** Erneute Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. [D] Durchfluss, [E] Eluat. **(c)** Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie an Phenyl-Sepharose. [54-62] Nummer der analysierten Fraktionen. **(d)** Grössenausschlusschromatographie. Es wurde eine Superdex200 16/60 Chromatographiesäule verwendet. [11-43] Nummer der analysierten Fraktionen. In den Chromatogrammen ist die Absorption der Probe bei 280 nm (blau), in **(c)** ausserdem der prozentuale Anteil von Puffer B (grün) sowie die Leitfähigkeit der Probe (rot) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (ml) dargestellt. Durch SDS-PAGE analysierte Fraktionen sind grau markiert.

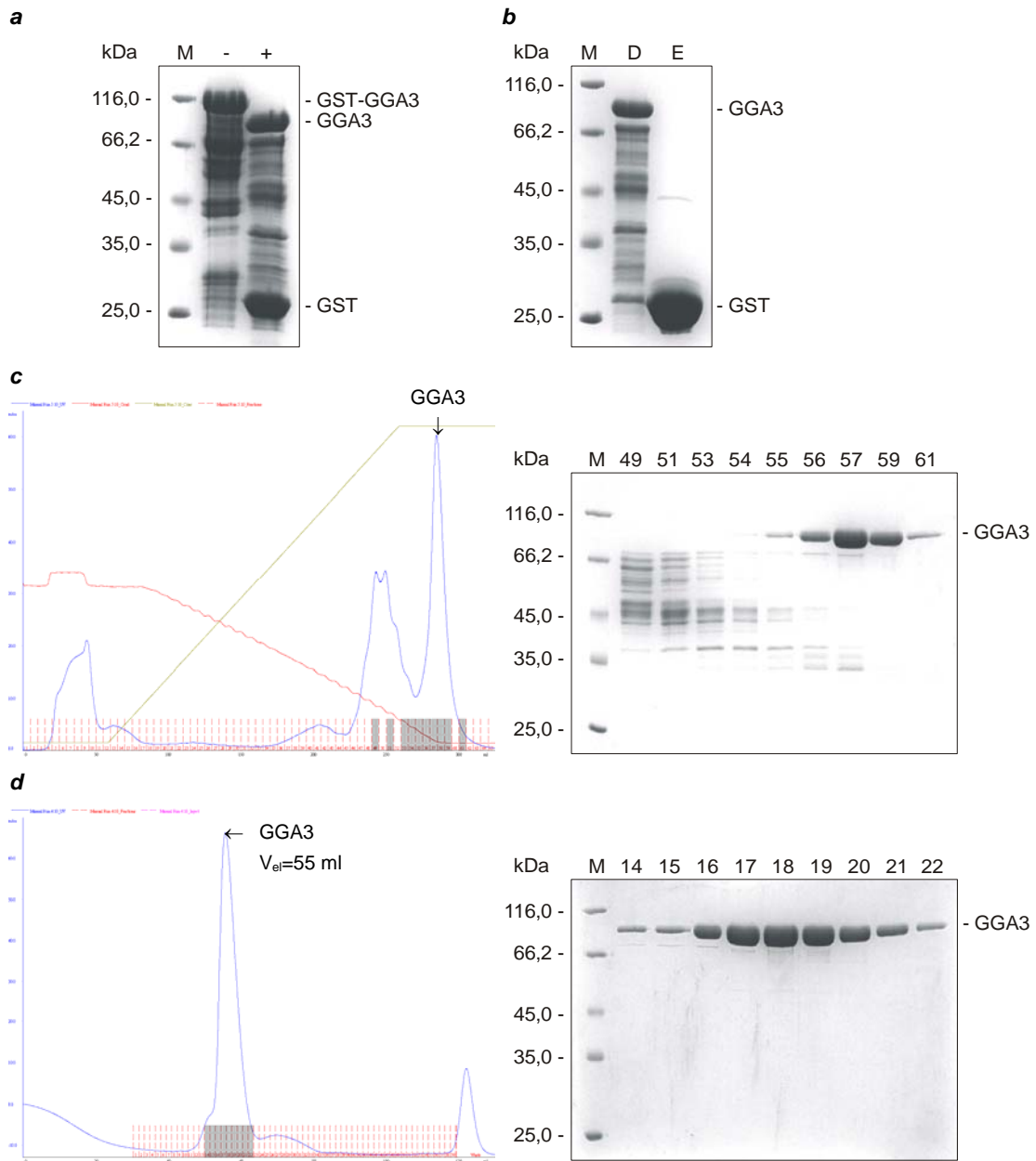


Abb. 32 SDS-PAGE-Analysen und Chromatogramme der Reinigung von GGA3. **(a)** Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. [M] Molekulargewichtstandard, [-] Eluat, [+] Eluat nach Proteolyse mit PreScission-Protease. **(b)** Erneute Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. [D] Durchfluss, [E] Eluat. **(c)** Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie an Phenyl-Sepharose. [49-61] Nummer der analysierten Fraktionen. **(d)** Grössenausschlusschromatographie. Es wurde eine Superdex200 16/60 Chromatographiesäule verwendet. [14-22] Nummer der analysierten Fraktionen. In den Chromatogrammen ist die Absorption der Probe bei 280 nm (blau), in **(c)** ausserdem der prozentuale Anteil von Puffer B (grün) sowie die Leitfähigkeit der Probe (rot) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (ml) dargestellt. Durch SDS-PAGE analysierte Fraktionen sind grau markiert.

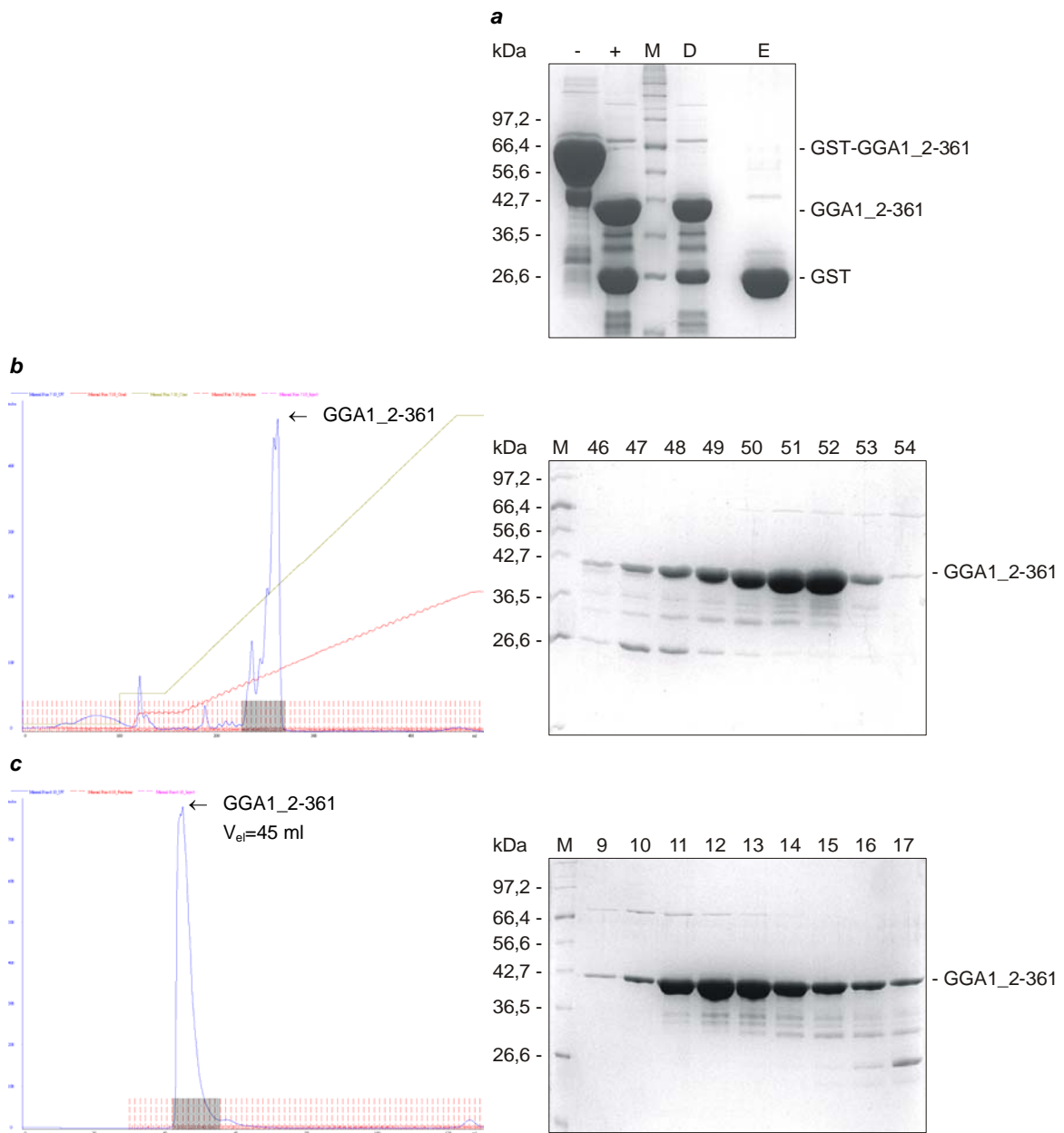


Abb. 33 SDS-PAGE-Analysen und Chromatogramme der Reinigung von GGA1_2-361. **(a)** SDS-PAGE nach Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. [M] Molekulargewichtstandard, [-] Eluat, [+] Eluat nach Proteolyse mit PreScission-Protease. [D] Durchfluss, [E] Eluat nach erneuter Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. **(b)** Ionenaustauschchromatographie an Source30Q. [46-54] Nummer der analysierten Fraktionen. **(c)** Grössenausschlusschromatographie. Es wurde eine Superdex75 16/60 Chromatographiesäule verwendet. [9-17] Nummer der analysierten Fraktionen. In den Chromatogrammen ist die Absorption der Probe bei 280 nm (blau), in **(b)** ausserdem der prozentuale Anteil von Puffer B (grün) sowie die Leitfähigkeit der Probe (rot) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (ml) dargestellt. Durch SDS-PAGE analysierte Fraktionen sind grau markiert.

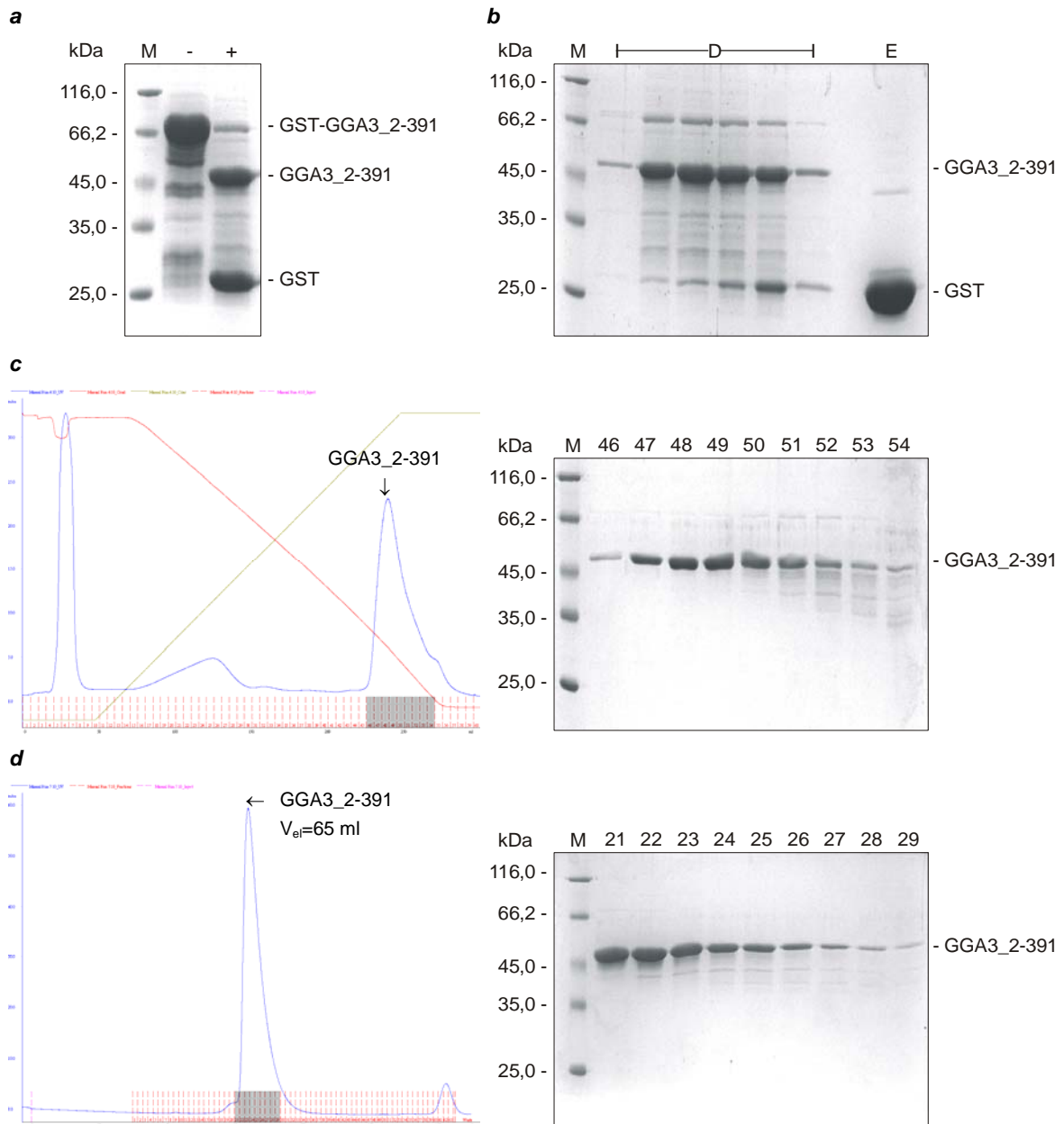


Abb. 34 SDS-PAGE-Analyse und Chromatogramme der Reinigung von GGA3_2-391. **(a)** Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. [M] Molekulargewichtstandard, [-] Eluat, [+] Eluat nach Proteolyse mit PreScission-Protease. **(b)** Erneute Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. [D] Durchfluss, [E] Eluat. **(c)** Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie an Phenyl-Sepharose. [46-54] Nummer der analysierten Fraktionen. **(d)** Grössenausschlusschromatographie. Es wurde eine Superdex200 16/60 Chromatographiesäule verwendet. [21-29] Nummer der analysierten Fraktionen. In den Chromatogrammen ist die Absorption der Probe bei 280 nm (blau), in **(c)** ausserdem der prozentuale Anteil von Puffer B (grün) sowie die Leitfähigkeit der Probe (rot) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (ml) dargestellt. Durch SDS-PAGE analysierte Fraktionen sind grau markiert.

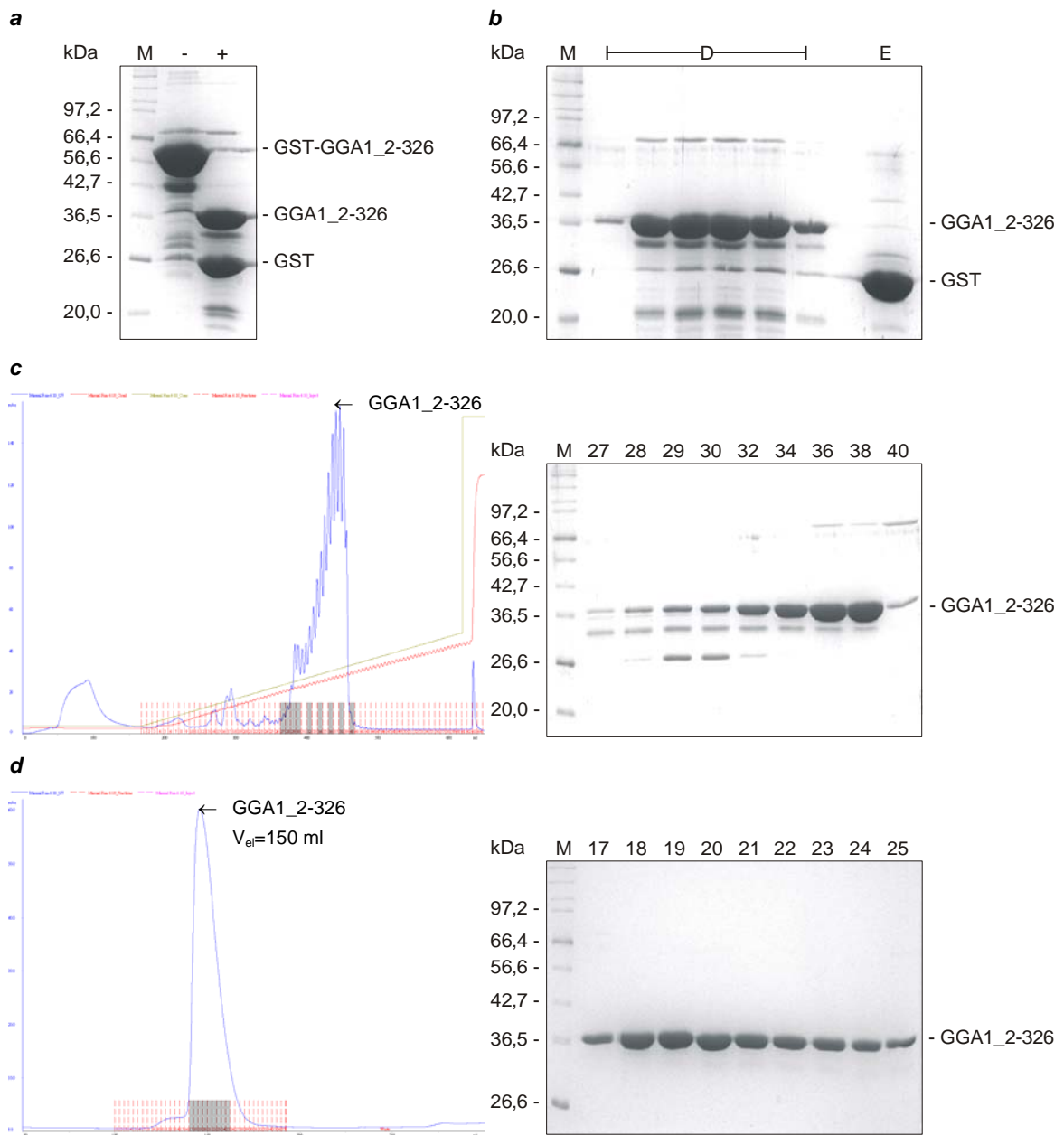


Abb. 35 SDS-PAGE-Analysen und Chromatogramme der Reinigung von GGA1_2-326 (**a**) Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. [M] Molekulargewichtstandard, [-] Eluat, [+] Eluat nach Proteolyse mit PreScission-Protease. (**b**) [D] Durchfluss, [E] Eluat bei erneuter Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. (**c**) Ionenaustauschchromatographie an Source30Q. [27-40] Nummer der analysierten Fraktionen. (**d**) Grössenausschlusschromatographie. Es wurde eine Superdex75 26/60 Chromatographiesäule verwendet. [17-25] Nummer der analysierten Fraktionen. In den Chromatogrammen ist die Absorption der Probe bei 280 nm (blau), in (**c**) ausserdem der prozentuale Anteil von Puffer B (grün) sowie die Leitfähigkeit der Probe (rot) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (ml) dargestellt. Durch SDS-PAGE analysierte Fraktionen sind grau markiert.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus Rudolph für die interessante Themenstellung und die engagierte Betreuung dieser Arbeit sowie die Einführung in theoretische und praktische Aspekte der Röntgenkristallographie.

Prof. Dr. Ralf Ficner danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens sowie sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Prof. Dr. Oliver Einsle danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit sowie die vielen kleinen, immer hilfreichen Tipps im Umgang mit verschiedenen Programmen.

Dr. Julia Wittmann und Kathrin Gasow danke ich für die angenehme Zusammenarbeit im Labor.

Daniel Heitmann danke ich für den Erfahrungsaustausch hinsichtlich der Erstellung von Grafiken mit Pymol.

Allen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die freundliche Aufnahme, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums sowie meinem Bruder.

Mein herzlichster Dank gilt Jana.

Lebenslauf

persönliche Daten

Name: Röser
Vorname: Dirk
Geburtsdatum: 12.04.1976
Geburtsort: Hildburghausen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982 – 1990 POS in Heldburg
1990 – 1994 Gymnasium in Hildburghausen
07/1994 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1994 – 01/2002 Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Studiengang Biologie (Diplom)
01/2002 Diplom. Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Struktur des Vanillat-*O*-Demethylase Operons aus *Acetobacterium dehalogenans*“
02/2002 – 09/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie, Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
seit 03/2003 Anfertigung der Dissertation mit dem Thema: “Kristallisation von GGA-Proteinen und röntgenkristallographische Untersuchungen am C_α-Formylglycin Generierenden Enzym” am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Strukturbiologie der Georg-August-Universität Göttingen