

Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilung Strukturforschung

**Röntgenstrukturanalyse von humanen IgG1-Fc-
Glykosylierungsvarianten
und
Röntgenstrukturanalyse des katalytischen Teils der murinen
CMP-5-N-Acetylneuraminsäure-Synthetase**

Stephan Krapp

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber
2. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller

Die Dissertation wurde am 28.05.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 20.06.2003 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1999 bis Mai 2003 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung der reizvollen Themen, die Unterstützung dieser Arbeit und die hervorragende wissenschaftliche und technische Infrastruktur in der Abteilung danken.

Bei P.D. Dr. Uwe Jacob und Dr. Peter Sondermann möchte ich mich für die vielen hilfreichen Diskussionen und praktischen Hinweise bedanken, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei Dr. Anja Münster-Kühnel und Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn von der Medizinischen Hochschule in Hannover möchte ich mich für die Klonierungsarbeiten, die Durchführung verschiedener Aktivitätstests und die guten Diskussionen in Zusammenhang mit dem Mm-CNS-Projekt bedanken.

Herrn Prof. Roy Jefferis und Dr. Yusuke Mimura möchte ich für die Bereitstellung der Fc-Glykosylierungsvarianten und die gute Zusammenarbeit am IgG1-Fc-Projekt danken.

Meinen Kollegen Constanze Breithaupt, Dr. Kerstin Wendt, Dr. Hans Brandstetter, Dr. Stefan Riedl, Dr. Manuel Than, Dr. Jens T. Kaiser, Dr. Tim Clausen, Dr. Markus Wahl, Werner Atzenhofer, Martin Augustin, Katja Wenig, Snezan Marinkovic, Dr. Uta Ohndorf, Daniela Josic, Dr. Oliver Einsle, Dr. Stefan Gerhardt, Dr. Michael Groll und den vielen Anderen, die hier nicht aufgeführt sind, möchte ich für die Hilfe und die gute Zusammenarbeit im Labor und im Rechenzentrum sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Gleb Bourenkov und Dr. Hans Bartunik für die Betreuung während der Messungen an der BW6-Beamline am DESY in Hamburg.

Den Herren Dr. Jens T. Kaiser, Dr. Manuel Than, Dr. Oliver Einsle, Dr. Stefan Steinbacher und Dr. Hans Brandstetter sei gedankt für die Pflege der Programmpakete auf dem ‚X-ray-Account‘. Den Mitarbeitern des Rechenzentrums, insbesondere Herrn Günther Franz, Herrn Herbert Höfner und Herrn Dr. Bernhard Busch gebührt mein Dank für die Betreuung der Rechenzentrumsinstallationen.

Für die Durchführung von massenspektrometrischen Analysen möchte ich Dr. Frank Siedler und Sylvia Koerner und für die DNA- und Proteinsequenzierungen Marius Bociu und Dr. Karl-Heinz Mann danken.

Danken möchte ich auch Renate Rüller, Gina Beckmann und Monika Bumann, den Sekretärinnen der Abteilung, die mich bei vielen bürokratischen Angelegenheiten unterstützt haben, sowie den Technikern Werner Dersch und Ottmar Paul für die tadellose Instandhaltung der technischen Geräte.

Außerdem danke ich herzlich meinen Eltern für ihre stete Unterstützung über all die Jahre hinweg.

Ganz besonders möchte ich meiner zukünftigen Frau Margit Kraft danken, die mich mit großer Geduld während der Promotionszeit unterstützt hat.

1.	Zusammenfassung.....	1
1.1	Röntgenstrukturanalyse von humanen IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten	1
1.2	Röntgenstrukturanalyse des katalytischen Teils der murinen CMP-5-N-Acetylneuraminsäure-Synthetase	2
2.	Einleitung	4
2.1	Antikörper und Immunreaktionen.....	4
2.1.1	Angeborene Immunität.....	4
2.1.2	Erworbene (adaptive) Immunität.....	4
2.1.3	Effektormechanismen von Antikörpern	5
2.1.4	Struktur und Funktion von IgG-Antikörpern	8
2.1.5	Fc-Glykosylierung und Effektorfunktionen von Antikörpern.....	10
2.2	Der Sialinsäurestoffwechsel und die Aktivierung von Sialinsäuren.....	12
2.2.1	Vorkommen und Eigenschaften von Sialinsäuren	12
2.2.2	Biosynthese von Sialinsäuren.....	13
2.2.3	Aktivierung und Übertragung von Sialinsäuren.....	13
2.2.4	Sialinsäurederivate	14
2.2.5	Die murine CMP-Neu5Ac-Synthetase	15
2.2.6	Verwandte Strukturen.....	16
2.3	Zielsetzung der Arbeit.....	16
3.	Materialien & Methoden	17
3.1	Materialien	17
3.1.1	Chemikalien.....	17
3.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
3.1.3	Bakterienstämme, Plasmide, Medien und Antibiotika.....	18
3.1.4	Weitere biologische Materialien.....	19
3.2	Methoden.....	19
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	19

3.2.1.1	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Elektroporation)	19
3.2.1.2	Flüssigkultur von Bakterien	19
3.2.1.3	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	20
3.2.1.4	Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen	20
3.2.1.5	Reinigung von IgG1 und Herstellung von Glykosylierungsvarianten ...	20
3.2.1.6	Proteinreinigung von cMm-CNS	21
3.2.1.7	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	22
3.2.1.8	SDS-PAGE Gelelektrophorese	22
3.2.1.9	Massenspektrometrie	24
3.2.1.10	Proteolytischer Verdau	24
3.2.1.11	Sequenzanalyse und Datenbanksuche	24
3.2.2	Röntgenstrukturanalytische Methoden.....	24
3.2.2.1	Strukturbestimmung von Proteinen	24
3.2.2.2	Theoretischer Hintergrund	25
3.2.3	Einfrieren von Proteinkristallen bei 100 K.....	34
3.2.4	Datensammlung und Datenreduktion	35
3.2.5	Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung.....	35
3.2.6	Analyse von Atommodellen	37
3.2.7	Graphische Darstellungen	37
3.2.8	Eintrag in die Proteindatenbank	38
4.	Ergebnisse	39
4.1	Die Kristallstruktur von IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten.....	39
4.1.1	Nomenklatur der IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten.....	39
4.1.2	Analyse der Reinheit von IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten	40
4.1.3	Kristallisation	41
4.1.4	Bestimmung der Raumgruppe und der Zellkonstanten	43
4.1.5	Strukturlösung	43
4.1.6	Modellbau und Verfeinerung	44
4.1.7	Strukturbeschreibung von IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten	45
4.1.8	Einfluss der Glykosylierung auf den Öffnungszustand des Fc-Fragmentes..	
	47

4.1.9	Strukturelle Veränderungen in den C γ 2-Domänen.....	51
4.1.10	Analyse von Kristallkontakten und B-Faktoren	54
4.2	Die Kristallstruktur von cMm-CNS	56
4.2.1	Expression und Reinigung.....	56
4.2.2	Kristallisation	58
4.2.3	Strukturlösung	59
4.2.4	Modellbau und Verfeinerung	60
4.2.5	Struktur der cMm-CNS	63
4.2.6	Sequenzalignment	67
5.	Diskussion	69
5.1	Diskussion IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten.....	69
5.1.1	Regulation des Öffnungszustandes des Fc-Fragmentes	69
5.1.2	Interne Strukturveränderungen in den C γ 2-Domänen.....	71
5.1.3	Zucker-Protein-Kontakte	73
5.1.4	Zusammenfassung IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten	74
5.2	Diskussion cMm-CNS	76
5.2.1	Strukturvergleich bekannter CNS-Strukturen	76
5.2.2	Katalysemechanismus	80
5.2.3	Spezifität der cMm-CNS für Neu5Ac	83
5.2.4	Kooperativität	84
5.2.5	Regulation und Phosphorylierung	86
5.2.6	Zusammenfassung cMm-CNS	88
6.	Literaturverzeichnis.....	89

AU	asymmetrische Einheit (asymmetric unit)
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CMP-Neu5Ac	Cytidinmonophosphat-5- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
CDS	CMP-2-Keto-3-Deoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -nonulosonsäure-Synthetase
CDR	komplementaritätsbestimmende Region (<i>complementary determining region</i>)
CKS	CMP-2-Keto-3-Deoxy- <i>manno</i> -octulosonsäure-Synthetase
cMm-CNS	katalytischer Teil der <i>Mus musculus</i> CMP-5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Synthetase
CNS	CMP-5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Synthetase
CTP, CDP, CMP	Cytidintri-, Cytidindi- und Cytidinmonophosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron (Hamburg)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektrospray-Massenspektrometrie
Fab	Antikörperfragment (Antigenbindung)
Fab ₂	Fab-Dimer (disulfidverbrückt)
Fc	Antikörperfragment mit Effektorfunktion (<i>Fragment crystallisable</i>)
FcγR	IgG-Fc-Rezeptor
FcR	Fc-Rezeptor
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GST	Glutathion-S-Transferase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (<i>isothermal titration calorimetry</i>)
K	Kelvin
K _A	Assoziationskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	molar
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MAD	multiple anomale Dispersion
Man	Mannose
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MR	molekularer Ersatz (<i>molecular replacement</i>)
n.b.	nicht bestimmt
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül (<i>neural cell adhesion molecule</i>)
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie (<i>noncrystallographic symmetry</i>)
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NLS	Kernlokalisationssequenz (<i>nuclear localisation sequence</i>)
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein Database</i>
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Pyrophosphat
r.m.s.d.	<i>root mean square deviation</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>units</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Röntgenstrukturanalyse von humanen IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten

Antikörper sind Adaptor-Moleküle, die humorale und zelluläre Abwehrmechanismen des Immunsystems miteinander koppeln. Antigenspezifische IgG-Antikörper bilden Antigen-Antikörper-Immunkomplexe, die eine Vielzahl von Effektorsystemen aktivieren können. Ein großer Teil der zellulären Effektormechanismen wird durch eine Familie von IgG-Fc-Rezeptoren (Fc γ Rs) vermittelt, die auf der Oberfläche von allen immunologischen Zellen vorkommen. Es ist gezeigt worden, dass die IgG-Glykosylierung essentiell für die Erkennung durch Fc γ Rs und damit für die Auslösung von intrazellulären Effektormechanismen ist.

Das IgG-Fc-Fragment (IgG-Fc), das durch proteolytischen Verdau von IgG erzeugt werden kann, ist ein symmetrisches Homodimer aus Glykopeptidketten, die sich jeweils in zwei Immunglobulin-Domänen (C γ 2 und C γ 3) gliedern. Beide Glykopeptidketten des IgG-Fc-Fragmentes stehen über Disulfidbrücken an den N-Termini und über nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen den C-terminalen C γ 3-Domänen miteinander in Kontakt. Das IgG-Fc hat die Form eines Hufeisens, das die Oligosaccharidstrukturen umschließt, die N-glykosidisch an die Reste Asp297 in den C γ 2-Domänen geknüpft sind.

Um den Einfluss von einzelnen Zuckerresten (Monosacchariden) der Kohlenhydratkette auf die Struktur und Funktion des IgG-Fc zu untersuchen, wurde die Kristallstruktur des „wild-Typ“-IgG-Fc mit den Kristallstrukturen von vier IgG-Fc-Glykosylierungsvarianten verglichen, die schrittweise verkürzte Kohlenhydratketten enthielten. Die größten strukturellen Abweichungen im Vergleich zum „wild-Typ“-IgG-Fc kommen in Fc-Glykosylierungsvarianten vor, in denen die terminalen *N*-Acetylglucosamin- und Mannosereste nicht vorhanden sind. Strukturelle Unterschiede sind vor allem in den Kohlenhydratketten und in dem *loop*, an dem sie verankert sind, zu finden. Die beobachteten Strukturveränderungen in den C γ 2-Domänen beeinflussen die

Kontaktregion zwischen IgG-Fc und den Fc γ Rs. Außerdem führt die schrittweise Verkürzung der Kohlenhydratketten zu einer gegenseitigen Annäherung der C γ 2-Domänen und folglich zu einer geschlossenen Konformation des IgG-Fc. Im Gegensatz dazu wurde für das „wild-Typ“-IgG-Fc eine offene Konformation beobachtet, die optimal für eine Fc γ R-Bindung ist.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse beleuchten die strukturellen Grundlagen der Modulation von IgG-Fc-Effektoreigenschaften, die bereits biochemisch untersucht wurden.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber R. and Sondermann, P. (2003) Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J. Mol. Biol.*, **325**, 979-89.

1.2 Röntgenstrukturanalyse des katalytischen Teils der murinen CMP-5-*N*-Acetylneuraminsäure-Synthetase

Sialinsäuren stellen einen integralen Bestandteil der Kohlenhydrate von Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Zelloberfläche von Eukaryoten und einigen Bakterien dar. Sie sind für die Struktur und Funktion der genannten Glykokonjugate unerlässlich und müssen vor ihrer Übertragung auf diese Kohlenhydratketten aktiviert werden. Die CMP-5-*N*-Acetylneuraminsäure-Synthetase (CNS) katalysiert die Reaktion von 5-*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) mit Cytidintriphosphat (CTP) zu CMP-5-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) und Pyrophosphat. Neben der katalytisch aktiven CNS-Domäne trägt das eukaryotische Enzym zusätzlich eine konservierte C-terminale Domäne, deren Funktion noch nicht näher charakterisiert wurde.

Die Kristallstruktur des N-terminalen, katalytisch aktiven Teils der CNS aus Maus [*Mus musculus*] (cMm-CNS) wurde im Komplex mit dem Produkt der katalysierten Reaktion, CMP-Neu5Ac, bei einer Auflösung von 2.7 Å aufgeklärt. Die cMm-CNS setzt sich aus einer globulären zentralen Domäne mit $\alpha\beta$ -Faltungsmotiv und einer gewinkelten Dimerisierungsdomäne zusammen. Die Dimerisierungsdomänen zweier Monomere greifen ineinander und führen zur Dimerisierung des Enzyms. Zwei dieser cMm-CNS-

Dimere sind zu einem stabilen Tetramer assoziiert. Die sequenziell und strukturell verwandte *Neisseria meningitidis*-CNS (Nm-CNS) wurde dagegen nur in dimerer Form gefunden.

Die vier aktiven Zentren des kristallisierten cMm-CNS-Tetramers liegen im geschlossenen Zustand vor und sind teilweise mit dem co-kristallisierten Produkt CMP-Neu5Ac besetzt. Diese geschlossene Konformation erlaubt die Identifizierung von katalytisch wichtigen Resten, die interessanterweise zu unterschiedlichen Monomeren gehören.

Im cMm-CNS-Dimer wird ein System aus Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den C-terminalen Helices aufgebaut, an dem auch Aminosäuren beteiligt sind, die sich in direkter Nachbarschaft zu katalytisch wichtigen Resten im aktiven Zentrum befinden. Zusätzlich sind die vier C-terminalen Helices im Zentrum des Tetramers zu einem vier-Helix-Bündel vereint, so dass anzunehmen ist, dass strukturelle Veränderungen in einem aktiven Zentrum auf die drei anderen übertragen werden können, dass die cMm-CNS also kooperativ arbeitet. Die strukturelle Charakterisierung der cMm-CNS liefert neue Informationen zum Katalysemechanismus und zur Regulation von CNS-Enzymen höherer Eukaryoten.

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht in:

Krapp, S., Münster-Kühnel, A. K., Gerardy-Schahn, R., Tiralongo, J., Huber, R., Kaiser, J. T. and Jacob, U. The catalytic mechanism and regulation of murine CMP-5-*N*-acetylneuraminic acid synthetase.

(Manuskript in Vorbereitung)

2. EINLEITUNG

2.1 Antikörper und Immunreaktionen

2.1.1 Angeborene Immunität

Als angeborene Immunität bezeichnet man die schnelle Reaktion des Immunsystems auf Infektionen mit Hilfe von Mechanismen, die bereits vor der Infektion vorhanden waren. Verschiedene Zelltypen, z. B. Makrophagen, neutrophile Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), aber auch das Komplementsystem vermitteln die angeborene Immunität. Die phagozytierenden Zellen (Neutrophile und Makrophagen) leisten einen sehr wichtigen Beitrag zur angeborenen Immunität, indem sie mit ihren Rezeptoren häufig auftretende Oberflächenantigene von Pathogenen erkennen und verschiedene Cytokine freisetzen, welche sowohl die Aktivität von Zellen der angeborenen als auch der erworbenen Immunität koordinieren. Aber auch die Wirkung von NK-Zellen und des Komplementsystems wird zur angeborenen Immunität gezählt. Erst wenn es dem Pathogen gelingt, die Mechanismen der angeborenen Immunität zu überwinden, kommt es zur breiten Aktivierung der erworbenen Immunität.

2.1.2 Erworbene (adaptive) Immunität

Unter erworbener Immunität versteht man die Reaktion antigenspezifischer Lymphozyten auf ein Antigen. Die Fähigkeit der ungeprägten Lymphozyten, praktisch jedes Antigen zu erkennen, beruht auf der genetischen Rekombination von V-, D- und J-Gensegmenten, die in zusammengesetzter Form für antigenspezifische Oberflächenrezeptoren und komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs) von Antikörpern kodieren. Man unterscheidet B- und T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten produzieren Antikörper und tragen so zur humoralen Immunantwort bei, die auf der immunologischen Wirkung von löslichen Proteinbestandteilen des Blutplasmas basiert. Die T-Lymphozyten werden in zwei Hauptklassen eingeteilt, die CD8⁺-T-Zellen und die CD4⁺-T-Zellen. CD8⁺-T-Zellen erkennen Peptidfragmente intrazellulären Ursprungs, wie sie z.

B. in virusbefallenen oder entarteten Zellen vorkommen, die von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche dieser Zellen präsentiert werden. CD8⁺-T-Zellen wirken cytotoxisch auf diese Zellen (zelluläre Immunantwort). Die CD4⁺-T-Zellen erkennen mit ihren T-Zellrezeptoren prozessierte extrazelluläre Antigene im Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen und sezernieren daraufhin Zytokine, die Immunreaktionen unterhalten. CD4⁺-T-Zellen können entweder eine humorale Immunantwort vermitteln, indem sie B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen (CD4⁺-T-Helferzellen) oder eine zelluläre Immunantwort auslösen, indem sie z. B. Makrophagen aktivieren (Inflammatorische CD4⁺-T-Zellen).

Das wichtigste Prinzip der adaptiven Immunität ist die klonale Selektion von Lymphozyten. Es besagt, dass sich ein Lymphozyt, der mit einem Antigen in Kontakt kommt, zu einem Lymphoblasten entwickelt, welcher sich teilt und eine Vielzahl von antigenspezifischen Effektorzellen bildet. Bei der Aktivierung eines Lymphozyten vergrößert sich das Cytoplasma und die DNA wird dekondensiert. Das Ergebnis der klonalen Selektion ist eine Lymphozytenpopulation, die spezifisch gegen ein Antigen wirkt. Nach dem Abklingen einer Infektion kommt es zum Einnisten von einigen aktivierten B-Lymphozyten im Knochenmark, was eine schnelle Reaktivierung der Antikörperproduktion bei einem nochmaligen Auftreten eines bekannten Antigens erlaubt und daher „Immunologisches Gedächtnis“ genannt wird. Ungereifte Lymphozyten, die körpereigene Antigene erkennen, werden im Thymus (T-Lymphozyten) bzw. im Knochenmark (B-Lymphozyten) eliminiert, was als „Eigentoleranz“ bezeichnet wird.

2.1.3 Effektormechanismen von Antikörpern

Antikörper können Pathogene und Toxine dadurch inaktivieren, dass sie diese binden und davon abhalten, Kontakte zu Oberflächenproteinen, z. B. Rezeptoren, herzustellen (Abbildung 1). Dieser als Opsonisierung bekannte Prozess ist Teil der humoralen Immunantwort.

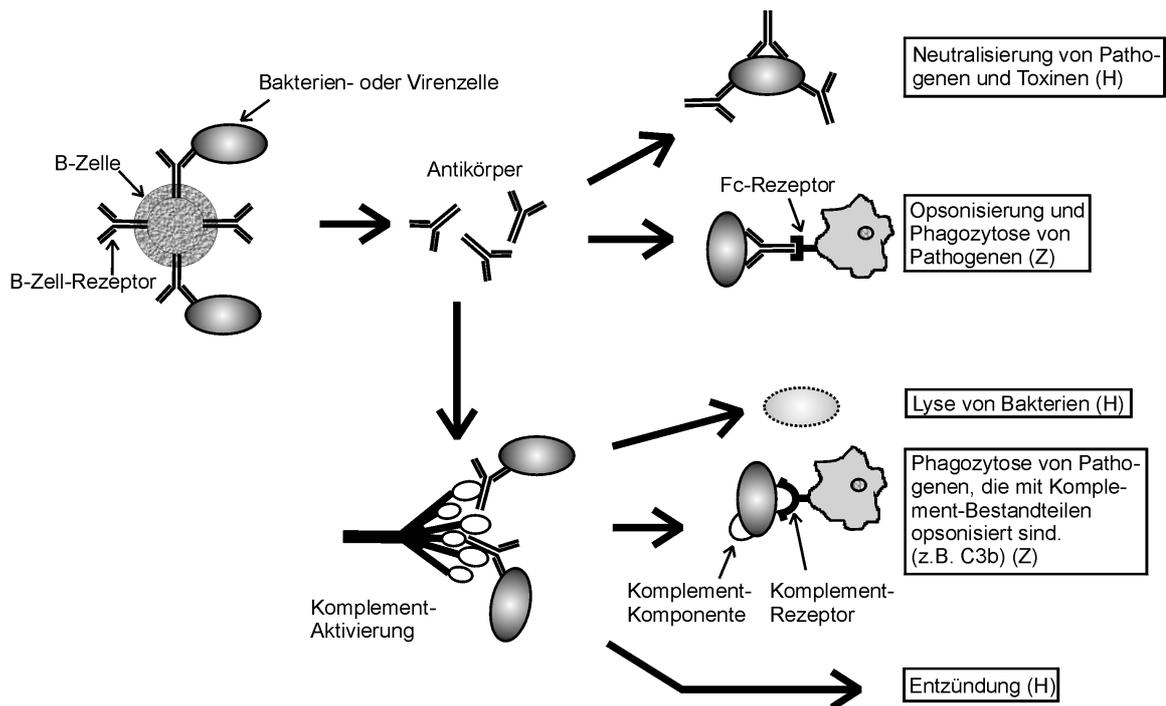


Abbildung 1: Antikörper können humorale (H) und zelluläre (Z) Effektorreaktionen induzieren.

Weiterhin können Antikörper, die ein Antigen erkannt haben, auf zwei Hauptwegen Immunantworten auslösen: erstens über die Aktivierung der proteolytischen Kaskade des Komplementsystems und zweitens über die von Fc γ -Rezeptoren (Fc γ R) vermittelten Signalwege (Abbildung 1).

Das Komplementsystem wurde erstmalig als hitzeempfindlicher Bestandteil des Blutplasmas beschrieben und umfasst elf Proteine. Der Name „Komplement“ weist darauf hin, dass Proteine des Komplementsystems die antibakterielle Wirkung der Antikörper unterstützen (komplementieren). Der klassische Weg der Komplementaktivierung wird durch den C1-Komplex initiiert. Er beinhaltet die beiden Proteasen C1r und C1s, sowie sechs Kopien des C1q-Proteins, das aus einer globulären und einer langgestreckten Domäne besteht. Die Bindung mehrerer globulärer Domänen von C1q an das Fc-Fragment von Antikörpern in einem Immunkomplex ist mit einer Konformationsänderung des C1r und dessen autokatalytischer Aktivierung verbunden. C1r aktiviert die zweite Protease im Komplex, C1s, die dann eine proteolytische Kaskade in Gang setzt. Am Ende dieser Kaskade steht der *membrane attack complex* (MAC), der sich in die Cytoplasmamembran von Bakterien integriert, Poren formt und so die osmotische Aufnahme von Wasser erlaubt, die letztendlich zur Lyse der Zielzelle führt.

Außerdem kommt es zur Freisetzung peptidischer Botenstoffe (Cytokine), die zur Infiltration weiterer Immunzellen führen. Auf den alternativen Weg der Komplementaktivierung soll hier nicht näher eingegangen werden.

Der zweite wichtige Fc-vermittelte Signalweg wird durch Fc-Rezeptoren (FcRs) vermittelt (Abbildung 1). Die IgG-Fc-Rezeptoren (Fc γ Rs) sind am besten untersucht und werden deshalb hier als Beispiel betrachtet. Fc γ -Rezeptoren werden auf allen immunologisch aktiven Zellen gefunden, zum Beispiel auf B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, Eosinophilen-, Neutrophilen- und Mastzellen. Durch das universelle Prinzip der Fc-Fc γ R-Bindung können, abhängig von der Art der aktivierten Zellen, verschiedene Immunantworten resultieren. Beispiele sind die antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC) (Fanger et al., 1989), die Auslösung von Entzündungen (Anegon et al., 1988), verstärkte Antigenpräsentation, Regulation der Antikörperproduktion (Fridman, 1993; Guyre et al., 2001) oder Phagozytose (Anderson et al., 1990). Man unterscheidet im Menschen drei Klassen von Fc γ Rs, den hochaffinen IgG-Rezeptor Fc γ RI ($K_D \approx 10^8 \text{ M}^{-1}$) und die zwei niedrig affinen Rezeptoren Fc γ RII und Fc γ RIII ($K_D \approx 10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}$). Fc γ Rs kommen in verschiedenen Isoformen (Fc γ RIa, -b1, -b2, -c; Fc γ RIIa1, -a2, b1-3, -c) und Allelen (Fc γ RIIa1-HR, -LR; Fc γ RIIIb-NA1, -NA2) vor (van de Winkel and Capel, 1993).

Fc γ Rs gehören zu den Typ-I-Transmembranproteinen. Ihre extrazelluläre Domäne weist eine Immunoglobulin-Faltung auf und ist über eine wahrscheinlich α -helikale Transmembrandomäne mit einer cytoplasmatischen Domäne verbunden, die entweder ein Immunorezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivator-Motiv (ITAM) wie Fc γ RIIa oder ein entsprechendes Inhibitor-Motiv (ITIM) wie Fc γ RIIb trägt (Ravetch and Kinet, 1991). Die Fc γ -Rezeptoren Fc γ RIIIa, Fc γ RI und Fc ϵ RI α sind mit weiteren Transmembranproteinen, den γ -Ketten, assoziiert, die die Signaltransduktion für diese Rezeptortypen übernehmen und ebenfalls ITAMs tragen. Durch die Kreuzvernetzung von extrazellulären Fc γ R-Domänen bei der Bindung von Immunkomplexen an der Zelloberfläche kommen die intrazellulären Domänen der Rezeptoren bzw. γ -Ketten in Kontakt. Die resultierende Wechselwirkung von ITAM- oder ITIM-Motiven mit SH2-Domänen von Tyrosinkinase führt dann zu einem Signal im Inneren der Zelle, das die oben beschriebenen Immunreaktionen auslöst.

2.1.4 Struktur und Funktion von IgG-Antikörpern

Antikörper kommen im Blutplasma und in den Schleimhäuten von Menschen und höheren Tieren vor und bilden die Schlüsselmoleküle der humoralen Immunantwort. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie spezifische Antigene erkennen und daraufhin eine Immunantwort auslösen.

Man unterscheidet fünf Antikörper-Isotypen: IgG, IgM, IgA, IgE und IgD. Prinzipiell sind Antikörper aus zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*) und zwei identischen leichten Ketten (*light chains*) aufgebaut, welche jeweils in einen konstanten und einen variablen Teil gegliedert sind (Abbildung 2).

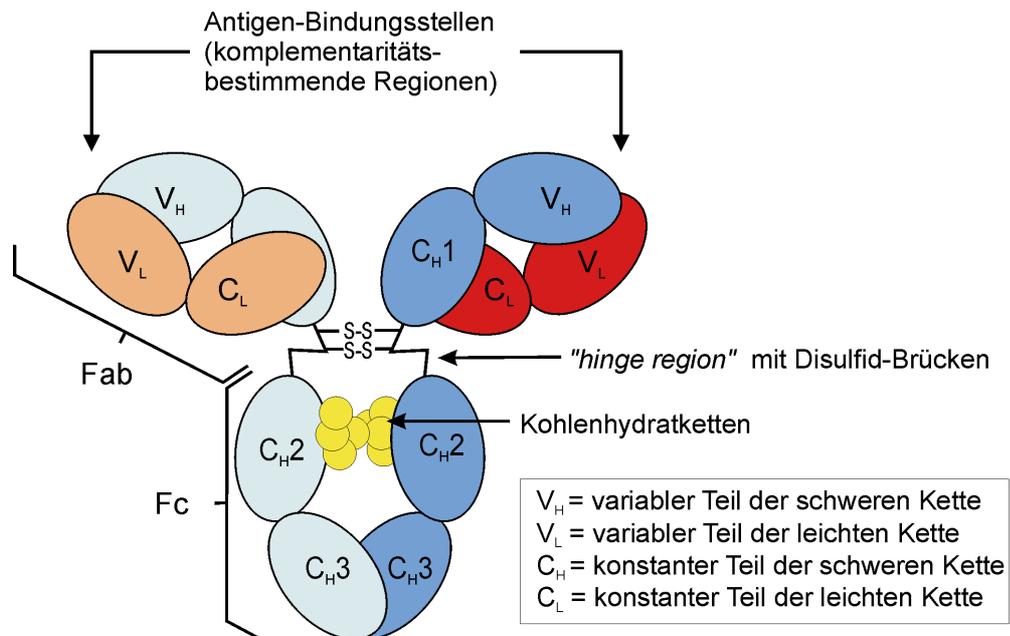


Abbildung 2: Domänenstruktur eines IgG-Antikörpers.

Der am häufigsten vorkommende Isotyp im humanen Blutplasma ist IgG, das in monomerer Form vorliegt und zelluläre sowie humorale Immunantworten auslösen kann. Dagegen liegt IgM im Serum als Pentamer von disulfidverbrückten Immunoglobulinen vor und aktiviert wirkungsvoll die Komplementkaskade. Schon ein einziges IgM-Pentamer kann das Komplementsystem in Gang setzen. Das als disulfidverbrücktes Dimer vorliegende IgA wird vorwiegend in den Darm und in respiratorische Epithelien

sezerniert, wo es vor Infektionen schützt. IgE ist hauptsächlich als Mastzell-assoziiertes Antikörper direkt unterhalb epithelialer Oberflächen, besonders der Haut, zu finden.

Die zwei schweren Ketten eines IgG-Antikörpers gliedern sich in vier Domänen, die beiden leichten Ketten in zwei Domänen (Abbildung 2). Alle IgG-Domänen weisen das IgG-Faltungsmotiv auf. Insgesamt vier Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten sowie viele nichtkovalente Wechselwirkungen stabilisieren den IgG-Antikörper. Die Molekülstruktur eines IgG-Antikörpers gliedert sich in zwei kompakte Fab-Fragmente und in ein Fc-Fragment. Der Fc-Teil des IgG-Antikörpers ist mit beiden Fab-Armen durch flexible Polypeptidregionen verbunden, die *hinge regions* genannt werden. Diese verleihen dem Antikörper eine hohe Flexibilität und ermöglichen damit die gleichzeitige Bindung von Antigenen und Effektormolekülen. (Saphire et al., 2002).

Wie alle Antikörper trägt das IgG zwei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs) (Abbildung 2), welche von *loops* der V_H - und V_L -Domänen gebildet werden. Die CDRs legen die Bindungsspezifität des Antikörpers für bestimmte Antigene fest. Das humane Immunsystem kann bis zu 10^8 verschiedene IgG-Antikörper bereitstellen, die sich jeweils in der Sequenz und Struktur der CDRs voneinander unterscheiden. Durch sie können Antikörper an spezifische Epitope auf der Oberfläche von Antigenen binden. Der großen Variabilität der Fab-Arme steht die relative Konstanz des Fc-Armes gegenüber, der für die Aktivierung von immunologischen Reaktionen, nämlich der Komplementkaskade oder des Fc-Rezeptor-vermittelten Signalweges notwendig ist.

Durch die gezielte proteolytische Spaltung von IgG-Antikörpern in den sterisch leicht zugänglichen *hinge regions* mittels Papain können isolierte Fab- und Fc-Fragmente gewonnen werden (Stevenson et al., 1975). Das Fc-Fragment hat eine hufeisenförmige Struktur (Deisenhofer, 1981), (Abbildung 2) und ist an beiden $C\gamma_2$ -Domänen am Aminosäurerest Asn297 glykosyliert. Die Analyse der verzweigten Kohlenhydratketten von polyklonalem IgG ergab, dass alle IgG-Antikörper einen Oligosaccharid-Stamm mit den Zuckerresten $\text{GlcNAcFucGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ (Abbildung 3) tragen. An beiden Verzweigungen werden in der Regel weitere Galactosereste gefunden. Die Enden der beiden Kohlenhydratarme werden oft von Sialinsäureresten (Neu5Ac) gebildet (Jefferis et al., 1990).

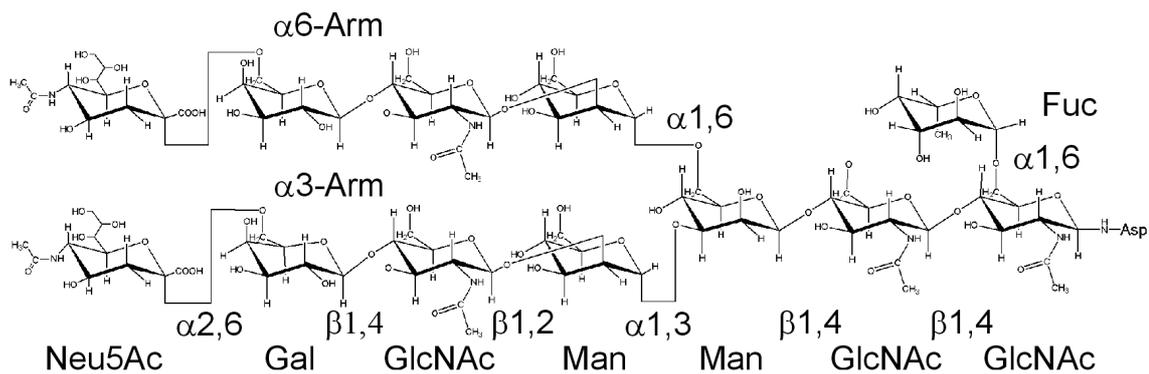


Abbildung 3: Kohlenhydratstruktur des IgG1.

Die bei humanem IgG1 nachgewiesene Oligosaccharidstruktur zählt zu den komplexen Kohlenhydratketten, die sich dadurch auszeichnen, dass unterschiedliche Zucker in den abzweigenden Armen in gleicher Reihenfolge verknüpft sind. Der $\alpha 6$ -Arm (Abbildung 3), ist an der Oberfläche der $C\gamma 2$ -Domäne angelagert und verläuft in Richtung der scharnierartigen Verbindung zwischen der $C\gamma 2$ - und $C\gamma 3$ -Domäne. Die Zuckerreste des Oligosaccharidstammes und des $\alpha 6$ -Armes gehen vorwiegend Wechselwirkungen mit hydrophoben Resten der $C\gamma 2$ -Domäne ein. Demgegenüber reicht der $\alpha 3$ -Arm in den Raum zwischen den $C\gamma 2$ -Domänen hinein, wo er mit dem $\alpha 3$ -Arm der Kohlenhydratkette der gegenüberliegenden $C\gamma 2$ -Domäne wechselwirkt (Deisenhofer, 1981; Deisenhofer et al., 1976; Huber et al., 1976).

2.1.5 Fc-Glykosylierung und Effektorfunktionen von Antikörpern

Biochemische Experimente haben gezeigt, dass komplett deglykosyliertes IgG1 nicht an Fc γ -Rezeptoren bindet (Pound et al., 1993; Sarmay et al., 1992; Tao and Morrison, 1989) und deshalb nicht mehr die bekannten Effektorfunktionen auslösen kann (Burton and Woof, 1992). Außerdem wurde gezeigt, dass Fc-Fragmente mit Kohlenhydratketten, die bis zur Man4 verkürzt sind, eine deutlich verminderte Affinität zum Fc γ RIIb-Rezeptor aufweisen (Mimura et al., 2000; Mimura et al., 2001).

Obwohl diese Experimente die Wirkung einzelner Monosaccharide auf den Bindungsprozess charakterisieren, war bisher unklar, wie Kohlenhydratketten die Struktur und Funktion von IgG-Fc-Fragmenten beeinflussen.

Die Kristallstruktur eines 1:1-Komplexes aus IgG1-Fc und Fc γ RIII (Sondermann et al., 2000) erlaubt eine detaillierte Analyse der intermolekularen Wechselwirkungen beider Proteine. Interessanterweise sind die Zucker kaum an der Wechselwirkung beteiligt, denn es findet sich nur eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Arg152 des Fc γ RIII und dem Zuckerrest GlcNAc1 der Fc-Kohlenhydratkette (Abbildung 4).

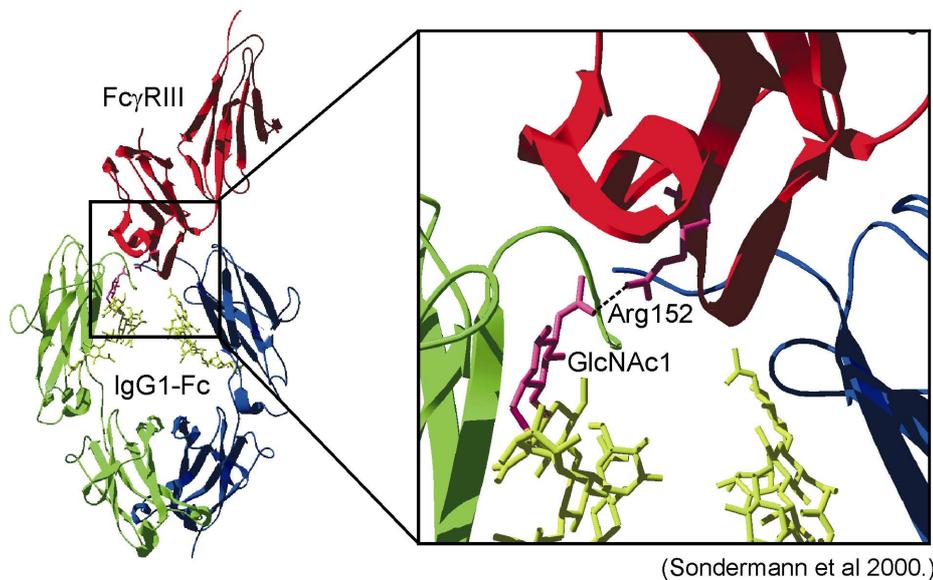


Abbildung 4: IgG1-Fc-Fc γ RIII-Komplex. Die vergrößerte Ansicht der Kontaktstelle der beiden Proteine zeigt, dass abgesehen von einer schwachen polaren Wechselwirkung zwischen dem Carbonylsauerstoff der *N*-Acetylgruppe des GlcNAc1 und der Guanidinogruppe des Arg152 (gestrichelte Linie) kein direkter Kontakt zwischen der Kohlenhydratkette des Fc-Fragmentes und dem Fc γ RIII besteht.

Die Kohlenhydratketten müssen also einen Einfluss auf die Struktur des IgG1-Fc-Fragmentes haben, der für eine effektive Fc γ R-Bindung von Bedeutung ist.

Viele therapeutische Antikörper, die heute schon auf dem Markt oder in der klinischen Erprobung sind, könnten durch die gezielte Manipulation des Glykosylierungsmusters des Fc-Fragmentes noch effektiver gemacht werden, denn der therapeutische Effekt eines Antikörpers ist unter anderem davon abhängig, wie gut er die Effektorsysteme *in vivo* aktiviert oder inhibiert. Ein Beispiel für die immunsupprimierende Wirkung eines therapeutischen Antikörpers ist das vollständig deglykosylierte anti-T-Zell-IgG, welches bestimmte Antigene auf der Oberfläche von transplantierten Organen maskiert, aber durch das Fehlen der Kohlenhydratketten am Fc-Teil keine Fc γ R-vermittelte Immunreaktion auslösen kann. Die Abstoßung des fremden Organes wird somit verhindert (Friend et al., 1999).

2.2 Der Sialinsäurestoffwechsel und die Aktivierung von Sialinsäuren

2.2.1 Vorkommen und Eigenschaften von Sialinsäuren

Sialinsäuren (*N*-Acetylneuraminsäuren) sind Zuckermoleküle, die neun Kohlenstoffatome enthalten und oft die endständigen Reste der Kohlenhydratketten von Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Oberfläche von tierischen und bakteriellen Zellen bilden. Die negative Ladung an der Oberfläche von tierischen Zellen wird vorrangig durch Sialinsäuren in den genannten Glykokonjugaten hervorgerufen (Angata and Varki, 2002; Schauer, 2000). Sialinsäuren sind unverzichtbar für die Zell-Zell-Erkennung und -Kommunikation. Das Sialylierungsmuster von Glykokonjugaten an der Zelloberfläche ändert sich während der Befruchtung (Dell et al., 1999), Differenzierung (Eckhardt et al., 2000), Entwicklung (Inoue and Inoue, 2001) und während biologischer Alterungsprozesse (Bratosin et al., 1995). Außerdem wurde gezeigt, dass das Verteilungsmuster der Sialinsäuren auf Tumoren mit deren Malignität korreliert (Daniel et al., 2000). Zum Beispiel ist das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM), ein Protein, das bei der Vernetzung von sich entwickelnden Nervenzellen eine wichtige Rolle spielt (Kojima et al., 1997; Poongodi et al., 2002), in normalen Zellen di-, oligo- oder polysialyliert (Eckhardt et al., 1995; Seidenfaden et al., 2000). Demgegenüber wird nichtsialyliertes NCAM an der Zelloberfläche von einigen Neuroblastoma-Arten beobachtet und ist daher ein Marker für erhöhte Malignität (Figarella-Branger et al., 1996).

Viren wie z. B. Influenzaviren und bakterielle Toxine wie Cholera-toxin, Botulinumtoxin und Tetanustoxin nutzen sialylierte Kohlenhydratstrukturen an der Zelloberfläche, um die Membran der Wirtszelle zu durchqueren. Die Kapseln von einigen neuroinvasiven Bakterienstämmen bestehen aus Sialinsäurepolymeren (Vogel and Frosch, 2002), die in *Neisseria meningitidis* B und *Escherichia coli* K1 durch α 2,8-glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren aufgebaut werden (Steenbergen and Vimr, 2003). Diese α 2,8-Polysialinsäure-Kapsel ist strukturell und chemisch identisch zu den Kohlenhydraten, die auf Zellen des Nervensystems des infizierten Wirtes auftreten und ermöglicht es den pathogenen Bakterien, vom Immunsystem unerkannt zu bleiben (Mandrell and Apicella, 1993).

2.2.2 Biosynthese von Sialinsäuren

Die Biosynthese des Sialinsäure-Grundgerüsts, der 5-*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), geht von Fructose-6-Phosphat aus, einem Zwischenprodukt der Glykolyse. Durch einen Amin-Transfer von Glutamin auf Fructose-6-Phosphat entsteht Glucosamin-6-Phosphat, das dann durch Acetylierung, Epimerisierung und den Transfer von Phosphoenolpyruvat auf den C6-Kohlenstoff in Neu5Ac überführt wird (Roseman, 1968; Warren and Blacklow, 1962). In Lösungen liegt die Neu5Ac als Gemisch aus 7 % α -Neu5Ac und 93 % β -Neu5Ac vor.

2.2.3 Aktivierung und Übertragung von Sialinsäuren

Das β -Anomer der Neu5Ac, das die anomere Hydroxylgruppe am C2-Kohlenstoff in der axialen Position trägt, wird von der CMP-5-*N*-Acetylneuraminsäure-Synthetase (CNS) aktiviert, die aus ungeklärten Gründen vorrangig im Zellkern vorkommt.

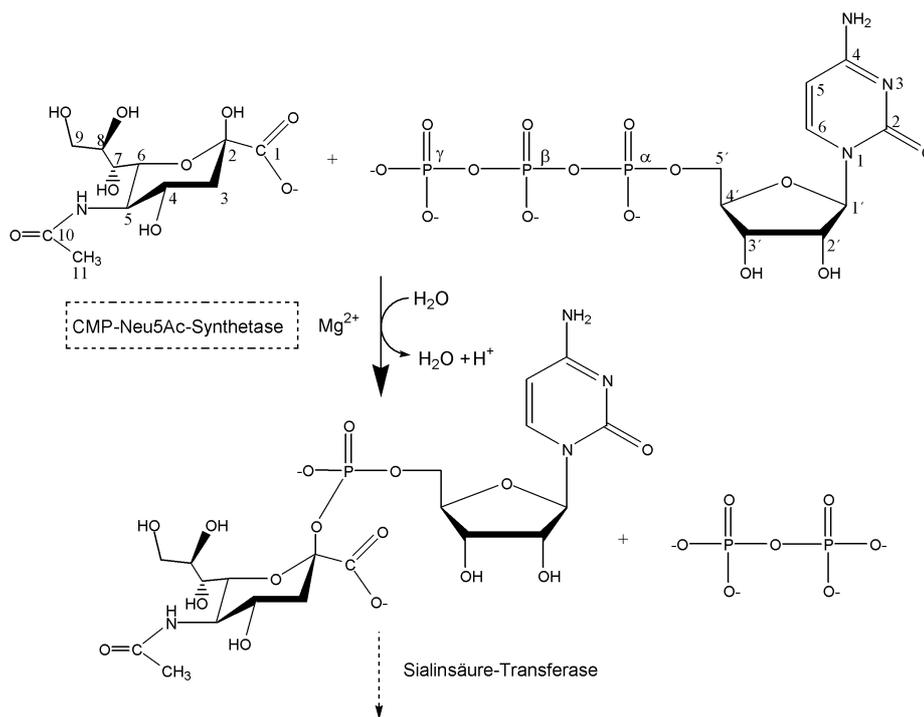


Abbildung 5: Chemische Reaktion, die von der CMP-Neu5Ac-Synthetase katalysiert wird.

Dabei wird unter Verbrauch von CTP eine CMP-Gruppe auf die anomere Hydroxylgruppe von β -Neu5Ac übertragen und PP_i freigesetzt (Abbildung 5). Der erste Schritt dieser S_N2 -Substitution ist die Deprotonierung der β -anomeren Hydroxylgruppe

von Neu5Ac. Dazu ist eine Base (*general base*) im aktiven Zentrum notwendig, die das Proton aufnimmt (Ambrose et al., 1992). Das entstehende Oxyanion Neu5Ac-O⁻ greift am α -Phosphat des CTP an, wodurch ein pentakovalenter Übergangszustand entsteht. Der O⁻-Sauerstoff von Neu5Ac und mit ihm die β -Konfiguration am C2-Kohlenstoff bleiben im Produkt erhalten (Ambrose et al., 1992). Nach dem Aktivierungsschritt diffundiert CMP-Neu5Ac aus dem Zellkern in das Cytoplasma, von wo es durch spezifische CMP-Neu5Ac-Transporterproteine in den Golgi-Apparat eingeschleust wird (Creek and Morre, 1981; Eckhardt et al., 1999). Im Golgi-Apparat wird dann der Neu5Ac-Anteil der CMP-Neu5Ac von Sialinsäuretransferasen auf terminale D-Galactose-, N-Acetylglucosamin- oder N-Acetylgalactosaminreste von Glykoproteinen und Glykolipiden (Muhlenhoff et al., 2001) übertragen. Die β -Konfiguration am C2-Kohlenstoff des Neu5Ac wird während des Transfers umgekehrt, so dass in natürlichen Glykokonjugaten nur die α -Konfiguration vorkommt.

2.2.4 Sialinsäurederivate

Die Neu5Ac-Zucker können entweder vor oder nach ihrer Übertragung auf Oligosaccharide modifiziert werden. Insgesamt sind etwa 50 natürlich vorkommende Sialinsäurederivate bekannt, die an verschiedenen Hydroxylgruppen methyliert, acetyliert, lactosyliert, sulfuryliert oder phosphoryliert sind (Varki, 1992) (Abbildung 6). Allerdings kommt die unmodifizierte Grundform der Sialinsäure, Neu5Ac, in höheren Wirbeltieren am häufigsten vor (Schauer, 2000). In der Literatur wird oft auch die 2-Keto-3-deoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-nonulosonsäure (KDN) zu den Sialinsäuren gezählt, obwohl dieser Zucker keine N-Acetylgruppe am C5-Kohlenstoff-Atom trägt.

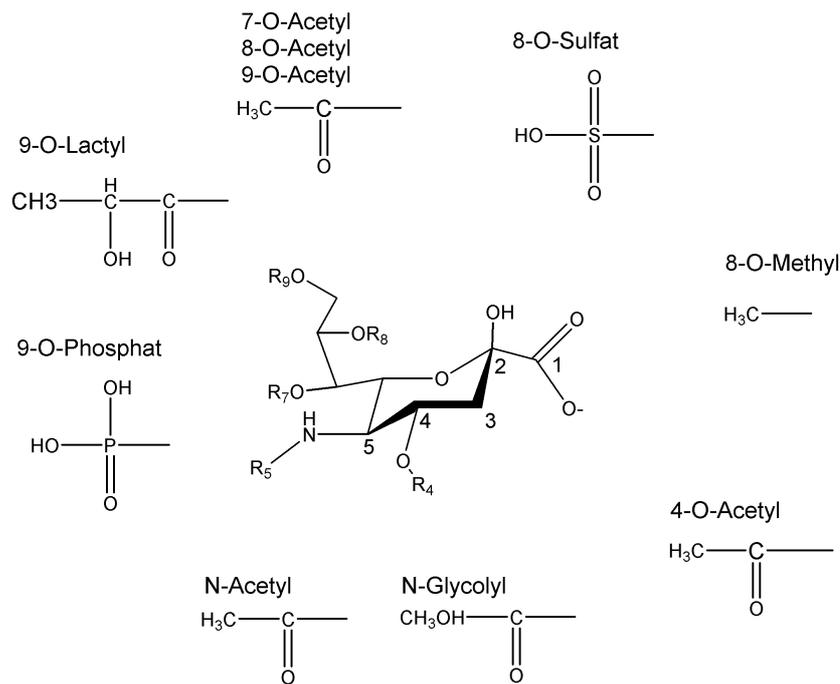


Abbildung 6: Das Grundgerüst der Sialinsäuren und mögliche substituierende Gruppen.

2.2.5 Die murine CMP-Neu5Ac-Synthetase

Die erste Säuger-CNS, die untersucht wurde, stammt aus der Maus und wurde durch Expressionsklonierung identifiziert (Munster et al., 1998). So wurde gezeigt, dass die c-DNA, die für den katalytisch aktiven Teil der murinen CNS (cMm-CNS) kodiert, sowohl CNS-defiziente LEC29Lec32-CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary cells*) als auch *E. coli* CNS-Mutanten (EV5) komplementieren kann. Die Ergebnisse belegen, dass CNS-Enzyme für die Neu5Ac-Aktivierung essentiell sind und dass die Neu5Ac-Aktivierung in Bakterien und Wirbeltieren nach einem sehr ähnlichen Prinzip abläuft.

Die Mm-CNS gliedert sich in einen N-terminalen, katalytisch aktiven Teil (Aminosäuren 1-267), der Ähnlichkeit zu bakteriellen zuckeraktivierenden Enzymen zeigt und einen C-terminalen Teil (Aminosäuren 268-432), der funktionell noch nicht charakterisiert ist.

Die im katalytisch aktiven Teil der Mm-CNS integrierte Kernlokalisationssequenz (NLS) bedingt, dass 90 % der katalytischen Aktivität des Enzymes im Zellkern zu finden sind. Punktmutationen der Reste Arg199 oder Arg202, die in der NLS liegen, haben gezeigt, dass beide Reste sowohl für die Katalyse als auch für die Kernlokalisierung von Bedeutung sind (Munster et al., 2002).

2.2.6 Verwandte Strukturen

Die Kristallstruktur der bakteriellen CNS von *Neisseria meningitidis* (Nm-CNS) wurde im Komplex mit dem Substratanalogon CDP gelöst (Mosimann et al., 2001). Einem geordneten Wassermolekül im aktiven Zentrum wurde die Funktion der katalytischen Base zugeschrieben (Mosimann et al., 2001). Außerdem wurde ein detaillierter Katalysemechanismus für die sequenziell und strukturell verwandte CMP-2-keto-3-deoxy-*manno*-octulosonsäure-Synthetase (CMP-KDO-Synthetase) aus *E. coli* (Ec-CKS) vorgeschlagen, die als Substrat- und Produktkomplex kristallisiert wurde (Jelakovic and Schulz, 2002). In dem vorgeschlagenen Mechanismus wirkt ein Hydroxidion, das von einem Aspartat gebunden wird, als *general base*. Weiterhin wurde in der Ec-CKS-Struktur ein Mg^{2+} -Ion gefunden, welches das α -Phosphat polarisiert und den nukleophilen Angriff des Neu5Ac am α -Phosphat begünstigt.

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel des ersten Teils der Arbeit bestand in der strukturellen Charakterisierung von IgG1-Fc-Fragmenten mit enzymatisch unterschiedlich stark verkürzten Kohlenhydratketten. Die Strukturen sollen dazu beitragen, die Auswirkungen der Fc-Glykosylierung auf die Struktur und Funktion von IgG-Fc-Fragmenten besser zu verstehen.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Struktur des katalytisch aktiven Teils der eukaryotischen CMP-Neu5Ac-Synthetase aus *Mus musculus* (cMm-CNS) beschrieben. Die Struktur des Enzym-Produkt-Komplexes liefert neue Informationen zur Funktionsweise und Regulation von eukaryotischen sialinsäureaktivierenden Enzymen.

3. MATERIALIEN & METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Biorad (München), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) oder Hampton (Laguna Niguel) in *p.a.*-Qualität bezogen.

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die Zentrifugen waren von den Firmen Beckmann, Sorvall, Hettich und Eppendorf, die Pipetten von Eppendorf. Chromatographiert wurde auf FPLC- oder ÄKTA-Anlagen (Pharmacia). Proteinkonzentratoren und Dialysemembranen der Firmen Spectra/Por (Roth) und Milipor (Eschborn) sowie Mikrodialysezellen 5 μ l bzw. 10 μ l von Hampton (Hampton Research, Laguna Hills) wurden verwendet. Markerproteine für die Gelelektrophorese und Gelfiltration wurden von den Firmen Sigma und Roche bezogen. Gelelektrophoresekammern für die Agarose- und SDS-PAGE-Gelelektrophorese sind in der Werkstatt des Max-Planck-Institutes für Biochemie hergestellt worden.

Die Röntgendiffraktionsexperimente wurden mit Drehanoden-Generatoren RU200 (RIGAKU) und MARRESEARCH *image-plate*-Detektoren oder alternativ mit Synchrotronstrahlung am DESY/Hamburg, Beamline BW6 in Verbindung mit einem MAR-CCD-Detektor durchgeführt. Verwendete Computer waren entweder IBM-kompatible *personal computer* (Windows-NT), digital-ALPHA-stations (OSF) oder Silicon Graphics *work-stations* und *compute server* (IRIX).

3.1.3 Bakterienstämme, Plasmide, Medien und Antibiotika

Bakterienstämme

E. coli DH5 α Genotyp: deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rk-mk+), recA1, relA1, supE44, thi-1,D(lacZYA-argF), f80lacZDM15Fl-, (Stratagene GmbH, Heidelberg)

E. coli BL21 Genotyp: F1, ompT, hsdSB, (rB-mB-), gal, dcm, (Novagene, INC., Madison, Wisconsin)

E. coli BL21(DE3) Genotyp: F1, ompT, hsdSB, (rB-mB-), gal, dcm, (DE3), (Novagene, INC., Madison, Wisconsin)

Der *E. coli* Stamm DH5 α wurde für Expressionstests der cMm-CNS benutzt. Im *E. coli* Stamm BL21 und BL21(DE3) wurde die cMm-CNS und die Mm-CNS exprimiert.

Plasmide

Das Plasmid GEX-4T-2 (Pharmacia) wurde für die Expression der cMm-CNS verwendet. In diesem Vektor steht das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines Ptac-Promotors. Das Plasmid pET3a (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden) wurde für die Expression der Mm-CNS verwendet. In diesem Vektor steht das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines T7lac-Promotors.

Medien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):

1 % Trypton

0.5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

Für LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium 15 g/l Agar-Agar zugesetzt.

Antibiotika

Die Endkonzentration an Ampicillin (Amp) im Expressionsmedium betrug 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.1.4 Weitere biologische Materialien

Für den Proteolyseverdau an der Mm-CNS wurde Aminopeptidase-M (Roche) verwendet.

Die IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten (MN2F)₂, (M3N2F)₂, (G0F)₂ und (G2F)₂ wurden freundlicherweise von Dr. Yusuke Mimura und Prof. Roy Jefferis (Medical School, University of Birmingham) bereitgestellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle Geräte zum Arbeiten mit Bakterien wurden vor und nach ihrer Benutzung autoklaviert oder mit 70 % Ethanol sterilisiert. Alle Lösungen und Medien für molekularbiologische Arbeiten wurden autoklaviert oder sterilfiltriert.

3.2.1.1 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (Elektroporation)

In einer Elektroporationsküvette mit 0.2 mm Elektrodenabstand (BioRad, München) wurden 40 µl der elektrokompenten Zellen sowie 50 bis 150 ng der durch Mikrodialyse entsalzten DNA gemischt und in einem Elektroporator 1000 (BioRad, München) (Ladespannung 1650 V) kurzzeitig einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Dann wurden die Zellen in 500 µl LB-Medium aufgenommen, 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und anschließend 50-200 µl der Kultur auf einer LB-Agarplatte mit Selektions-Antibiotikum ausgestrichen. Dann wurde diese Agarplatte für ca. 12 h bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.2 Flüssigkultur von Bakterien

Eine Einzelkolonie wurde mit einer sterilen Impföse von der Agarplatte abgenommen und damit 5 ml steriles LB-Medium mit einem Selektions-Antibiotikum angeimpft. Die Kulturen wurden in einem Schüttler bei 37 °C inkubiert, bis eine erste Trübung der Lösung zu sehen war. Die Vorkultur wurde zum Animpfen der eigentlichen Expressionskulturen im Verhältnis 1:1000 verwendet.

3.2.1.3 Heterologe Expression in *E. coli*

Der katalytisch aktive Teil der Mm-CNS (cMm-CNS, Aminosäuren 39-267) wurde in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert. Der verwendete Expressionsvektor pGEX-4T-2 enthält einen GST-*tag* nach dem Start-Codon und eine Thrombin-Schnittstelle direkt vor der kodierenden Sequenz.

Die Bakterienkultur wurde bei einer Temperatur von 36 °C inkubiert bis die optische Dichte (OD₆₀₀) einen Wert von 0.8 erreichte. Anschliessend wurde die Expression des Proteins mit 1 mM IPTG induziert und die Bakterienkulturen bei 16 °C für 6 h inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (48.000 g, 30 min, 4 °C), in 100 ml Puffer A (100 mM TRIS/HCl pH 8.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT) resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

3.2.1.4 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Das Zell-Pellet (ca 10 g) wurde nach der Zugabe von 200 mg Lysozym (Hühnerei, Sigma), 1 mM DTT und eines Protease-Inhibitor-Cocktails (1 Tablette pro 50 ml Zellsuspension, Roche) auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden durch Sonifikation (Branson Sonifier 250, Makrotip, Stufe 8, *duty cycle* 60 %, 10 min) bei 0 °C aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zellysate 30 min bei 48.000 g und 4 °C abzentrifugiert.

3.2.1.5 Reinigung von IgG1 und Herstellung von Glykosylierungsvarianten

Das humane Immunglobulin IgG1 (Cri, Allotyp G1m(f)), das als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Fc-Fragmenten verwendet wurde, stammt aus dem Serum eines Patienten mit multiplem Myelom.

Die Aufreinigung des IgG1 aus Blutserum mittels DEAE-Sepharose-Chromatographie und die proteolytische Spaltung von IgG mit Papain, sowie die Reinigung des Fc-Fragmentes durch Affinitätschromatographie an Protein-G-Sepharose-4B wurde in der Gruppe von Prof. Jefferis durchgeführt (Jefferis et al., 1990).

Die enzymatische Modifizierung der IgG1-Fc-Kohlenhydratketten, die zu den Glykosylierungsvarianten (G0F)₂, (M3N2F)₂ und (MN2F)₂ führten, sind von Mimura et al. durchgeführt worden (Mimura et al., 2001). Weiterhin wurde die Glykosylierungsvariante (G2F)₂ durch Inkubation der Fc-Fragmente mit Sialidase (*Arthrobacter ureafaciens*, Roche, 0.1 U pro mg Fc-Fragment) in 50 mM Acetatpuffer, pH 5.0 bei 37 °C für 24 h und anschließender Inkubation mit Galactosyltransferase (Kuhmilch, Oxford Glycosciences, 0.12 U pro mg Fc-Fragment) in 20 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 5 mM MnCl₂, 13 mM UDP-Gal, pH 7.0 bei 37 °C für 24 h hergestellt. Das Protein wurde abschließend durch Affinitätschromatographie an Protein-G-Sepharose-4B gereinigt.

Ein komplett deglykosyliertes Fc-Fragment wurde durch einen PNGase-F-Verdau hergestellt, bei dem 4 mg natives Fc-Fragment bei 37 °C für 60 h mit 50 U PNGase-F (Roche) inkubiert wurden. Anschließend wurde das deglykosylierte Fc-Fragment durch Gelfiltrationschromatographie auf einer Superdex-75-Säule (XK26, Pharmacia) in PBS-Puffer gereinigt und auf 10 mg/ml aufkonzentriert.

3.2.1.6 Proteinreinigung von cMm-CNS

Das abzentrifugierte Zellysat wurde auf eine GST-Sepharose-Säule (XK16, Pharmacia) aufgetragen, die mit 150 mM Puffer A (siehe Abschnitt 3.2.1.3) equilibriert war. Anschließend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen und das GST-cMm-CNS-Fusionsprotein mit 1 mM reduziertem Glutathion in Puffer A eluiert. Die Fraktionen, die das GST-cMm-CNS-Fusionsprotein enthielten wurden vereint und mit 1 U Thrombin (Novagen) pro mg GST-cMm-CNS-Fusionsprotein für 4 h bei 16 °C verdaut. Danach wurde das Thrombin durch die Zugabe von 100 µM PMSF inaktiviert. Um das Glutathion aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde eine Dialyse gegen Puffer A bei 4 °C durchgeführt (*molecular cut-off* 10 kDa). Das Dialysat wurde ein zweites Mal auf die GST-Säule aufgetragen. Im Durchlauf der Säule befand sich nun die cMm-CNS und an der Säule verblieb der abgespaltene GST-tag sowie das ungespaltene GST-Fusionsprotein.

Die cMm-CNS wurde mit Ultrafree-Konzentratoren (*molecular cut-off* 10 kDa) auf 10 mg/ml konzentriert und auf eine Superdex-200-HighLoad-Säule (XK26, Pharmacia)

aufgetragen, die in Puffer B (2 mM TRIS/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02 % (w/v) NaN_3) equilibriert war. Um das Präzipitieren des Proteins beim Aufkonzentrieren zu verhindern, wurden 2 mM des Reaktionsproduktes CMP-Neu5Ac zugegeben und das Protein anschließend auf 10 mg/ml aufkonzentriert.

3.2.1.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Colorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford

800 μl Wasser (abzüglich des Volumens der Proteinlösung) wurden mit 200 μl des Bradford-Reagenzes BIO-ASSAY (Biorad) gemischt, die Proteinlösung (0.5 – 5 μg Protein) zugegeben und wieder gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Extinktion dieser Lösung bei 595 nm gemessen und anhand einer Eichkurve (BSA-Lösung in Wasser) die Proteinkonzentration bestimmt.

Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Absorptionsmessung

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde alternativ die auf Tyrosine und Tryptophane zurückzuführende Absorption von UV-Licht bei 280 nm ausgenutzt. Aus der Extinktion der Probe bei 280 nm (sie sollte zwischen 0.1 und 1.0 liegen) wurde mit dem Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration errechnet.

Lambert-Beersches Gesetz:
$$E = \epsilon_{280\text{nm}} \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

c = Proteinkonzentration [M]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

$\epsilon_{280\text{nm}}$ = Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], (wird aus der Anzahl der im Protein enthaltenen Tyrosin-, Tryptophan- und Cysteinresten berechnet).

3.2.1.8 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Zur Herstellung der 12 %igen SDS-Gele wurden die aufgeführten

Puffer verwendet. Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 100 µl TEMED und 100 µl (0.1 g/ml) AMPS in die vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und mit wenig Isopropanol blasenfrei überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, die Sammelgellösung mit 100 µl TEMED und 100 µl (0.1 g/ml) AMPS versetzt und in die Gelgießapparatur eingefüllt. Die Kämme für zehn bis zwölf Geltaschen wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Die ausgehärteten Gele wurden in Haushaltsfolie luftdicht eingeschlossen und bei 4 °C gelagert.

Die Proteinproben wurden 10:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 90 °C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei 160 V durchgeführt und das Gel anschließend 30 min in Färbelösung und danach 2 h in Entfärbelösung eingelegt.

Lösungen für die SDS-PAGE

Sammelgel 5 %:

6.8 ml Acrylamid 30 % (w/v)
27.6 ml H₂O
5ml 1 M TRIS-HCl pH 6.6
600 µl 10 % (w/v) SDS
600 µl 10 % (w/v) AMPS
20 µl TEMED

Trenngel 12.5 %:

25 ml Acrylamid 30 % (w/v)
23 ml H₂O
5ml 1 M TRIS-HCl pH 8.8
600 µl 10 % (w/v) SDS
600 µl 10 % (w/v) AMPS
20 µl TEMED

Auftragspuffer 2x:

100 mM TRIS/AcOH, pH 6.8
100 mM DTT
5 mM EDTA
20 % (v/v) Glycerin
0.04 % (w/v) Bromphenolblau

Färbelösung:

50 % Ethanol (v/v)
10 % Essigsäure
0.1 % Coomassie R250 (w/v)

Entfärber:

30 % Ethanol (v/v)
7 % Essigsäure (v/v)

3.2.1.9 Massenspektrometrie

Die Homogenität der Fc-Glykosylierungsvarianten (G2F)₂, (G0F)₂, (M3N2F)₂ und (MN2F)₂ wurde durch Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestätigt (Mimura et al., 2001). Das vollständig deglykosylierte Fc-Fragment wurde massenspektrometrisch in der Abteilung für Proteinanalytik des Max-Planck-Institutes für Biochemie an einem Perkin-Elmer-PE-Sciex-API-III-Massenspektrometer analysiert.

3.2.1.10 Proteolytischer Verdau

Um den flexiblen N-Terminus (Aminosäuren 1-39) der Mm-CNS zu entfernen wurde die Mm-CNS mit der Endoprotease Aminopeptidase-M verdaut. Ein zeitabhängiger Proteolysetest der Mm-CNS mit Aminopeptidase-M wurde bei Raumtemperatur in Puffer A (100 mM TRIS/HCl pH 8.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT) durchgeführt. Dazu wurde 1 U Aminopeptidase-M zu 0.2 mg Fusionsprotein zugegeben.

Während des Proteaseverdaus wurden nach 0 min, 8 min, 20 min, 50 min, 2 h, 5 h, 9 h und 20 h Proben entnommen, die durch SDS-Gelelektrophorese bzw. durch Massenspektrometrie analysiert wurden.

3.2.1.11 Sequenzanalyse und Datenbanksuche

DNA- und Polypeptidsequenzen wurden aus der EMBL Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk>) und aus der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) entnommen. Sequenzen wurden mit PILEUP aus dem GCG Programmpaket (Womble, 2000) verglichen. Potentielle Phosphorylierungsstellen wurden mit dem Programm NetPhos identifiziert (<http://www.expasy.ch>) (Blom et al., 1999).

3.2.2 Röntgenstrukturanalytische Methoden

3.2.2.1 Strukturbestimmung von Proteinen

Proteine haben eine definierte dreidimensionale Faltung, die ihre Funktion bestimmt. Die genaue Kenntnis von dreidimensionalen, atomar aufgelösten Proteinstrukturen kann zum Beispiel für die Entwicklung und Verbesserung von pharmakologischen Substanzen oder die gezielte Veränderung der Proteineigenschaften verwendet werden. Heute stehen drei

etablierte Methoden zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen zur Verfügung. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht die Darstellung von Proteinoberflächen in subatomarer Auflösung. Proteinstrukturen in atomarer Auflösung ($\sim 1 \text{ \AA}$) können hingegen mit Kernresonanzspektroskopie (NMR) (*nuclear magnetic resonance*) und Röntgenkristallographie erstellt werden.

Die NMR erlaubt die Untersuchung von Proteinen in Lösung, was für die Untersuchung von dynamischen Prozessen und intermolekularen Wechselwirkungen vorteilhaft ist. Allerdings können mit Hilfe der NMR nur Proteine bis zu einer maximalen Größe von ca. 35 kDa untersucht werden. Die Röntgenkristallographie bietet die Möglichkeit, die Struktur von Proteinen mit höherem Molekulargewicht zu bestimmen. Dabei ist man jedoch auf die Kristallisierbarkeit der Proteine angewiesen.

3.2.2.2 Theoretischer Hintergrund

Die Methoden zur röntgenkristallographischen Strukturaufklärung von Proteinen sind in einigen Lehrbüchern ausführlich behandelt (Blundell and Johnson, 1976; Drenth, 1994; Stout and Jensen, 1989). Deshalb werden im Folgenden nur die wichtigsten Grundprinzipien dargestellt.

Bei der Licht- und Elektronenmikroskopie verwendet man Linsen für die Bündelung von Lichtwellen, die von einem betrachteten Objekt gebeugt werden und erzeugt so ein vergrößertes Bild. Die maximale Auflösung, die von mikroskopischen Methoden erreicht werden kann, ist durch die Wellenlänge des verwendeten Lichtes limitiert. Die Wellenlänge des Lichtes, die man für die Visualisierung eines Objektes verwendet, darf nicht größer sein als das Objekt selbst. Die elektromagnetischen Wellen, die man benötigen würde, um atomare Dimensionen direkt abzubilden (z. B. 1.51 \AA für eine C α -CO-Bindung im Proteinrückgrad), liegen im Spektralbereich des Röntgenlichtes. Trotz der Fähigkeit einzelner Atome, Röntgenstrahlung zu beugen, ist es aus zwei Gründen nicht möglich, einzelne Moleküle direkt abzubilden. Erstens gibt es keine Linsen, die Röntgenstrahlen fokussieren können. Dieses Problem wird dadurch umgangen, dass die Richtungen und die Intensitäten der gebeugten Röntgenstrahlen gemessen werden und daraus mit Hilfe eines Computers, der die Funktion der Linse übernimmt, ein Abbild des betrachteten Objektes berechnet wird. Zweitens beugt ein einzelnes Molekül nur einen sehr kleinen Anteil der Röntgenstrahlung, die auf ihn trifft, so dass die Intensität der

gebeugten Röntgenstrahlen zu gering für eine Detektion ist. Darum analysiert man die Röntgenstrahlung vieler Moleküle, die in identischer Orientierung in einem Kristall angeordnet sind. Jedes Molekül im Kristallgitter beugt die einfallende Röntgenstrahlung in derselben Weise. Die interferierenden Röntgenstrahlen verstärken sich gegenseitig oder löschen sich aus, wodurch charakteristische Interferenzmuster entstehen, die den Ausgangspunkt für die Strukturlösung darstellen.

Die wichtigsten Röntgenquellen für die Proteinstrukturanalyse sind Drehanodengeneratoren, meist mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung (1.54182 Å) und Synchrotrone mit regulierbaren Wellenlängen zwischen 0.9 Å und 1.8 Å.

Kristallaufbau

Ein Proteinkristall wird durch nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen regelmäßig angeordneten Proteinmolekülen gebildet. Insgesamt werden sieben Kristallsysteme unterschieden: triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragon, trigonal, hexagonal und kubisch. Diese Kristallsysteme ergeben zusammen mit den möglichen Symmetrieelementen 230 Raumgruppen, von denen 65 enantiomorph sind, d. h. aus chiralen Molekülen aufgebaut sind. Da Proteinmoleküle eine „Händigkeit“ (Chiralität) aufweisen, gibt es nur 65 verschiedene Raumgruppen, in denen Proteine kristallisieren können. Die Einheitszelle wird durch die Anwendung aller Symmetrieelemente der jeweiligen kristallographischen Raumgruppe auf die kleinste sich wiederholende Einheit, die *asymmetrische Einheit* (AU), gebildet. Das Kristallgitter ergibt sich aus den Eckpunkten der Einheitszellen, wird also durch die Translation der Einheitszelle um ganzzahlige Vielfache der Einheitszellvektoren in alle drei Raumrichtungen aufgebaut. Verbindet man diese Gitterpunkte durch parallele Ebenen, so erhält man eine Schar von Netzebenen. Diese Netzebenen schneiden die Einheitszellvektoren a , b und c bei $x = a/h$, $y = b/k$ und $z = c/l$, wobei sich h , k und l aus der Zahl der Segmente ergeben, in die eine Netzebenen­schar die Einheitszellvektoren zerlegt. Die ganzzahligen Variablen h , k und l werden auch als *Miller Indices* bezeichnet.

Auch außerhalb von Kristallen können Proteinmoleküle symmetrisch angeordnet sein, z.B. in multimeren Proteinkomplexen. Solche Symmetrieelemente können auch Teil der kristallographischen Symmetrie sein. Wenn aber die *asymmetrische Einheit* mehrere Monomere enthält, dann spricht man von lokaler oder nicht-kristallographischer

Symmetrie (NCS), die unabhängig von der kristallographischen Symmetrie betrachtet werden muss.

Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Wenn Röntgenstrahlung auf Materie trifft, dann regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen zu einer Schwingung mit derselben Frequenz an. Daraufhin senden die Elektronen Sekundärstrahlung mit der Frequenz der einfallenden Strahlung aus, weil sie als oszillierende Dipole wirken. Für freie Elektronen ist die Streustrahlung, die in alle Richtungen gleichmäßig abgegeben wird, gegenüber dem Primärstrahl um 180° phasenverschoben. Man spricht dabei auch von kohärenter Streustrahlung. Normalerweise können Elektronen in Proteinen als freie Elektronen angesehen werden. Im Fall der anomalen Streuung, die später behandelt wird, ist dies nicht mehr der Fall.

Die Streuung von Röntgenstrahlung an einem Kristall kann vereinfachend als Reflexion des einfallenden Strahles an den imaginären Netzebenen, die durch die *Miller Indices* h , k und l charakterisiert sind, betrachtet werden. Konstruktive Interferenz tritt nur auf, wenn der Gangunterschied zwischen den an einer Netzebenenschar gebeugten Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. Die Bedingung für konstruktive Interferenz ist in der Form des Bragg'schen Gesetzes formuliert:

Braggsches Gesetz:
$$n \cdot \lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \Theta_{hkl}$$

n = eine ganze Zahl

λ = Wellenlänge des Röntgenstrahls

d_{hkl} = Abstand der Netzebenen

Θ_{hkl} = Einfallswinkel der Röntgenstrahlen

Das reziproke Gitter

Für die graphische Darstellung des Bragg'schen Gesetzes ist die Einführung eines sogenannten reziproken Gitters hilfreich (Abbildung 7). Das reziproke Gitter resultiert aus der Gesamtheit der Normalvektoren von Netzebenenscharen mit der Länge des Netzebenenabstandes. Es gilt $d_{hkl} \sim 1/\sin\Theta_{hkl}$. Daher sind die Normalvektoren um so kürzer, je größer die hkl-Indizes und die Beugungswinkel werden. Die Endpunkte der Normalvektoren werden durch die Achsenabschnitte a/h , b/k und c/l definiert. Wenn man anstatt des normalen Gitters ein Koordinatensystem mit reziproken Achsen $a^* = 1/a$, $b^* = 1/b$ und $c^* = 1/c$ verwendet, ergibt sich aus den Endpunkten der reziproken Normalvektoren $d^* = 1/d_{hkl}$ ein weiteres Gitter, das reziproke Gitter. Jeder Gitterpunkt im reziproken Gitter entspricht einem Reflex hkl. Außerdem kann man einen Streuvektor S konstruieren, der senkrecht auf der „reflektierenden“ Gitterebene steht und dessen Länge gegeben ist durch:

$$|S| = \frac{2 \sin \theta_{hkl}}{\lambda}$$

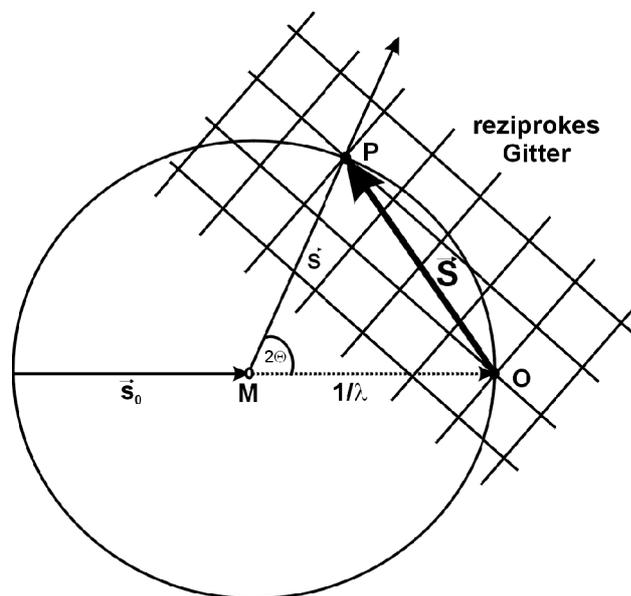


Abbildung 7: Zweidimensionale Darstellung der Ewald-Konstruktion. Am Punkt M befindet sich ein Kristall, um den eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ konstruiert wird (im zweidimensionalen Fall ein Kreis). Der einfallende Röntgenstrahl ist als Vektor s_0 dargestellt. Der Ursprung des reziproken Gitters befindet sich am Punkt O, an dem der verlängerte Vektor s_0 die Ewald-Kugel schneidet. Der Teil des einfallenden Primärstrahles der um 2Θ gebeugt wird (s) ergibt konstruktive Interferenz und führt zu einem Reflex. Die Bedingung für konstruktive Interferenz ist gegeben, wenn der Punkt P die Ewald-Kugel schneidet.

Diese Ewald-Konstruktion (Ewald, 1921) stellt dar, unter welcher Bedingung konstruktive Interferenz auftritt, also die Reflexbedingung des Bragg'schen Gesetzes erfüllt ist. Die Reflexionsbedingung ist genau dann erfüllt, wenn ein reziproker Gitterpunkt die Ewald-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ durchquert. Die Richtung des gestreuten Strahles kann man ermitteln, indem man den Drehpunkt des Kristalls mit dem reziproken Gitterpunkt verbindet, der gerade die Ewald-Kugel durchquert. Die Ewald-Konstruktion macht deutlich, daß die Richtung der Streuung und damit das Beugungsmuster nur vom Typ des Kristallgitters (Raumgruppe) abhängt. Die für die Strukturbestimmung wichtige Information steckt dagegen in den Intensitäten der gestreuten Strahlen.

Das Beugungsbild jedes Kristallgitters weist Reflexe auf, die durch Inversion am Ursprung des reziproken Gitters miteinander verknüpft sind, sogenannte Friedel-Paare hkl und $-h-k-l$. Die Phasen dieser Reflexe haben ein entgegengesetztes Vorzeichen. Da die Reflexe durch Strukturfaktoren $F(h,k,l)$ beschrieben werden können (siehe unten) gilt das Friedelsche Gesetz:

$$|F_{PH}(h,k,l)| = |F_{PH}(-h,-k,-l)|$$

Stellt man sich die Streuung von Röntgenstrahlung an einer isolierten Einheitszelle vor, so ergibt sich ein kontinuierliches Beugungsbild. Durch die periodische Anordnung der Einheitszelle im Kristall können die ausgesandten Sekundärwellen jedoch nur in bestimmte Richtungen konstruktiv interferieren, wodurch die typischen punktförmigen Reflexe entstehen. Die resultierenden gestreuten Röntgenstrahlen können durch Strukturfaktoren $F(h,k,l)$ beschrieben werden:

$$F(h,k,l) = \sum_i^N f_i \exp(2\pi i(hx + ky + lz))$$

Die Summe erstreckt sich dabei über alle Atome i an den Positionen x , y und z in der Einheitszelle. Jedes dieser Atome streut den Röntgenstrahl und wird damit zum Ausgangspunkt für eine neue Welle mit der Amplitude f_i (atomarer Streufaktor) und der Phase $i\alpha$.

Aus der Fouriersumation aller Strukturfaktoren kann die Elektronendichte $\rho(x,y,z)$ für jeden Punkt des Koordinatensystems errechnet werden.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} F(h, k, l) \exp(2\pi i(hx + ky + lz))$$

Dabei ist V das Volumen der Einheitszelle.

Eine alternative Schreibweise dieser Elektronendichtegleichung enthält die gemessenen Strukturfaktoramplituden und die Phasen $i\alpha$ getrennt.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F(h, k, l)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)]$$

Für die Berechnung der Elektronendichte müssen also Strukturfaktoramplituden und Phasenwinkel bekannt sein. Die Strukturfaktoramplituden $|F(h,k,l)|$ können aus der gemessenen Intensität der Reflexe errechnet werden ($I(h,k,l) \sim |F(h,k,l)|^2$). Der Phasenwinkel $i\alpha$ für jeden Strukturfaktor muss dagegen auf einem anderen Weg bestimmt werden, was als Lösung des „Phasenproblems“ bezeichnet wird.

Lösung des Phasenproblems

Zur Lösung des Phasenproblems kann die Patterson-Funktion verwendet werden, die nicht von den Phasen abhängig ist:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F(h, k, l)|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw)$$

Diese Funktion kann als eine Darstellung von interatomaren Distanzvektoren angesehen werden, die alle von einem Ursprung ausgehen. Daher entspricht die Symmetrie der Patterson-Dichte der Elektronendichte, wenn man alle translatorischen Symmetrieelemente außer acht lässt. Wegen der möglichen Umkehrung der Distanzvektoren enthält die Patterson-Dichte ein Inversionszentrum. In bestimmten Bereichen dieser Dichtekarte kommt es durch kristallographische Symmetrieoperationen zu einer Häufung von Distanzvektoren. Diese Bereiche nennt man Harker-Ebenen.

Da Proteine aus einer Vielzahl von Atomen aufgebaut sind ist es unmöglich aus der Anordnung von Patterson-Vektoren auf die Proteinstruktur zu schließen und so ein erstes Molekülmodell zu generieren. Es ist allerdings möglich, aus Patterson-Karten von Substrukturen, die beispielsweise Schweratome enthalten, Phaseninformation für die Proteinstruktur abzuleiten: SIR (isomorpher Ersatz), MIR (multipler isomorpher Ersatz), MAD (multiple anomale Dispersion). Außerdem können experimentelle Patterson-Dichten mit theoretischen Dichten verglichen werden, um ein Modell so zu platzieren,

dass daraus initiale Phasen berechnet werden können (MR, *molecular replacement*). Im Folgenden wird auf die beiden Methoden MR und MAD näher eingegangen, da sie in dieser Arbeit für die Strukturlösung verwendet wurden.

Anomale Streuung

Das Phänomen der anomalen Streuung kann für die Bestimmung der Phasen eines Proteinmoleküls genutzt werden. Wie oben erklärt, werden Röntgenbeugungsphänomene normalerweise durch Streuung an freien Elektronen beschrieben, wobei die gestreute Welle gegenüber dem Primärstrahl um 180° phasenverschoben ist. Diese Näherung gilt nicht mehr, wenn die Wellenlänge der eingestrahlten Röntgenstrahlung in der Nähe der Absorptionskante eines Elementes liegt. Dann ist der atomare Strukturfaktor nicht mehr länger eine reelle, sondern eine komplexe Zahl. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 8 für ein Strukturfaktorpaar dargestellt. Weder die Beträge der Strukturfaktoramplituden noch die Phasenwinkel von F_{hkl} und F_{-h-k-l} sind identisch. Aus den Amplitudendifferenzen dieser Reflexe kann deshalb eine Patterson-Dichte berechnet werden, aus der sich wiederum ein Modell errechnen lässt, das alle bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome enthält.

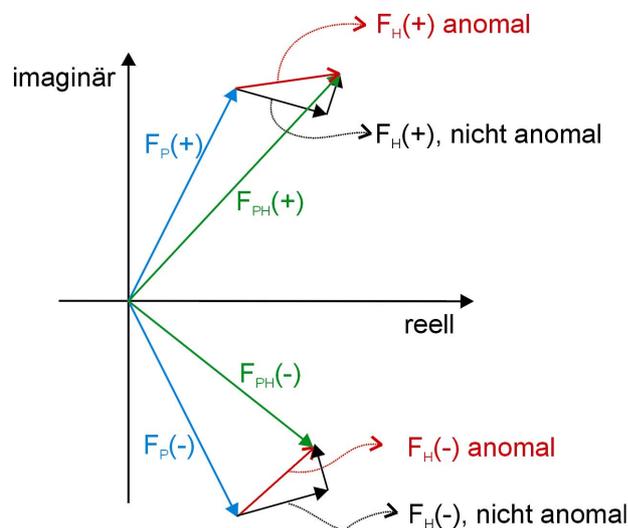


Abbildung 8: Strukturfaktorvektoren bei anomaler Streuung. Wenn anomale Streuung auftritt, gilt das Friedel'sche Gesetz nicht mehr. Im Falle der kohärenten Streuung wären $F_{PH}(+)$ und $F_{PH}(-)$ identisch. Das Streuen in der Nähe einer Absorptionskante führt jedoch zu einer Phasenverschiebung der atomaren Strukturfaktoren des Schweratoms, die zu verschiedenen Längen der Strukturfaktorvektoren Bijvoet-Paare) des schweratomhaltigen Proteins führt, wodurch sich unterschiedliche Phasenwinkel für $F_{PH}(+)$ und $F_{PH}(-)$ ergeben.

Durch eine Harker-Konstruktion (Abbildung 9) können nun die initialen Phasenwinkel für das Protein bestimmt werden.

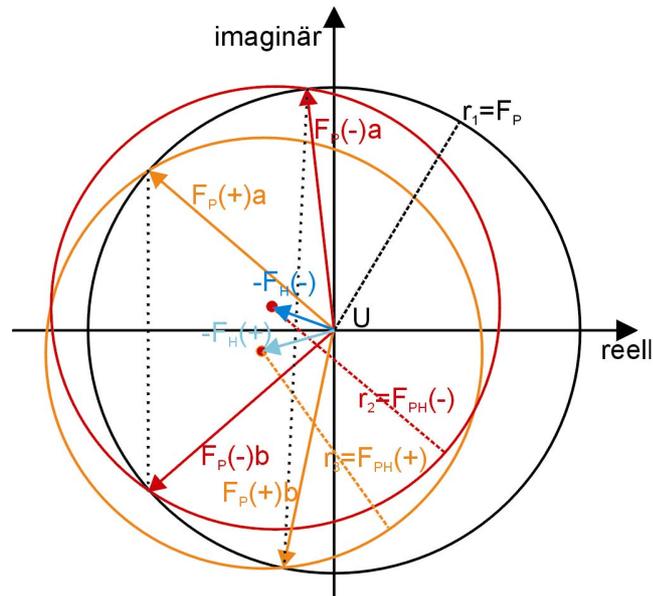


Abbildung 9: Harker-Konstruktion für ein MAD-Experiment. Um den Ursprung U wird ein Kreis mit dem Radius F_p gezeichnet, auf dem das Ende des Strukturfaktorvektors F_p liegen muss. Nun zeichnet man einen Kreis mit dem Radius $F_{PH}(-)$, dessen Ursprung um $-F_H(-)$ versetzt ist. Die beiden Schnittpunkte der Kreise veranschaulichen zwei mögliche Phasenwinkel für $F_p(-)$. Um den korrekten Phasenwinkel zu finden, zeichnet man einen weiteren Kreis mit dem Radius $F_{PH}(+)$, der relativ zum Ursprung um $-F_H(+)$ verschoben ist und erhält nun zwei mögliche Phasenwinkel für $F_p(+)$. Das bezüglich der x-Achse spiegelsymmetrische Paar von möglichen F_p ergibt die korrekte Proteinphase für diesen Reflex.

Molekularer Ersatz

Bei der Methode des Molekularen Ersatzes (*molecular replacement*, MR) benötigt man ein Strukturmodell mit ausreichend hoher struktureller Ähnlichkeit zu dem untersuchten Protein (Hoppe, 1957; Huber, 1965; Rossman, 1962). Aus dem Modell wird eine Patterson-Dichte berechnet, die dann mit der experimentellen Patterson-Dichte verglichen wird. Bei einer guten Übereinstimmung von intramolekularen Differenzvektoren (d. h. Patterson-Vektoren im Bereich der erwarteten Molekülgröße) kann man von einer korrekten Orientierung des Modells bezüglich der untersuchten Zelle ausgehen. Das richtig orientierte Modell muss dann durch eine Realraumsuche der Translation, eine Analyse der Harker-Ebenen oder durch die Korrelationsuche von intermolekularen Patterson-Vektoren (Vektoren mit größerer Länge als die erwartete Molekülgröße) erfolgen.

Kristallisation

Bei der Kristallisation von Proteinen wurden sowohl die Dampfdiffusionsmethode als auch die Dialyse angewandt. Zur Kristallisation der IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten wurden 5 µl bzw. 10 µl der Fc-Fragment-Lösung (10 mg/ml in PBS-Puffer) gegen 20 ml 20 mM MES/TRIS Puffer bei pH 6, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0 und pH 9.0 bzw. gegen destilliertes Wasser bei einer Temperatur von 4 °C dialysiert. Es wurden dazu 5 µl bzw. 10 µl Mikrodialyse-Zellen von Hampton (Hampton Research, Laguna Hills) verwendet, die mit einer Dialysemembran (*molecular cut-off* 1 kDa) verschlossen wurden. Die Dialyse als Kristallisationsverfahren beruht darauf, dass die Löslichkeit von Proteinen im Allgemeinen abnimmt, wenn die Salzkonzentration ausgehend von physiologischen Bedingungen (z. B. PBS-Puffer) sinkt. Bei der Dialyse eines in PBS-Puffer gelösten Proteins gegen eine gepufferte Lösung ohne Salz nimmt die Ionenstärke der Proteinlösung langsam ab. Da nun zunehmend Gegenionen für die Abschirmung der eigenen Ionenladungen fehlen (Umkehrung des *Einsalzeffektes*) wirken zunehmend geladene Bereiche an der Proteinoberfläche von benachbarten Molekülen als Gegenionen, was zur Bildung von amorphen Aggregaten, gegebenenfalls aber auch zur Kristallisation führt.

Bei der Kristallisation des nativen Fc-Fragmentes und von cMm-CNS wurde außerdem die Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1990) angewandt. Dabei kommt es in einem abgeschlossenen Volumen zur Einstellung eines Gasphasengleichgewichtes zwischen einer Reservoirlösung (0.2 - 1 ml) und einem Tropfen (2 - 10 µl), der das Protein enthält. Der Tropfen kann entweder an einem silikonisierten Deckgläschen über der Reservoirlösung hängen (Methode des „hängenden Tropfens“) (Limbro-Platten, ICN, Eschwege) oder auf einer Erhöhung oberhalb des Reservoirs liegen (Methode des „sitzenden Tropfens“) (CrysChem-Platten, Charles Supper Company, Natick, USA). Eine geeignete Startbedingung für die Kristallisation wurde mit einem sogenannten *incomplete factorial*-Ansatz gefunden, bei dem aus einem vieldimensionalen Raum der Lösungszusammensetzung gleichmässig gestreute Proben als Startbedingung für die Kristallisation genommen wurden.

Der nach diesem Prinzip aufgebaute kommerziell erhältliche *Hampton-Crystal-Screen* wurde verwendet, um eine geeignete Startbedingung für die Kristallisation zu finden. Eine gefundene Startbedingung kann durch das Variieren der enthaltenen Komponenten,

aber auch durch das Zusetzen verschiedener Additive wie Salze, Detergenzien, PEG oder Glycerin, sowie durch Variation der Temperatur (4 - 36 °C), der Tropfengröße oder des Mischungsverhältnisses aus Proteinlösung und Reservoirlösung optimiert werden. Eine weitere Möglichkeit, das Kristallwachstum zu initiieren oder zu optimieren ist das *microseeding*. Dabei überträgt man mit Hilfe eines Haares Kristallisationskeime von der Kristalloberfläche eines bestehenden Kristalls desselben Proteins in den Tropfen eines equilibrierten Kristallansatzes, was zur Nukleation und damit zur Entstehung von Kristallen führt.

3.2.3 Einfrieren von Proteinkristallen bei 100 K

Ein häufig auftretendes Problem bei der Messung von Proteinkristallen bei Raumtemperatur ist die Zerstörung des Proteinkristalls durch Wasserradikale. Sie entstehen durch die energiereiche Röntgenstrahlung im Kristall und reagieren mit dem Protein, was zu Veränderungen im Kristallgitter, zur Verschlechterung der Röntgenbeugungsdaten und im schlimmsten Fall zur Zerstörung des Kristallgitters führt. Um Strahlenschäden zu verhindern, wurden die Kristalle während der Messungen mit Hilfe eines Stickstoffstroms (Oxford Cryosystems, Oxford, UK) auf 100 K gekühlt, wodurch die Bewegungsfreiheit der Wasserradikale stark eingeschränkt wird. Da Proteinkristalle zu einem großen Teil aus Wasser bestehen, führt das direkte Einfrieren eines Proteinkristalls zur Entstehung von Eiskristallen. Als Folge erscheinen Ringe im Diffraktionsbild des Proteinkristalls, welche die Datenauswertung erschweren oder unmöglich machen. Um eine Eisbildung während des Einfrierens zu verhindern, werden die Kristalle vorher mit einem Kryoloop durch einen Kryopuffer gezogen, in dem Kryoprotektantien, wie Glycerin, Ethylenglycol oder kurzkettige Polyethylenglycole (z.B. PEG400) in geeigneter Konzentration enthalten sind. Alternativ kann auch der gesamte Kristall vor dem Einfrieren in ein synthetisches Öl wie Perfluoropolyether überführt werden.

3.2.4 Datensammlung und Datenreduktion

Die zur Strukturlösung der einzelnen Fc-Glykosylierungsvarianten und von cMm-CNS verwendeten Daten stammen von jeweils einem Kristall, der während der Datenaufnahme um 90 ° und pro Bild um 1 ° bzw. 0.5 ° gedreht wurde.

Für die Aufnahme der Datensätze wurde entweder ein *image plate*-Detektorsystem (MAR research, Hamburg) oder ein 135 mm MAR-CCD-Detektor (MAR research, Hamburg) verwendet. Die monochromatische CuK α -Röntgenstrahlung (1.5418 Å) wurde von einem RU200 Drehanodengenerator (Rigaku) erzeugt, der bei 50 kV und 100 mA betrieben wurde. Die Röntgenstrahlung bei den Wellenlängen 1.00590 Å, 1.00850 Å und 0.95000 Å wurde am DESY (Hamburg) erzeugt. Alle Daten wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski, 1996) integriert und skaliert. Für die Formatierung der Daten und die Strukturfaktorberechnung wurden die Programme S2MTZ, TRUNCATE und MTZ2VARIOUS aus dem CCP4-Paket verwendet (CCP4, 1994).

3.2.5 Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Die Kristallstruktur der Fc-Glykosylierungsvarianten wurde durch die Patterson-Suchmethode (MR) gelöst. Dabei wurde das Programm AMoRe (Navaza, 1994) verwendet. Als Suchmodell diente die Struktur des IgG1-Fc-Fragmentes (Deisenhofer, 1981) (PDB-Eintrag: 1FC1).

Zu Beginn der Verfeinerung wurde eine *rigid body*-Routine aus dem CNS-Programmpaket (Brünger et al., 1998) angewandt, wobei die einzelnen C γ 2- und C γ 3-Domänen als individuelle rigide Domänen behandelt wurden. Die atomaren Proteinmodelle wurden daraufhin mit dem Programm MAIN an die berechnete Elektronendichte angepasst. Danach wurden die Modelle mit dem Programm CNS (Brünger et al., 1998) verfeinert. Als Zielfunktion wurde der kristallographische R-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter (Engh, 1991) berücksichtigt wurden. Bei der Verfeinerung der Molekülmodelle wurden den NCS-verwandten Atomen in der asymmetrischen Einheit Einschränkungen der Positionen und Temperaturfaktoren auferlegt.

Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerung zu haben, wurden 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als sogenannter Test-Satz nicht in die Verfeinerung einbezogen (Brünger, 1992). Der aus dem Test-Satz berechnete freie R-Faktor (R_{free}), der im Allgemeinen 5 % höher ist, als der kristallographische Arbeits-R-Faktor (R_{work}), verhindert dabei eine Überverfeinerung des Modells. Die Energieminimierung des Atommodells wurde abwechselnd mit der visuellen Inspektion der Elektronendichte und dem manuellen Einpassen der Aminosäurereste durchgeführt. Danach wurden mit dem Programm CNS Wassermoleküle automatisch eingebaut und anschließend manuell überprüft.

Im Anschluss an eine weitere Koordinatenverfeinerung wurden für die bis 2.4 Å aufgelösten Fc-Glykosylierungsvarianten individuelle Temperaturfaktoren verfeinert. Dabei wurden zu Beginn Einschränkungen für direkt verknüpfte Atome und für die über einen Winkel verknüpften Atome jeweils für Haupt- und Seitenketten auferlegt. Die Zielwerte der Standardabweichung der Temperaturfaktoren betragen dabei für direkt verknüpfte Atome 1.5 σ (Hauptkette) und 2.0 σ (Seitenkette) und für Atome, die zwei Bindungen voneinander entfernt lagen, 2.0 σ (Hauptkette) und 2.5 σ (Seitenkette).

Zur Phasenbestimmung für die cMm-CNS-Struktur wurden MAD-Techniken angewandt. Vier Quecksilberatome konnten mit dem Programm SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) in der asymmetrischen Einheit lokalisiert werden. Die erhaltenen Schwermetallpositionen wurden direkt für die Berechnung von initialen Phasen verwendet (SHARP). Anschließend wurde eine Dichtemodifikation mit dem Programm SOLOMON (de La Fortelle and Bricogne, 1997) durchgeführt. In die resultierende experimentelle Elektronendichte konnten mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) drei Monomere der cMm-CNS eingebaut werden, die zur asymmetrischen Einheit gehören. Die Dichte für das vierte, zur asymmetrischen Einheit gehörenden Monomers war zu schlecht, um Aminosäurereste einzubauen. Daher wurde das vierte Monomer durch die Anwendung eines bekannten NCS-Symmetrieoperators positioniert. Die quecksilberhaltige cMm-CNS-Struktur wurde gegen den *remote*-Datensatz mit einer *rigid body*- und einer *positional*-Routine des Programmpaketes CNS (Brünger et al., 1998) verfeinert. Während der Verfeinerung wurden den Aminosäuren 46-49, 64-89, 96-108, 127-128, 139-159, 167-176, 208-222 und 231-237 NCS-Beschränkungen auferlegt. Starke NCS-Beschränkungen wurden auf die Atome in der Hauptkette und schwächere

auf die Atome in den Seitenketten angewandt. Nach mehreren aufeinanderfolgenden Modellbau- und Verfeinerungszyklen, wurden individuelle B-Faktoren verfeinert. In die positive $F_o - F_c$ -Elektronendichte, die in zwei aktiven Zentren zu finden war, wurde anschließend das energieminierte Produkt CMP-Neu5Ac (SYBYL, Tripos Inc.) eingebaut, das mit dem Protein co-kristallisiert wurde. Die Lage der Aminosäuren im Proteinmodell wurde durch eine *simulated annealing composite omit map* validiert. Nach dem automatischen Einbau von Wassermolekülen und deren manueller Überprüfung wurden finale R_{work} - und R_{free} -Faktoren von 21.7 % und 28.3 % erreicht.

Da man von einer Beeinflussung der aktiven Zentren durch die eingelagerten Quecksilberatome in der schwermetallderivatisierten Molekülstruktur ausgehen musste, wurde zusätzlich die ungestörte native Struktur der cMm-CNS gelöst. Dabei wurden die Modellphasen der schwermetallderivatisierten Struktur verwendet. Die Verfeinerung wurde nach einem ähnlichen Schema durchgeführt wie oben beschrieben.

3.2.6 Analyse von Atommodellen

Die statistische Analyse der Bindungslängen und -winkel sowie der Temperaturfaktoren der atomaren Modelle wurde mit dem Programm CNS Version 1.1 (Brünger et al., 1998) durchgeführt. Weitergehende Untersuchungen der Molekülgeometrien, insbesondere die Erstellung der Ramachandran-Plots, erfolgten mit dem Programm PROCHECK Version 2.0 (Laskowski, 1993).

Zur Analyse von Unterschieden zwischen verschiedenen Strukturen aber auch zwischen verschiedenen Monomeren oder Domänen in einer Struktur, wurden die strukturell konservierten Sekundärstrukturelemente mit dem Programm LSQMAN (Kleywegt, 1999) überlagert und die r.m.s.d.-Werte minimiert.

Potentielle Phosphorylierungsstellen der cMm-CNS wurden mit dem Programm NetPhos identifiziert (Blom et al., 1999).

3.2.7 Graphische Darstellungen

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1993) und Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.ch/spdbv>) benutzt. Oberflächen wurden mit den Programmen Swiss-

PdbViewer und WinMegaPov (<http://nathan@kopp.com>) berechnet und dargestellt. Zur graphischen Bearbeitung von Bildern wurde das Programm CorelDRAW 8.0 (Corel Corporation Limited, 1998) verwendet.

3.2.8 Eintrag in die Proteindatenbank

Die Koordinaten der Fc-Glykosylierungsvarianten (MN2F)₂, (M3N2F)₂, (G0F)₂, (G2F)₂ (in den Raumgruppen P2₁2₁2₁ und C222₁) und des nativen Fc-Fragmentes (nati) sind in der RCSB-Protein-Daten-Bank mit den PDB-Einträgen 1H3T, 1H3U, 1H3X, 1H3V, 1H3W und 1H3Y hinterlegt. Die Koordinaten der cMm-CNS sind noch nicht in der RCSB-Proteindatenbank hinterlegt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Die Kristallstruktur von IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten

4.1.1 Nomenklatur der IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten

Die Nomenklatur für die humanen IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten, die kristallisiert wurden, ist nicht einheitlich. Dennoch wurden die originalen Namen verwendet, um die Konsistenz mit früheren Veröffentlichungen beizubehalten. In Tabelle 1 und Abbildung 10 sind die Namen der Glykosylierungsvarianten und die Anzahl der enthaltenen Zucker zusammengefasst. Die tiefgestellte „2“ in den Namen der Fc-Glykosylierungsvarianten verweist darauf, dass das Fc-Fragment ein Homodimer aus zwei gleichen Proteinketten mit identischer Glykosylierung darstellt. Die folgenden Fc-IgG1-Glykosylierungsvarianten wurden kristallisiert: (G2F)₂, eine verzweigte digalactosylierte und fucosylierte Fc-Glykosylierungsvariante (Mimura et al., 2000; Mimura et al., 2001); (G0F)₂, eine verzweigte, fucosylierte, nicht-galactosylierte Fc-Glykosylierungsvariante; (M3N2F)₂, eine verzweigte Fc-Glykosylierungsvariante mit fucosyliertem Pentasaccharid-Stamm; (MN2F)₂, eine unverzweigte Fc-Glykosylierungsvariante mit fucosyliertem Trisaccharid-Stamm.

Tabelle 1: Zusammenstellung der kristallisierten humanen IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten

Glykosylierungs- variante	Anzahl der Monosaccharide pro Fc-Kette	enthaltene Monosaccharide
(MN2F) ₂	4	Fuc, 2 GlcNAc, Man
(M3N2F) ₂	6	Fuc, 2 GlcNAc, 3 Man
(G0F) ₂	8	Fuc, 4 GlcNAc, 3 Man
(G2F) ₂	10	Fuc, 4 GlcNAc, 3 Man, 2 Gal
nativ (Hochsalz)	8 - 12	Fuc, 4 GlcNAc, 3 Man, 2 Gal, 2 Neu5Ac

F = Fuc = Fucose, G = Gal = Galactose, M = Man = Mannose, N = GlcNAc = *N*-Acetylglucosamin, Neu5Ac = 5-*N*-Acetylneuraminsäure (= Sialinsäure)

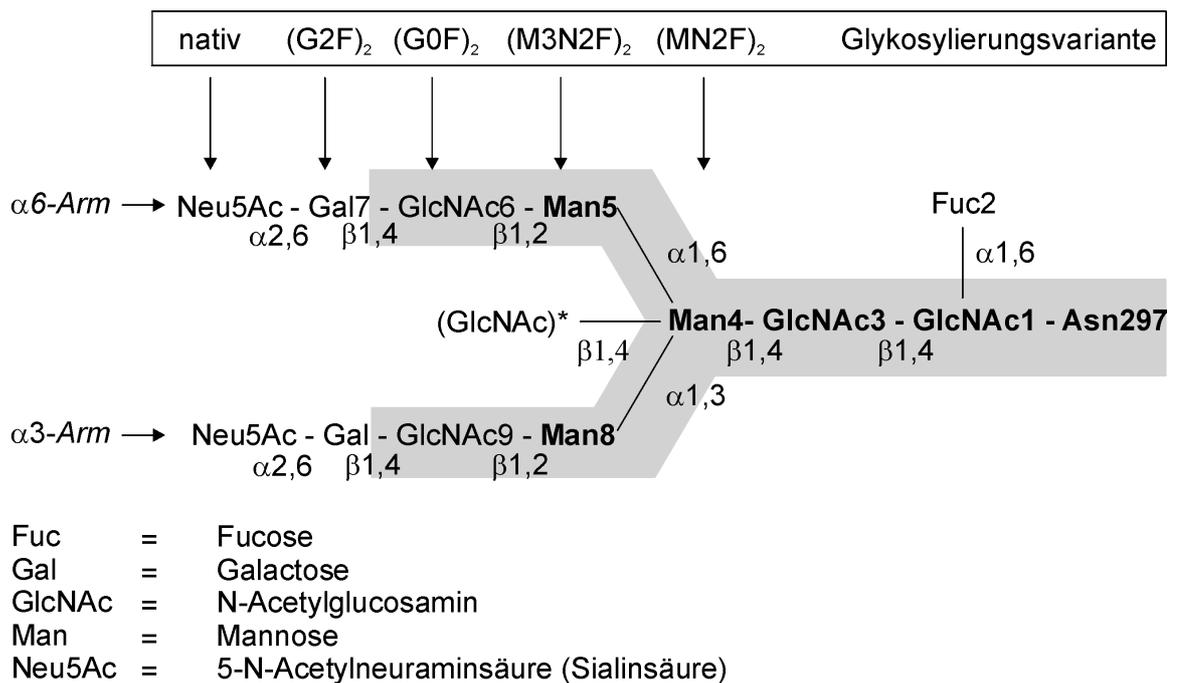


Abbildung 10: Kohlenhydratstruktur, die N-glykosidisch mit Asn297 des humanen IgG1-Fc verknüpft ist. Nur solche Zucker, die in der Elektronendichte sichtbar sind, wurden nummeriert. Die grau hinterlegten Zucker gehören zum Kohlenhydratstamm, der mit allen natürlich vorkommenden Antikörpern assoziiert ist. Die restlichen Zucker können in ihrer Art variieren. Die zwei Arme der verzweigten Kohlenhydratstruktur werden entsprechend der glykosidischen Bindung am Verzweigungspunkt Man4 als $\alpha 3$ - bzw. $\alpha 6$ -Arm bezeichnet. Zu einem geringen Anteil trägt natürliches IgG am Verzweigungspunkt Man4 ein zusätzliches GlcNAc*. Im IgG1-(Cri, Allotyp G1m(f)), das für die Herstellung der kristallisierten Fc-Glykosylierungsvarianten verwendet wurde, kommt dieses GlcNAc* nicht vor. Die vertikalen Pfeile zeigen auf die Enden der verschiedenen Glykosylierungsvarianten, die, ausgehend vom nativen Fc-Fragment, durch enzymatische Verkürzung der Kohlenhydratketten hergestellt wurden.

4.1.2 Analyse der Reinheit von IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten

Die Aminosäuresequenz der hergestellten Fc-Fragmente reicht von Thr225 bis Ala444. Die einzelnen Glykosylierungsvarianten enthalten zwischen vier und zwölf Monosaccharid-Einheiten pro Polypeptidkette (Tabelle 1).

Die Homogenität der IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten wurde durch massenspektrometrische Untersuchungen und SDS-Gelelektrophorese überprüft. Als Beispiel ist das Massenspektrogramm des komplett deglykosylierten Fc-Fragmentes gezeigt (Abbildung 11a). Die ermittelte Molekularmasse von 50.4120 kDa stimmt gut mit der errechneten Masse von 50.4112 kDa überein. Die Homogenität der übrigen Fc-Glykosylierungsvarianten wurde ebenfalls durch Massenspektrometrie belegt (Mimura, 2001, Daten nicht gezeigt). Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) des nativen Fc-Fragmentes und von drei Fc-Glykosylierungsvarianten zeigt, dass sich die

Kettenlänge der Kohlenhydrate auf das Laufverhalten der Fc-Glykosylierungsvarianten auswirkt. Je kürzer die Kohlenhydratkette ist, desto größer ist die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel (Abbildung 11b).

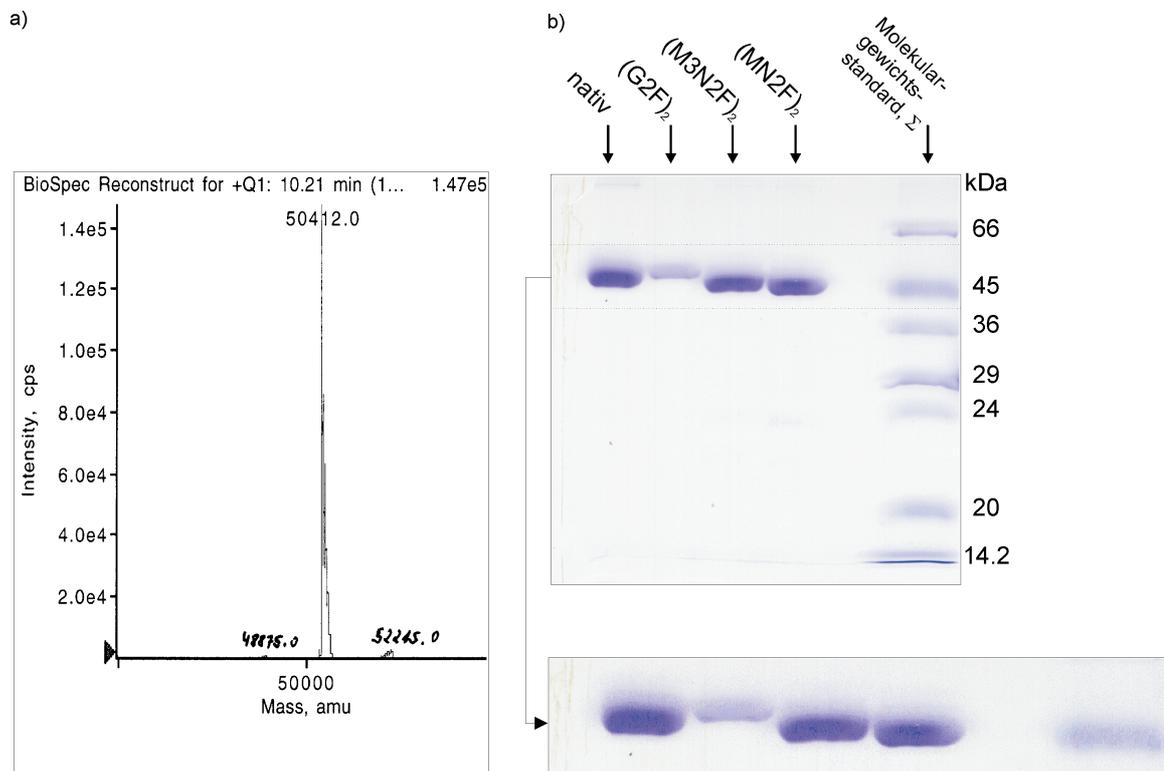


Abbildung 11: a) Massenspektrum des komplett deglykosylierten Fc-Fragmentes. b) Nichtreduzierende 12.5 % SDS-PAGE verschiedener Fc-Glykosylierungsvarianten. In der Vergrößerung der Proteinbanden ist deutlich zu sehen, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Fc-Fragmente von der Länge der Kohlenhydratketten abhängig ist.

4.1.3 Kristallisation

Die erste Strukturbestimmung eines IgG-Fc-Fragmentes gelang Huber und Deisenhofer (Deisenhofer et al., 1976; Huber et al., 1976). Die verwendeten Kristalle wurden durch die Dialyse einer 1 %igen IgG-Fc-Lösung in 0.5 M NaCl gegen eine 0.03 M NaCl-Lösung bei pH 6.5 bis pH 7.0 hergestellt. Diese Technik konnte auch für die Kristallisation von IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten angewandt werden. Als beste Kristallisationsbedingung für alle Fc-Glykosylierungsvarianten stellte sich die Dialyse gegen destilliertes Wasser bei 4 °C heraus. Dabei entstanden nach zwei Tagen Proteinkristalle (30 µm x 60 µm x 100 µm), die für die Datenaufnahme verwendet wurden (Abbildung 12).

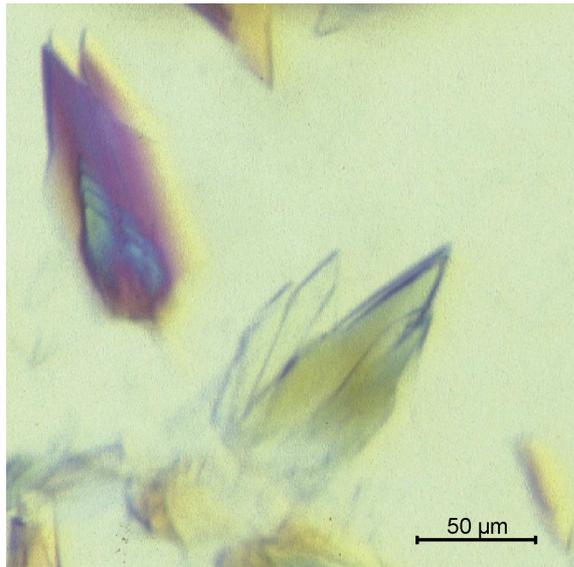


Abbildung 12: Orthorhombische Proteinkristalle der Glycovariante (G2F)₂ (P2,2,2).

Die Anwendung der Dampfdiffusionsmethode zur Kristallisation des nativen Fc-Fragmentes (Hochsalz) führte nach sechs Monaten zu hexagonalen Kristallen. Für die entsprechenden Kristallansätze wurden 2 μ l Proteinlösung mit 1 μ l Reservoir-Lösung (0.1 M Na-Acetatpuffer, pH 4.5, 2 M NaCl) gemischt und nach dem Verfahren des „sitzenden Tropfens“ bei 18 °C gegen das Reservoir äquilibriert.

Außerdem wurde versucht, ein vollständig deglykosyliertes IgG1-Fc-Fragment zu kristallisieren. Dieses deglykosylierte Fc-Fragment konnte nicht unter der Bedingung kristallisiert werden, die bei den anderen Fc-Glykosylierungsvarianten Anwendung fand. Daraufhin wurde mit einem *incomplete factorial screen* nach neuen Kristallisationsbedingungen für das deglykosylierte Fc-Fragment gesucht, was aber nicht zum Erfolg führte. Ein Grund dafür, dass das vollständig deglykosylierte Fc-Fragment keine Kristalle ergab, könnte darin liegen, dass die C γ 2-Domänen fehlgeordnet sind oder alternative Konformationen einnehmen, weil sie nicht mehr von den Kohlenhydratketten stabilisiert werden.

Vor dem Einfrieren der Fc-Glykosylierungsvarianten wurden die Kristalle für jeweils 20 Sekunden in 10 %ige und 15 %ige wässrige Lösungen von (2-R, 3-R)-Butan-2,3-diol eingelegt, um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern. Für das Einfrieren der Fc-Glykosylierungsvariante (G0F)₂ wurde eine 20 %ige wässrige Glycerol-Lösung verwendet.

4.1.4 Bestimmung der Raumgruppe und der Zellkonstanten

Alle Fc-Glykosylierungsvarianten, die im Dialyseverfahren kristallisiert wurden, wiesen die orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12_1$ auf. Durch die Analyse von seriellen Auslöschungen auf den $h00$ -, $0k0$ - und $00l$ - Achsen konnten die Schraubenachsen in den Raumgruppen $P2_12_12_1$, $C222_1$ und $P6_122$ identifiziert werden. Die kristallographischen Daten der verwendeten Kristalle sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung der kristallographischen Daten

Glykosylierungs- variante PDB-Eintrag	Raum- gruppe	Kristallisa- tions Methode	Zellkonstanten [Å] Winkel [°]	R_{work} R_{free} [%]	Auflösung [Å]
(MN2F) ₂ 1H3T	$P2_12_12_1$	Dialyse H ₂ O	a = 49.57, b = 80.78, c = 139.65 $\alpha = \beta = \gamma = 90$	28.0 30.9	2.4
(M3N2F) ₂ 1H3U	$P2_12_12_1$	Dialyse H ₂ O	a = 49.48, b = 79.63, c = 143.86 $\alpha = \beta = \gamma = 90$	25.3 28.9	2.4
(G0F) ₂ 1H3X	$P2_12_12_1$	Dialyse H ₂ O	a = 49.69, b = 80.20, c = 138.96 $\alpha = \beta = \gamma = 90$	27.8 32.9	2.44
(G2F) ₂ 1H3V	$P2_12_12_1$	Dialyse H ₂ O	a = 49.47, b = 80.85, c = 141.75 $\alpha = \beta = \gamma = 90$	24.0 31.4	3.1
(G2F) ₂ 1H3W	$C222_1$	Dialyse H ₂ O	a = 49.55, b = 149.25, c = 75.75 $\alpha = \beta = \gamma = 90$	27.9 32.0	2.82
nativ (Hochsalz) 1H3Y	$P6_122$	Dampf- diffusion	a = 152.94, b = 152.94, c = 116.96 $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	29.2 35.2	4.1
nativ (1FC1)	$P2_12_12_1$	Dialyse H ₂ O	a = 80.40, b = 146.40, c = 50.40 $\alpha = \beta = \gamma = 90$	22.0 n.b.	2.9
Fc-Fc γ RIII 1E4K	$P6_122$	Dampf- diffusion	a = 115.32, b = 115.32, c = 299.10 $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	27.08 35.7	3.2

Molek. pro AU / Solv. Gehalt [%]	Zahl unab- hängiger Reflexe / Multiplizität	Vollständigkeit insgesamt / letzte Schale [%]	R_{merge} insgesamt / letzte Schale [%]	r.m.s.d. Bindun- gen [Å] / r.m.s.d. Winkel [°]	B-Faktor insgesamt [Å ²]
1 / 55	21295 / 4	98.1 / 93.4	6 / 20	0.008 / 1.5	45
1 / 55	22481 / 4	97.9 / 88.9	4.6 / 30.9	0.007 / 1.4	50
1 / 55	19885 / 3.2	93.6 / 72.8	7.4 / 41.2	0.008 / 1.4	51
1 / 54	8183 / 2	82.8 / 81.8	13.1 / 38.4	0.009 / 1.5	32
0.5 / 77	6718 / 2	97.5 / 75.6	8.2 / 53.8	0.008 / 1.4	50
4 / 67	5219 / 3	80.0 / 67	18.1 / 25.5	0.014 / 2.0	30
1 / 54	10342 / 2	75 / 37	7.7 / n.b.	0.007 / 1.7	30
1 / 67	18596 / 3.4	94.9 / 66.8	13.3 / 60.7	0.016 / 2.2	95

4.1.5 Strukturlösung

Die Struktur der verschiedenen IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten wurde durch MR-Methoden (*molecular replacement*) gelöst. Als Suchmodell wurde die Struktur des

nativen IgG1-Fc-Fragmentes (PDB-Eintrag:1FC1) verwendet (Deisenhofer et al., 1976; Huber et al., 1976).

In der Raumgruppe $C222_1$ wurde in der asymmetrischen Einheit nur die Hälfte eines Fc-Fragmentes gefunden, dementsprechend liegt eine kristallographische Symmetrie zwischen den beiden Polypeptidketten des IgG1-Fc-Fragmentes vor. Für die Orientierung und Positionierung des Suchmodells in den Raumgruppen $P6_122$ und $C222_1$ wurde das Programm AMoRe (Navaza, 1994) verwendet. Dabei wurden Daten im Auflösungsbereich von 20 Å bis 4 Å einbezogen. Für beide Raumgruppen ergab die Rotationssuche eine klar abgehobene Lösung, die nach einer anschließenden Translationssuche zur korrekten Positionierung der Suchmodelle in den kristallographischen Zellen führte. Die Analyse von intermolekularen Kontakten im Kristallgitter bestätigte die Richtigkeit der MR-Lösung.

Für alle Daten in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ konnte das Suchmodell mit einer *rigid body*-Routine (Brünger et al., 1998) in der kristallographischen Zelle positioniert werden, da die betreffenden Fc-Glykosylierungsvarianten in derselben Raumgruppe wie das Suchmodell (PDB-Eintrag: 1FC1) kristallisierten und die Kristalle sehr ähnliche Zelldimensionen aufwiesen (Tabelle 2).

4.1.6 Modellbau und Verfeinerung

Unabhängig von der Raumgruppe der verschiedenen Fc-Glykosylierungsvarianten ergaben sich bei der Verfeinerung der Strukturen relativ hohe R-Faktoren (Tabelle 2). Diese Daten sind konsistent mit den R-Faktoren, die für andere Fc-Fragmente und den Fc-Fc γ RIII-Komplex (Sondermann et al., 2000) erreicht wurden. Die Tatsache, dass Fc-Strukturen, die aus Kryo-Daten resultieren, höhere R-Faktoren aufweisen, als Fc-Strukturen, die aus Raumtemperatur-Daten resultieren (Deisenhofer, 1981) zeigt, dass beim Einfrieren der Kristalle Fehlorderungen im Kristallgitter auftreten.

Während der ersten Verfeinerungszyklen wurden keine Zuckerreste in das Modell aufgenommen, sondern erst in späteren Zyklen dem Modell hinzugefügt, sofern eine positive $F_o - F_c$ -Elektronendichte für die einzelnen Monosaccharide sichtbar wurde.

Die Geometrie der Strukturen wurde mit dem Programm PROCHECK überprüft. Über 85 % der Diederwinkel liegen in energetisch begünstigten Regionen. Die Reste Glu293 und Asn286, Ala287 und Thr289 liegen außerhalb der erlaubten Regionen (Abbildung

13), was durch vorhandene Kristallkontakte am *loop* um His285 und dem β -Strang mit Glu293 zu erklären ist. Teile dieses Abschnittes sind nur schlecht in der Elektronendichte definiert.

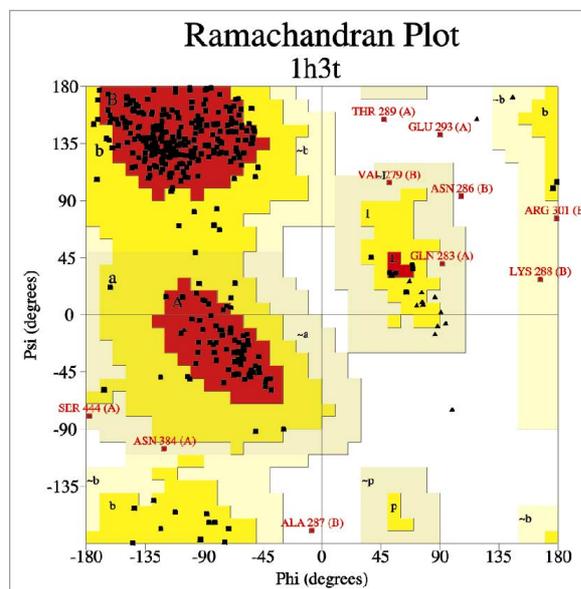


Abbildung 13: Ramachandran-Plot der verfeinerten Struktur der Fc-Glykosylierungsvariante (MN2F)₂ (PDB-Eintrag: 1H3T). Die Position eines Punktes im Diagramm ist durch den Φ -Winkel (Abszisse) und den Ψ -Winkel (Ordinate) einer Aminosäure festgelegt. Die energetisch begünstigten Regionen sind rot, die energetisch erlaubten Regionen gelb und die energetisch noch möglichen Regionen hellgelb dargestellt. Regionen in Weiss sind energetisch nicht erlaubt. Für Glycine (\blacktriangle) gelten aufgrund der fehlenden Seitenkette keine Beschränkungen. Außer den durch Kristallkontakte hervorgerufenen Symmetrieverletzungen befinden sich alle Aminosäuren (\blacksquare) außerhalb verbotener Bereiche. In der Region A liegen die Φ/Ψ -Winkel für α -helikale Sekundärstrukturelemente, in Region B die Φ/Ψ -Winkel für β -Faltblattstrukturen, in Region L die Winkel für linksgängige Helices und in Region P die für ϵ -Regionen.

4.1.7 Strukturbeschreibung von IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten

In den gelösten Strukturen von Fc-Glykosylierungsvarianten war der Rest Pro238 der erste und Leu443 der letzte Rest, der in der Elektronendichte definiert war. Vor dem Pro238 (N-terminal) befinden sich noch 13 Reste, die zur *hinge region* gehören und aufgrund ihrer Flexibilität in den Elektronendichtekarten nicht sichtbar sind.

Ein Strukturvergleich von IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten und dem nativen Fc-Fragment zeigt erwartungsgemäß dieselbe Topologie der IgG1-Faltungsdomänen C γ 2 und C γ 3 (Deisenhofer, 1981). Ähnlich wie C γ 3-Domänen setzen sich C γ 2-Domänen aus antiparallelen β -Faltblättern zusammen, die aus drei (A, B und E) bzw. vier (C, C', F und G) β -Strängen bestehen und sandwichartig zusammengelagert sind. Die Topologie der C γ 2-Domäne ist in Abbildung 14 dargestellt.

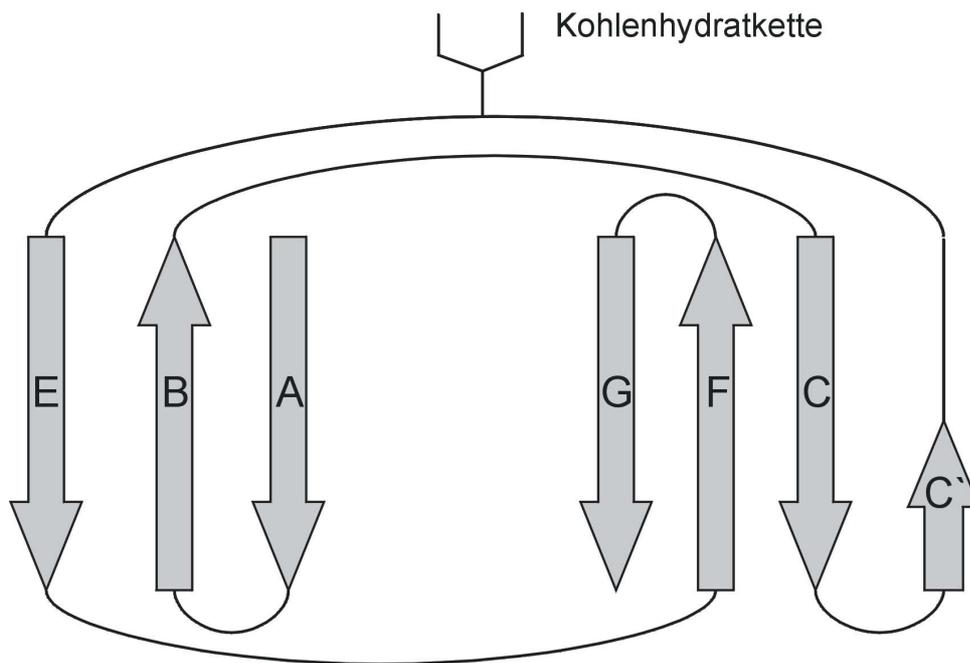


Abbildung 14: Topologie der IgG1-C γ 2-Domäne. Die beiden antiparallelen β -Faltblätter lagern sich sandwichartig zu einer IgG-Domäne zusammen.

In den Fc-Glykosylierungsvarianten (MN2F)₂ und (M3N2F)₂ sind alle Monosaccharide der Kohlenhydratketten in der Elektronendichte sichtbar. In der Elektronendichte des nativen Fc-Fragmentes (Hochsalz) und der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ konnten die Kohlenhydratketten bis zum Zuckerrest Gal7 im α 6-Arm und bis zum Zuckerrest GlcNAc9 im α 3-Arm verfolgt werden. Obwohl der Galactoserest im α 3-Arm sowohl in der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ als auch im nativen Fc-Fragment durch ESI-MS (Mimura et al., 2001) nachgewiesen wurde, konnte keine Elektronendichte für ihn gefunden werden, was auf die hohe Flexibilität dieses Zuckerrestes zurückzuführen ist. In den strukturell untersuchten Fc-Glykosylierungsvarianten haben die verkürzten Kohlenhydratketten ähnliche Positionen wie im nativen Fc-Fragment (Deisenhofer, 1981). So lagert sich der α 6-Arm der Kohlenhydratkette an die C γ 2-Domäne an, wo er in Richtung der C γ 2-C γ 3-Kontaktregion verläuft und vorwiegend Wechselwirkungen mit hydrophoben Resten der C γ 2-Domäne eingeht. Dagegen ragt der α 3-Arm in den Raum zwischen den C γ 2-Domänen hinein (Abbildung 15).

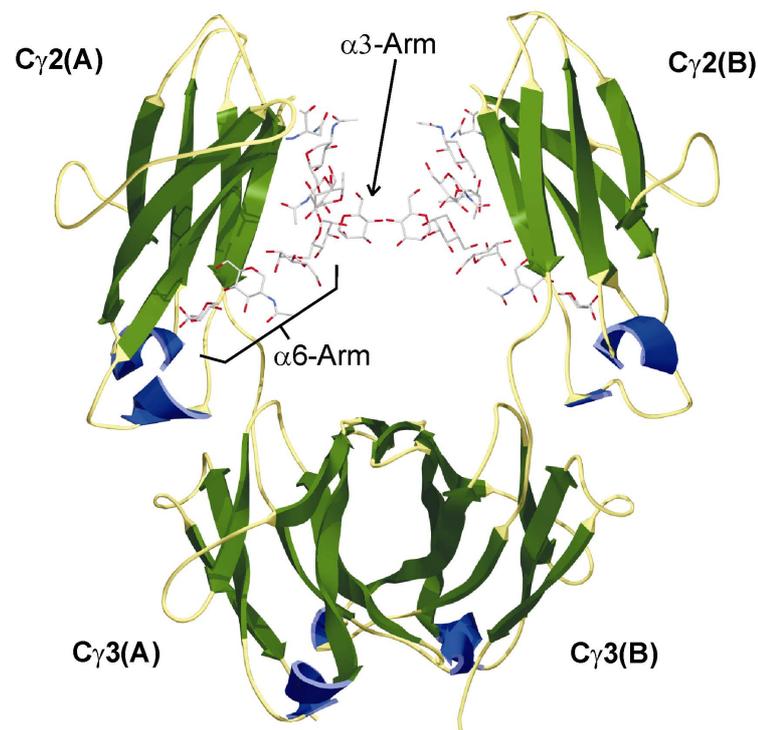


Abbildung 15: Fc-Fragment der Glykosylierungsvariante (G2F)₂. Die Kohlenhydratketten sind als Stäbchen-Modell dargestellt. β -Faltblattstrukturen sind in Grün und α -Helices in Blau dargestellt.

4.1.8 Einfluss der Glykosylierung auf den Öffnungszustand des Fc-Fragmentes

Die Überlagerung der Strukturen verschiedener Fc-Glykosylierungsvarianten, des nativen IgG-Fragmentes (Hochsalz) sowie des Fc-Fragmentes aus dem Komplex mit dem Fc γ RIII-Rezeptor zeigt deutlich, dass die beiden C γ 3-Domänen symmetrisch angeordnet sind und sich strukturell nicht unterscheiden. Die Verkürzung der Kohlenhydratkette hat also keinen Einfluss auf die Struktur der C γ 3-Domäne. Im Gegensatz dazu verändert sich die Position der gesamten C γ 2-Domäne relativ zur C γ 3-Domäne in verschiedenen Fc-Glykosylierungsvarianten. Die beobachteten strukturellen Unterschiede können als ein Neigen der C γ 2-Domäne um das Gelenk zwischen C γ 2- und C γ 3-Domäne beschrieben werden. Als Referenzpunkt für die Bestimmung der Positionen der C γ 2-Domänen in verschiedenen Fc-Glykosylierungsvarianten wurde der Aminosäurerest Pro329 gewählt, weil er in einem kurzen rigiden *loop* des Fc-Fragmentes liegt, der am weitesten von dem

C γ 2-C γ 3-Gelenk entfernt ist. Dort sind maximale Abweichungen der Positionen von C γ 2-Domänen zu beobachten (Tabelle 3, Abbildung 16, Abbildung 17).

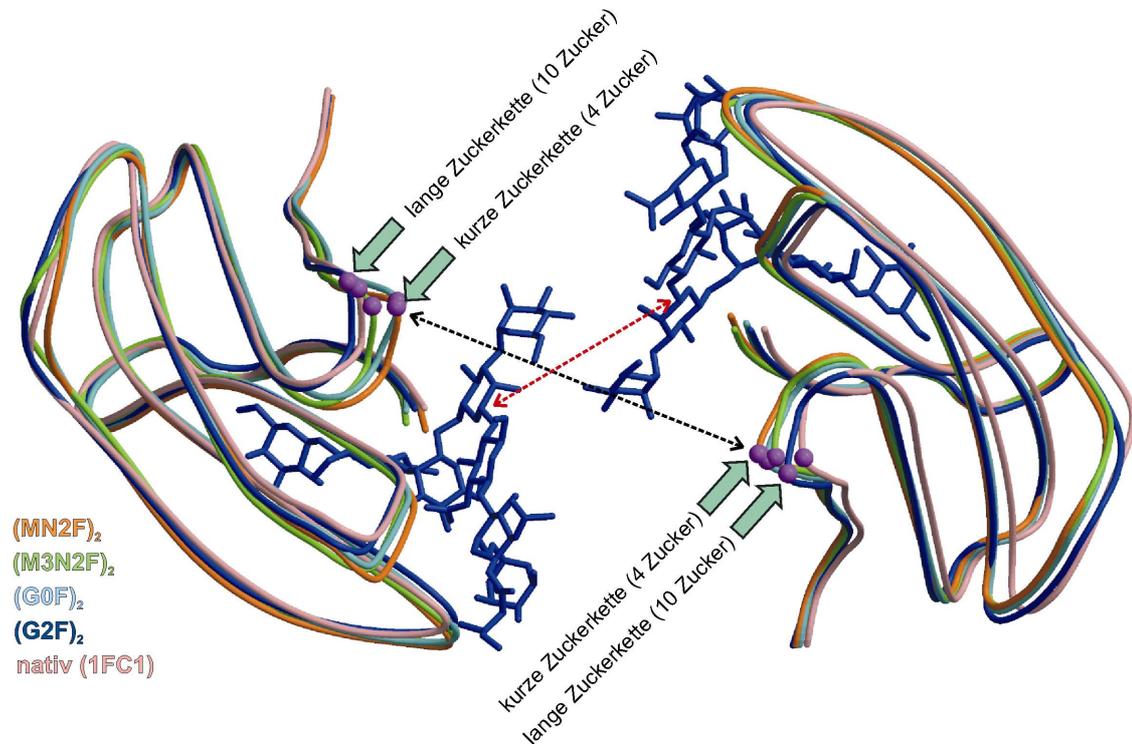


Abbildung 16: Abstände der C γ 2-Domänen und der assoziierten Kohlenhydratketten verschiedener Fc-Glykosylierungsvarianten. Die Reste Pro329 sind als violette Kugeln dargestellt. Die Kohlenhydratkette der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ (P2₁,2₁,2₁) ist exemplarisch dargestellt. Die gemessenen Abstände zwischen den C γ 2-Domänen sind mit einem schwarzen Pfeil und die Abstände zwischen den Man4-C1-Atomen der Kohlenhydratketten mit einem roten Pfeil dargestellt.

Tabelle 3: Abstände der C γ 2-Domänen verschiedener Fc-Glykosylierungsvarianten

Glykos. Variante (Raumgruppe)	Anzahl der Mono-saccharide pro Fc-Kette	Pro329-Abstand C γ 2(A) – C γ 2(B) [Å]	C1-Man4-Abstand C γ 2(A) – C γ 2(B) [Å]
(MN2F) ₂ (P2 ₁ ,2 ₁ ,2 ₁)	4	21.9	13.0
(M3N2F) ₂ (P2 ₁ ,2 ₁ ,2 ₁)	6	24.2	12.9
(G0F) ₂ (P2 ₁ ,2 ₁ ,2 ₁)	8	22.6	12.6
(G2F) ₂ (P2 ₁ ,2 ₁ ,2 ₁)	10	26.6	12.7
(G2F) ₂ (C222 ₁)	10	33.7	16.7
nativ (Hochsalz) (P6 ₁ ,22)	8 - 11	29.6	7.6
nativ (1FC1) (P2 ₁ ,2 ₁ ,2 ₁)	8 - 11	23.8	12.8
Fc-Fc γ R111 1E4K (P6 ₃ ,22)	8 - 11	30.3	16.0

Die Abstände der C γ 2-Domänen ergeben sich aus dem C α -Kohlenstoff-Abstand zwischen Pro329(A) und Pro329(B). Der Abstand der beiden Kohlenhydratketten wird durch den Abstand der C1-Atome von Man4(A) und Man4(B) definiert. Die native Fc-Struktur (Deisenhofer, 1981) (PDB-Eintrag: 1FC1) und das Fc-Fragment aus dem Fc-Fc γ R111-Komplex (Sondermann et al., 2000) wurden zusätzlich in den Strukturvergleich einbezogen.

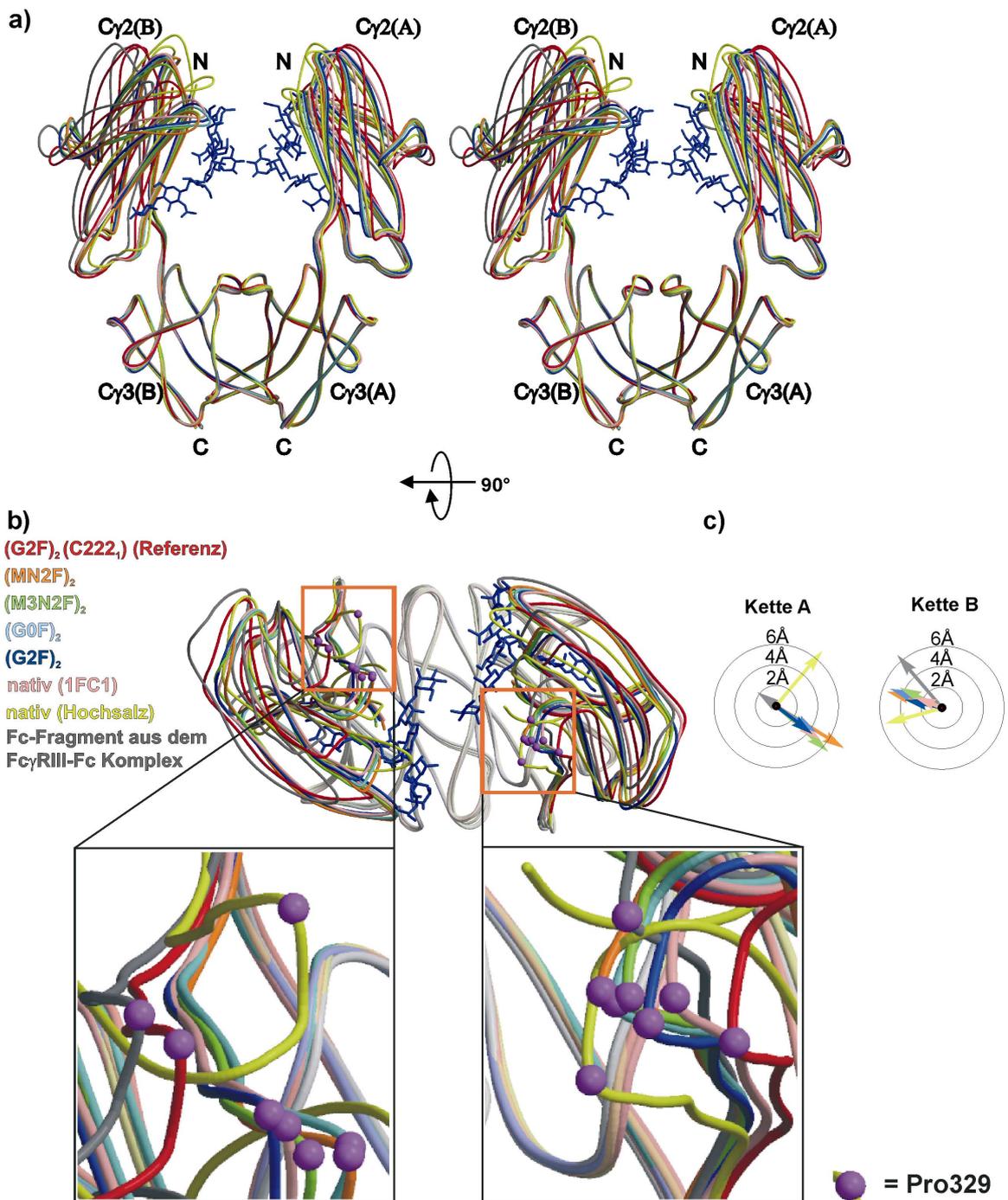


Abbildung 17: Überlagerung verschiedener Fc-Glykosylierungsvarianten. **a)** Stereo-Seitenansicht verschiedener überlagerter Fc-Glykosylierungsvarianten. Die C_γ3-Domänen der gezeigten Fc-Glykosylierungsvarianten wurden überlagert. Für die Glykosylierungsvariante (G2F)₂ in der Raumgruppe (P2₁2₁2₁) ist die Kohlenhydratkette dargestellt. Die unterschiedlichen Positionen der C_γ2-Domänen in den Strukturen resultierten aus den unterschiedlichen Neigungen der gesamten C_γ2-Domänen um das C_γ2-C_γ3-Gelenk. **b)** Aufsicht der überlagerten Strukturen. Die Reste Pro329 der C_γ2-Domänen verschiedener Fc-Glykosylierungsvarianten sind als Kugeln dargestellt. **c)** Die Pfeile in dem Vektordiagramm verlaufen von Pro329 der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ (C222₁) (Referenzstruktur) zu den Resten Pro329 aller anderen Strukturen und illustrieren, dass die gesamte C_γ2-Domäne durch das C_γ2-C_γ3-Gelenk große Bewegungsfreiheit hat.

Die Neigung der C γ 2-Domänen in verschiedenen Fc-Strukturen wird relativ zur Struktur der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ in der Raumgruppe C222₁ betrachtet, weil in dieser Struktur beide Ketten (A und B) über eine zweifache kristallographische Symmetrie in Beziehung stehen. Deshalb kann (G2F)₂ (C222₁) als Vergleichsstruktur zur Bestimmung der asymmetrischen Neigung der C γ 2-Domänen in den anderen Fc-Strukturen verwendet werden. Die Neigung der C γ 2-Domänen legt die Öffnung des hufeisenförmigen Fc-Fragmentes fest (Abbildung 17a), die mit einer Veränderung der Fc γ R-Bindungsstelle einhergeht (Abbildung 4). Die Auslenkung der C γ 2-Domänen (gemessen an der Pro329-Verlagerung) ist in Abbildung 17c als Diagramm dargestellt. Die Pro329-Position der symmetrischen Referenzstruktur (G2F)₂ (C222₁) definiert den Ursprung des Vektordiagramms, die Vektoren stellen Verschiebungen der C γ 2-Domänen dar. Im nativen Fc-Fragment (Hochsalz), weicht die C γ 2(B)-Domäne mehr als 6 Å von der Referenzstruktur ab, was durch besondere Kristallkontakte bedingt ist. Diese Umordnung resultiert in veränderten Zucker-Zucker-Kontakten zwischen den α 3-Armen gegenüberliegender Kohlenhydratketten. Während der gewöhnlich beobachtete Kontakt zwischen den beiden Kohlenhydratketten Man8(A)-Man8(B) (Abbildung 16, Abbildung 17a) nicht mehr existiert, sind neue Kontakte zwischen den Resten GlcNAc9(A) - Fuc2(B), GlcNAc9(A) - Man5(B), Man8(A) - Man5(B) und GlcNAc3(A) - Man8(B) zu beobachten.

Bei den Fc-Glykosylierungsvarianten, die bei niedriger Salzkonzentration kristallisiert wurden (Raumgruppe P2₁2₁2₁), sind nur relativ kleine Unterschiede in den C γ 2(A)-C γ 2(B)-Abständen (Abbildung 17, Tabelle 3) zu finden, die aber trotzdem einen Trend erkennen lassen. In der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ (P2₁2₁2₁), die eine lange Kohlenhydratkette trägt (10 Zuckerreste), wurde ein maximaler Abstand der C γ 2-Domänen (26.6 Å) gefunden. Demgegenüber wurde in der Glykosylierungsvariante (MN2F)₂ (P2₁2₁2₁), welche die kürzeste Kohlenhydratkette trägt (4 Zuckerreste), ein minimaler Abstand gemessen (21.9 Å). Dies bedeutet, dass die Verkürzung des α 3- und des α 6-Armes der Kohlenhydratkette eine gegenseitige Annäherung der C γ 2-Domänen um 4.7 Å erlaubt, was alternativ mit dem Schließen des hufeisenförmigen Fc-Fragmentes beschrieben werden kann. Die Glykosylierungsvarianten (G0F)₂ und (M3N2F)₂ mit Kohlenhydraten mittlerer Länge zeigen mittlere C γ 2(A) - C γ 2(B)-Abstände.

Bei der Glykosylierungsvariante (MN2F)₂ mit unverzweigtem Kohlenhydratstamm ist kein direkter Kontakt zwischen den Kohlenhydraten nachweisbar, wogegen in allen anderen Fc-Glykosylierungsvarianten der Raumgruppe P2₁2₁2₁ der Zuckerrest Man8 den Kontaktpunkt zwischen den beiden C γ 2-Domänen darstellt, wie bereits von Deisenhofer beschrieben wurde (Deisenhofer et al., 1976).

Anhand der Strukturen der Fc-Glykosylierungsvarianten konnte also gezeigt werden, dass die C γ 2-Domänen durch das flexible C γ 2 - C γ 3-Gelenk ihre relative Position zu den C γ 3-Domänen verändern können. Die beiden Kohlenhydratketten legen dabei den minimalen Abstand zwischen den C γ 2-Domänen fest.

4.1.9 Strukturelle Veränderungen in den C γ 2-Domänen

Bei der Überlagerung der C γ 2(A)- und C γ 2(B)-Domänen verschiedener Fc-Glykosylierungsvarianten zeigt sich, dass die Verkürzung der Kohlenhydratketten zu strukturellen Veränderungen in einem *loop* der C γ 2-Domäne, dem sogenannten C'E-*loop*, führt. Der C'E-*loop* erstreckt sich von Tyr296 bis Thr299 und verbindet die beiden benachbarten gegenläufigen β -Stränge C' und E (Abbildung 14, Abbildung 18a). Der Rest Asn297, der als Verankerungspunkt für die Kohlenhydratkette dient, befindet sich im C'E-*loop* (Abbildung 18a).

Interessanterweise wurden identische C'E-*loop*-Konformationen für alle Glykosylierungsvarianten gefunden, die mindestens die Zuckerreste GlcNAc6 bzw. GlcNAc9 in der Kohlenhydratkette tragen, also für die Glykosylierungsvarianten (G2F)₂, (G0F)₂, das native Fc-Fragment und das Fc-Fragment aus dem Fc γ RIII-Komplex. In Abbildung 18a, b sind diese Strukturen durch die Glykosylierungsvariante (G2F)₂ (P2₁2₁2₁) repräsentiert. In den zwei Glykosylierungsvarianten (MN2F)₂ und (M3N2F)₂, die kein GlcNAc6 oder GlcNAc9 in ihrer Kohlenhydratkette tragen, weichten die C'E-*loop*-Konformation und die Position der verbliebenen Kohlenhydratketten in der A-Kette im Vergleich zu (G2F)₂ um 1.5 Å bzw. 1.13 Å ab (Abbildung 18a). Ähnliche Abweichungen werden in der B-Kette beobachtet. Die C'E-*loop*-Verschiebung in der Glykosylierungsvariante (M3N2F)₂ ist kleiner als in (MN2F)₂, was vermuten lässt, dass neben den GlcNAc-Resten im α 3- und α 6-Arm auch die Zucker Man5 und Man8 zur Stabilisierung der Konformation des C'E-*loops* beitragen.

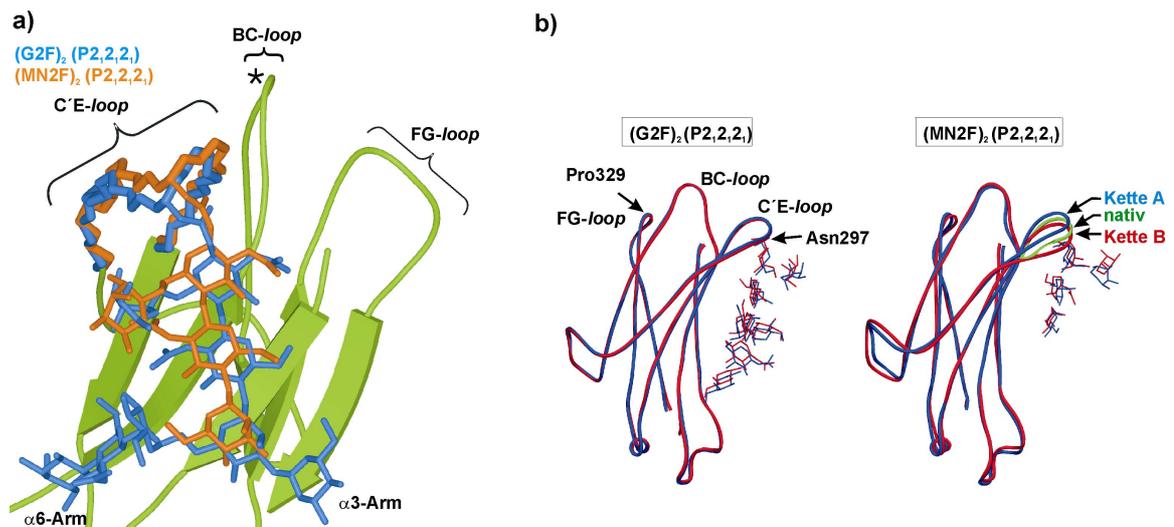


Abbildung 18: Konformationsänderung im C'E-loop der C γ 2(A)-Domäne, die aus der Verkürzung der Kohlenhydratketten resultiert. a) Die C'E-loop-Konformation der Glykosylierungsvariante (MN2F)₂ (P_{2,2,2,1}) (orange) ist repräsentativ für Fc-Glykosylierungsvarianten, denen GlcNAc6/GlcNAc9 oder mehr Zucker in der Kohlenhydratkette fehlen. Die Glykosylierungsvariante (G2F)₂ (P_{2,2,2,1}) (blau) repräsentiert alle Fc-Glykosylierungsvarianten, die eine Kohlenhydratkette tragen, in der mindestens GlcNAc6/GlcNAc9 enthalten sind. Sekundärstrukturelemente der C γ 2(A)-Domäne der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ (P_{2,2,2,1}) sind in Grün dargestellt. Die Position von His268 ist mit einem Stern markiert. b) C γ 2(A) - C γ 2(B)-Überlagerung einzelner Glykosylierungsvarianten. Links: Es wurden identische C'E-loop-Konformationen in beiden Ketten der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ (P_{2,2,2,1}) mit 10 Monosacchariden in der Kohlenhydratkette gefunden. Das gleiche gilt für das native Fc-Fragment. Rechts: Im Vergleich zu der C'E-loop-Konformation in nativem Fc (grün) sind in der Struktur der Glykosylierungsvariante (MN2F)₂ (P_{2,2,2,1}) die C'E-loops in den C γ 2-Domänen in entgegengesetzter Richtung verschoben.

Die Überlagerung der C γ 2(A)- und C γ 2(B)-Domänen der Fc-Glykosylierungsvarianten (M3N2F)₂ und (MN2F)₂ zeigt unterschiedliche strukturelle Abweichungen der C'E-loops in den Ketten A und B (für (MN2F)₂ in Abbildung 18b gezeigt).

In den Strukturen der Glykosylierungsvarianten (M3N2F)₂ und (MN2F)₂ sind die Verschiebungen der C'E-loops mit Verschiebungen der Kohlenhydratketten verbunden. Die Kohlenhydratkette des Fc-Fragmentes kann an der Proteinoberfläche verschoben werden, da sie über viele schwache Kontakte mit dem Protein assoziiert ist (Tabelle 4). Obwohl die α 3- und α 6-Arme der Kohlenhydratstrukturen bis zur Man5 und Man8 verkürzt sind oder ganz fehlen, ist die Elektronendichte für die verbleibenden Zucker GlcNAc1, GlcNAc3 und Man4 gut definiert. Offensichtlich reichen aber die Protein-Kontakte der verkürzten Kohlenhydratkette nicht aus, um den C'E-loop zu stabilisieren. Weiterhin zeigt der strukturelle Vergleich der Fc-Glykosylierungsvarianten, dass die Monosaccharide Man5 und Gal7 im α 6-Arm ihre Orientierung relativ zum Protein in verschiedenen Glykosylierungsvarianten ändern (Abbildung 19). In der Glykosylierungs-

variante $(G2F)_2$ (C222₁) sind diese beiden Zucker eng mit der Proteinoberfläche assoziiert (Tabelle 4). Im Gegensatz dazu sind dieselben Zucker in einer alternativen Struktur derselben Glykosylierungsvariante (Raumgruppe P2₁2₁2₁) um 90° gedreht. Die Orientierung der Zucker Man5 und Gal7 in der Raumgruppe (P2₁2₁2₁) erlaubt keine Assoziation dieser Monosaccharide mit dem Protein (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu ist der zwischen Man5 und Gal7 liegende Zucker GlcNAc6 in beiden $(G2F)_2$ -Strukturen in Kontakt mit den Resten Phe243, Thr260 und Lys246, obwohl sich seine Position an der Oberfläche des Proteins um 2 Å verändert. Zusammen mit der Beobachtung, dass sich die C'E-loop-Konformation in Abwesenheit von GlcNAc6 ändert, zeigen diese Resultate, dass GlcNAc6 für die Stabilisierung der Cγ2-Domäne und die Interaktionen der Kohlenhydratketten mit dem Protein wichtig ist.

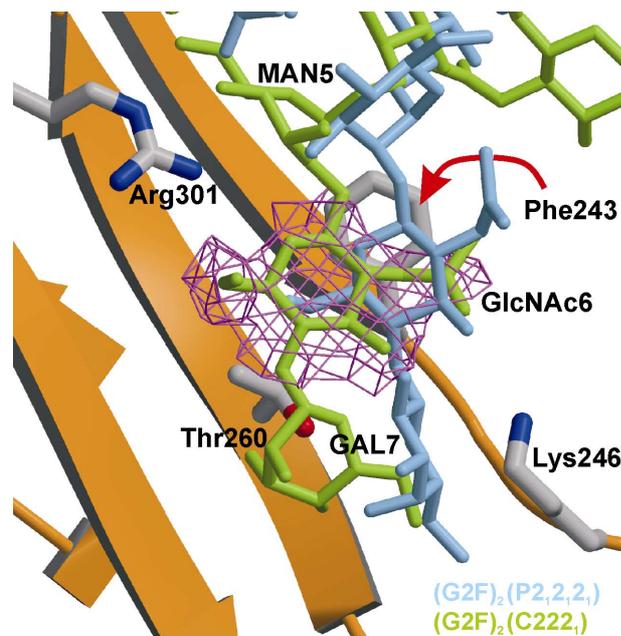


Abbildung 19: Die Bedeutung von GlcNAc6 für die Stabilität der Zucker-Protein-Wechselwirkungen. Die Strukturen des $\alpha 6$ -Armes (Kette A) der Fc-Glykosylierungsvariante $(G2F)_2$ in den Raumgruppen C222₁ und P2₁2₁2₁ sind in Grün bzw. in Blau dargestellt. Die beiden Zucker Man5 und Gal7 im $\alpha 6$ -Arm haben in den beiden Strukturen verschiedene Orientierungen. Demgegenüber bleibt GlcNAc6 in beiden Strukturen in Kontakt mit der Cγ2-Domäne. Die auf 0.8 σ konturierte 2Fo-Fc-Elektronendichte von GlcNAc6 der Fc-Glykosylierungsvariante $(G2F)_2$ in Raumgruppe C222₁ ist in Magenta dargestellt.

Tabelle 4: Analyse der Kontakte zwischen Zuckerresten und dem Protein

Glykosylierungs- variante	GlcNAc1	Fuc2	GlcNAc3	Man4	Man5	GlcNAc6	Gal7
von Zuckern kontaktierte Fc-Reste	Val264 Asp265 Tyr296 Asn297	Tyr296	Val264	Phe241	Phe243 Val262 Arg301	Phe243 Lys246 Thr260	Lys246 Glu258 Thr260 Pro244 Pro245
(MN2F) ₂ (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	+++ +++	++ 0	+++ ++	+++ +++	- -	- -	- -
(M3N2F) ₂ (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	+++ +++	+++ 0	+++ +++	++ ++	0 0	- -	- -
(G0F) ₂ (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	+++ +++	++ +	+++ +++	++ ++	0 0	++ ++	+ +
(G2F) ₂ (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	+++ +++	++ ++	+++ +++	++ ++	0 0	++ /	+ /
(G2F) ₂ (C222 ₁)	+++ +++	++ ++	+++ +++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++
nativ (Hochsalz) (P6 ₁ 22)	++ +++	++ +++	++ +++	++ ++	0 0	++ ++	0 +
nativ (1FC1) (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	0 0	+++ +++	++ ++
Fc-FcγRIII (P6 ₁ 22)	+++ +++	++ ++	+++ +++	+++ +++	0 0	++ ++	+ +

Die Abstände und Winkel der einzelnen Monosaccharid-Zucker von verschiedenen Glykosylierungsvarianten relativ zu den entsprechenden Monosaccharid-Zuckern in der Struktur der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ (C222₁) wurden analysiert. Dazu wurden die Cγ2(A)- und Cγ2(B)-Domänen der jeweiligen Glykosylierungsvariante mit der Cγ2-Domäne von (G2F)₂ (C222₁) überlagert (schwarze Symbole für Cγ2(A) und graue Symbole für Cγ2(B)). Die angegebenen Abstände wurden zwischen bestimmten Referenzatomen in den aufgeführten Aminosäuren und Kohlenhydraten gemessen. Es wurde zwischen starken (3.5 - 4.5 Å), mittelstarken (4.5 - 5 Å) und schwachen (> 6 Å) Kontakten unterschieden. Außerdem wurden die winkelbezogenen Abweichungen der überlagerten Zuckerringe in die Beurteilung der Zucker-Protein-Kontakte einbezogen und deren Auswirkungen auf die Kontakte bewertet. Aus der Kombination dieser Daten wurden die Zucker-Protein-Kontakte als stark (+++), mittelstark (++) , schwach (+) oder nicht vorhanden (0) eingestuft. Zucker, die in der entsprechenden Glykosylierungsvariante nicht vorhanden sind, wurden mit (-) markiert. Zucker, für die keine Elektronendichte vorhanden war, wurden mit (/) markiert.

4.1.10 Analyse von Kristallkontakten und B-Faktoren

Interessanterweise sind in allen Fc-Glykosylierungsvarianten, die in der Raumgruppe P2₁2₁2₁ gelöst wurden, die B-Faktoren in der B-Kette höher als in der A-Kette, was mit den Ergebnissen von Deisenhofer (Deisenhofer, 1981) übereinstimmt (Tabelle 5). Die unterschiedlichen Kristallkontakte in den Domänen Cγ2(A) und Cγ2(B) beeinflussen die thermische Beweglichkeit beider Domänen und begründen die unterschiedlichen B-Faktoren in den zwei Cγ2-Domänen eines Fc-Fragmentes (Tabelle 5). Obwohl die Kristallkontakte in Cγ2(A) und Cγ2(B) an äquivalenten Stellen zu finden sind,

unterscheiden sich die einzelnen Kontakte im Detail. Der erste Kristallkontakt ist nahe der N-Glykosylierungsstelle Asn297, der Zweite ist am Arg255 in der Nähe des C γ 2-C γ 3-Gelenks zu finden und der Dritte befindet sich im *loop* zwischen Val282 und Thr289. Der letztgenannte Kristallkontakt löst eine Fehlordnung in der Polypeptidkette zwischen den Resten Val282 und Thr289 aus, was zu einer schlecht definierten Elektronendichte und hohen B-Faktoren für His285 in allen Fc-Strukturen der Raumgruppe P2₁2₁2₁ führt. Weiterhin ergeben sich ungünstige Diederwinkel für einige Reste, die His285 flankieren, z. B. die Reste Gln283, Asn286 und Glu193.

Tabelle 5: Zusammenhang zwischen der Länge der Kohlenhydratketten und der B-Faktoren

Glykosylierungs- variante	Zucker pro Fc- Kette	B _{durchschnittl.} Polypeptidkette A		B _{durchschnittl.} Polypeptidkette B		B _{durchschnittl.} Kohlenhy- dratkette A	B _{durchschnittl.} Kohlenhy- dratkette B
		C γ 2	C γ 3	C γ 2	C γ 3		
(MN2F) ₂ (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	4	38.4	35.6	71.3	32.8	63.3	101.4
(M3N2F) ₂ (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	6	46.8	43.4	68.8	42.1	63.3	91.6
(G0F) ₂ (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	8	41.6	46.0	72.8	39.2	59.2	90.5
(G2F) ₂ (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	10	31.2	22.9	51.8	23.0	48.4	79.4
(G2F) ₂ (C222 ₁)	10	55.1	44.8	55.1	44.8	94.0	94.0
nativ (1FC1) (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	8 - 12	49.2	30.5	17.7	20.8	74.2	36.3
nativ (Hochsalz) (P6 ₁ 22)	8 - 12	24.2	19.1	22.5	18.8	29.0	45.2
Fc-Fc γ RIII 1E4K (P6 ₁ 22)	8 - 12	106.0	116.2	68.3	112.1	100.9	77.9

Ein Vergleich der B-Faktoren zwischen Protein und Kohlenhydratanteil (Tabelle 5) zeigt, dass in Fc-Strukturen die Kohlenhydratketten generell flexibler sind als der Proteinanteil. Außerdem ist eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Länge der Kohlenhydratketten und deren Bewegungsfreiheit zu beobachten: längere Kohlenhydratketten haben niedrige B-Faktoren und kürzere Kohlenhydratketten haben höhere B-Faktoren (Tabelle 5), was sich mit einem Nettoverlust an stabilisierenden Zucker-Protein-Wechselwirkungen bei abnehmender Kettenlänge erklären lässt.

4.2 Die Kristallstruktur von cMm-CNS

4.2.1 Expression und Reinigung

Mehrere Versuche, die gesamte Mm-CNS (1-432) und den vollständigen katalytisch aktiven Teil des Enzyms (Reste 1-268) zu reinigen, führten nicht zum Erfolg, weil der größte Teil des Proteins während der Reinigungsprozedur aus der Lösung ausfiel. Der Grund für diese Destabilisierung wurde im Prolin/Glycin-reichen N-terminalen Teil des Proteins vermutet, der 36 Aminosäuren umfasst und nur in höheren Eukaryoten vorkommt. Daher wurde der N-terminale flexible Teil des Vollängenenzym durch einen Aminopeptidase-M-Verdau entfernt.

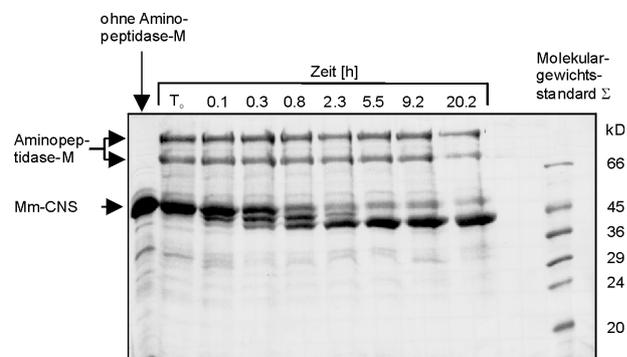


Abbildung 20: SDS-PAGE des Aminopeptidase-M-Verdau der Mm-CNS (Aminosäuren 1-432).

Die Aminopeptidase-M spaltet ausgehend vom N-terminalen Ende des Proteins schrittweise Aminosäuren ab, bis eine Domäne mit stabiler Faltung erreicht ist. Die SDS-PAGE-Gelanalyse von zeitabhängigen Proben des Proteinverdau zeigte, dass der Verdau nach ca. 5 h abgeschlossen war (Abbildung 20). Die scharfe Bande bei 45 kDa liess vermuten, dass ein homogenes Produkt vorlag. Das N-terminal verkürzte Produkt war in Lösung stabil und Gelfiltrationsexperimente ergaben, dass die Mm-CNS in Lösung Tetramere ausbildet (Abbildung 21).

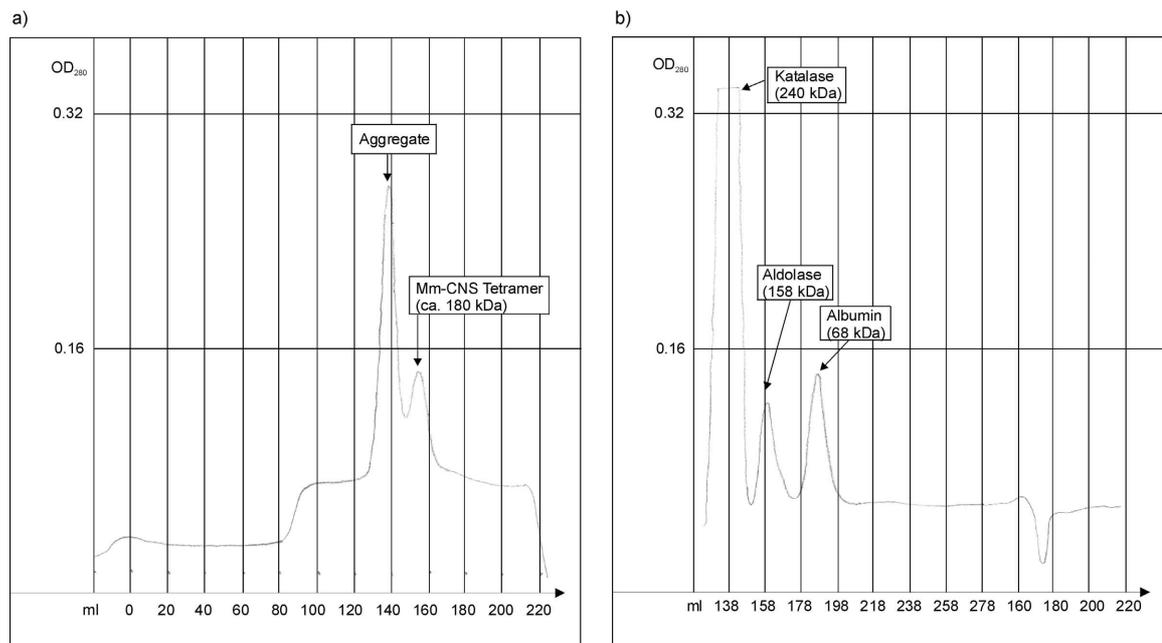


Abbildung 21: Präparative Gelfiltration zur Aufreinigung der Mm-CNS. a) Die Mm-CNS eluierte von einer Superdex-200-HighLoad-Säule nach 77 min, was einem Volumen von 154 ml entspricht. Die Flussrate betrug 2 ml/min. Die Detektion des Proteins erfolgte durch UV-Absorption bei 280 nm. Im Ausschlussvolumen eluierte aggregiertes Protein. b) Eichung der Superdex-200-HighLoad-Säule mit den Markerproteinen: Katalase (240 kDa), Aldolase (158 kDa) und Albumin (68 kDa). Für beide Läufe wurde derselbe Puffer verwendet.

Von dem erhaltenen Material konnten Proteinkristalle erzeugt werden, die jedoch keine Röntgenstrahlung beugen. Das N-terminale Ansequenzieren des Proteins und massenspektrometrische Analysen ergaben, dass durch den Aminopeptidaseverdau am N-Terminus des Proteins Inhomogenitäten im Bereich der Aminosäuren 26-31 auftraten (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden zwei neue pGEX-4T-2-Expressionskonstrukte entworfen, die jeweils mit der Aminosäure K39 beginnen und mit den Aminosäuren K270 bzw. K432 enden. Das kürzere der beiden Konstrukte hat etwa dieselbe Ausdehnung wie bakterielle CNS-Enzyme und umfasst den katalytisch aktiven Teil der Mm-CNS (cMm-CNS, Aminosäuren 39-270). Dieses Konstrukt konnte exprimiert und gereinigt werden. Die katalytische Aktivität des cMm-CNS-Konstruktes wurde durch Komplementationstests mit *Chinese hamster ovary cells* (CHO) (Komplementationsgruppe LEC29Lec32) (Potvin et al., 1995) und mit EV5 *E. coli*-Zellen (Vimr and Troy, 1985) nachgewiesen (Münster, 2002; Daten nicht gezeigt). Die stetige Präzipitation der cMm-CNS während des Aufkonzentrierens konnte durch den Zusatz von 2 mM CMP-Neu5Ac verhindert werden. Bedingt durch die Klonierungsstrategie trägt das cMm-CNS-

Konstrukt zwei zusätzliche Aminosäuren (Gly und Ser) am N-Terminus, wodurch die Kristallisation allerdings nicht beeinträchtigt wird.

4.2.2 Kristallisation

Eine initiale Kristallisationsbedingung für das cMm-CNS-Konstrukt (Aminosäuren 1-270) wurde mit einem *incomplete factorial screen* (Carter and Carter, 1979) gefunden, der mit Hilfe eines Pipettierroboters (Plato3000, Qiagen, Dreieich) hergestellt wurde und 168 verschiedene Bedingungen umfasste. Nach der Methode des „sitzenden Tropfens“ wurden 1 μ l einer Proteinlösung (10 mg/ml) und 0.5 μ l der Reservoirlösung miteinander gemischt und bei 18 °C entsprechend der Dampfdiffusionsmethode aufkonzentriert. Bei der Bedingung 100 mM TRIS/HCl pH, 8.9, 200 mM Natriumcitrat und 20 % PEG400 bildeten sich nach zwei Tagen erste Proteinkristalle (Abbildung 22). Durch die Verminderung des PEG400-Anteils in der Kristallisationsbedingung um 4 % und *microseeding*-Techniken konnte die Größe der Kristalle optimiert werden. Die Kristalle wurden aus der wässrigen Kristallisationslösung in Perfluorpolyether überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die cMm-CNS-Kristalle gehören zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ und streuten Röntgenstrahlung bis zu einer limitierenden Auflösung von 2.7 Å (Tabelle 6).

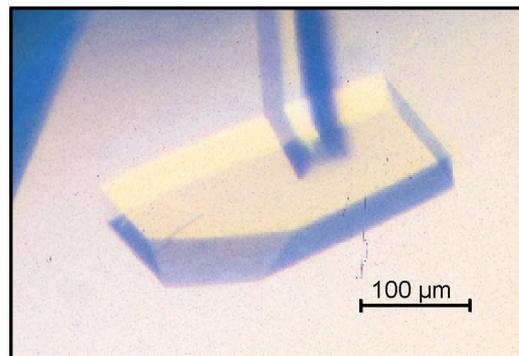


Abbildung 22: Orthorhombische Proteinkristalle der cMm-CNS.

Tabelle 6: Datenerfassung und Phasierung

Datensatz	nativ	Thiomersal (peak)	Thiomersal (edge)	Thiomersal (remote)
Wellenlänge [Å]	1.5418	1.00590	1.00850	0.95000
Auflösung [Å]	2.8		2.7	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Zellkonstanten [Å]	a = 74.0479		a = 74.39	
	b = 79.9405		b = 74.92	
	c = 170.2512		c = 168.29	
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$		$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Zahl von unabhängigen Reflexen	25492	53348	53348	53209
Redundanz	6	3.4	3.4	3.4
Vollständigkeit insg. / letzte Schale [%]	99.5 / 100	100 / 100	99.9 / 100	99.9 / 100
anomale Vollständigkeit insg. / letzte Schale [%]	- / -	99.8 / 99.8	99.8 / 99.5	99.8 / 99.9
R _{merge} / letzte Schale [%]	8.9 / 32.1	7.6 / 19.8	7.5 / 17.1	7.4 / 14.8
Hg-Atome in der AU	-		4	
mean figure of merit	-		0.61	

4.2.3 Strukturlösung

Die Kristallstrukturen der beiden bakteriellen CNS-Homologen, *Neisseria meningitidis*-CNS (Nm-CNS) und *E. coli* CMP-2-keto-3-deoxy-manno-octulosonsäure-Synthetase (Ec-CKS) sind bereits bekannt (Jelakovic and Schulz, 2002; Mosimann et al., 2001). Trotz der Sequenzähnlichkeit zwischen der cMm-CNS und diesen beiden Proteinen (27 % für Nm-CNS und 22 % für Ec-CKS) konnten die Strukturen nicht als Suchmodell für den molekularen Ersatz (MR) verwendet werden. Deshalb wurden MAD-Methoden angewendet (siehe 3.2.2.2). Als geeignete Schwermetallverbindung für das *soaken* der Kristalle erwies sich Thiomersal. Die Kristalle wurden dabei für 20 Minuten in einen Tropfen Reservoirlösung eingelegt, der zusätzlich 1 mM Thiomersal enthielt. Durch das anschließende Waschen der Kristalle in Reservoirlösung wurde unspezifisch gebundenes Thiomersal von der Oberfläche entfernt. Anschließend wurden die Kristalle in Perfluorpolyether überführt und bei 100 K schockgefroren.

Mit Hilfe der MAD-Datensätze, die an der BW6-*Beamline* am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg aufgenommen wurden, konnten experimentelle Phasen bestimmt werden. Die drei gemessenen Datensätze (Tabelle 6) wurden bei

unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen. Um die Friedel-Paare möglichst vollständig zu messen, wurde jeder Datensatz in zwei um 180° versetzte Sektoren von jeweils 90° aufgeteilt, wobei um 0.5° pro Bild gedreht wurde. Die Lage von vier Quecksilberatomen in der asymmetrischen Einheit wurde mit dem Programm SOLVE identifiziert und direkt zur Berechnung initialer Phasen mit dem Programm SHARP verwendet (de La Fortelle and Bricogne, 1997). Anschließend wurde eine Dichtemodifikation (*solvent flattening*) mit dem Programm SOLOMON durchgeführt.

4.2.4 Modellbau und Verfeinerung

Die resultierende Elektronendichte war von ausreichender Qualität, um mit dem Bauen der Struktur im Programm MAIN (Turk, 1992) zu beginnen. Für drei der vier cMm-CNS-Monomere in der asymmetrischen Einheit war das zentrale β -Faltblatt klar in der Elektronendichte definiert. Daher konnten drei Monomere der bakteriellen *Neisseria meningitidis*-CNS (Nm-CNS) in der Elektronendichte positioniert werden. Zwei der drei eingebauten Monomere waren in einem Dimer assoziiert. Die einzelnen Aminosäuren wurden im Modell entsprechend der Sequenz des Maus-Enzyms (cMm-CNS) ersetzt und ihre Position der Elektronendichte angepasst. Die Qualität der Elektronendichte für das vierte Monomer in der AU war nicht ausreichend, um dort ein Monomer zu positionieren. Da das NCS-Symmetrieverhältnis der beiden Monomere in dem schon eingebauten Dimer bekannt war und außerdem von einer generellen Dimerisierung des Enzyms ausgegangen wurde, war die Positionierung des vierten Monomers in der AU durch Anwendung des NCS-Operators möglich. Nach der Positionierung von vier Monomeren in der AU war offensichtlich, dass die zwei kompletten Dimere ein Tetramer in der AU ergeben.

Die kristallographische Verfeinerung des schwermetallhaltigen und des nativen Modells, sowie die Berechnung der $2F_o - F_c$ - und $F_o - F_c$ -Elektronendichte wurden mit dem Programm CNS (Version 1.1) (Brünger et al., 1998) unter Verwendung des *remote*-Datensatzes (2.7 Å) bzw. des nativen Datensatzes (2.8 Å) durchgeführt.

Zu Beginn der Verfeinerung wurden die Positionen der einzelnen cMm-CNS-Monomere in der AU durch eine *rigid-body*-Verfeinerung optimiert und anschließend die Atompositionen durch eine konventionelle Verfeinerung an die experimentellen Daten angepasst. Während der Verfeinerung wurden den Atomen der Hauptkette starke NCS-

Beschränkungen und den Atomen der Seitenketten von gut definierten Sekundärstrukturelementen schwächere NCS-Beschränkungen auferlegt.

Mehrere aufeinanderfolgende Modellbau- und Verfeinerungszyklen wurden durchlaufen, in denen zunächst ein universeller Temperaturfaktor und später individuelle gekoppelte Temperaturfaktoren verfeinert wurden. Die vier Quecksilberatome in der AU wurden in die Verfeinerung einbezogen. Als die R_{work} - und R_{free} -Faktoren des schwermetallhaltigen Modells 23 % bzw. 29 % erreicht hatten, war in den aktiven Zentren der Monomere A und C positive F_o-F_c -Elektronendichte sichtbar, die von dem co-kristallisierten Produkt CMP-Neu5Ac herrührte. Ein mit dem Programm SYBYL (Tripos Inc., St. Louis) energieminiertes Modell des Produktes CMP-Neu5Ac wurde in die positive F_o-F_c -Elektronendichte eingesetzt und in die letzten Verfeinerungszyklen einbezogen. Mit Hilfe einer *annealed composite omit map* wurde das Atommodell einschließlich der eingebauten Produktmoleküle überprüft. Nach dem automatischen Einbau und der manuellen Überprüfung von 120 Wassermolekülen sank der R_{work} -Faktor auf 21.7 % und der R_{free} -Faktor auf 28.3 %.

Da die Quecksilberatome in der derivatisierten cMm-CNS-Struktur die Konformation einiger Aminosäurereste im aktiven Zentrum beeinflussen, wurde zusätzlich die Struktur der nativen cMm-CNS durch MR-Methoden gelöst. Dabei wurden die Modellphasen der schwermetallhaltigen Struktur verwendet und die Struktur wie oben beschrieben verfeinert. In der nativen cMm-CNS-Struktur war die beste Elektronendichte für das Produkt in Monomer A zu beobachten. Um die Besetzung der aktiven Zentren mit dem Produkt genauer zu analysieren, wurde der Besetzungsgrad einzelner aktiver Zentren mit dem Produktmolekül verfeinert (*grouped occupancies*), was zu vier zusätzlichen Parametern während der Verfeinerung führte. Für die aktiven Zentren der Monomere A, B, C und D ergaben sich Besetzungen von 1.0, 0.4, 0.7 und 0.7.

Die Besetzung einiger Aminosäurereste in flexiblen *loops*, für die keine Elektronendichte vorhanden war, wurde auf null gesetzt. Diese Reste wurden somit nicht in die Verfeinerung einbezogen. Mit dem Programm PROCHECK (Laskowski, 2001) wurde ein Ramachandran-Plot erstellt, um die Geometrie der Struktur zu analysieren. Demnach befinden sich 85.5 % der Diederwinkel des Proteinrückgrades in energetisch günstigen Regionen. Die Diederwinkel der Reste Ile250 befinden sich in allen vier Monomeren in verbotenen Regionen des Ramachandran-Diagramms. Diese Reste befinden sich direkt

neben dem Aminosäurerest Asp249 im *loop* L13, der an einem Salzbrückensystem beteiligt ist (siehe unten) und den *loop* L13 in eine bestimmte Konformation zwingt, die zu den unerlaubten Diederwinkeln von Ile250 führt. Die Statistik der Verfeinerung der schwermetallhaltigen und der nativen Struktur ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Kristalleigenschaften und Verfeinerungs-Statistik

Datensatz	nativ	Thiomersal (remote)
Proteinatome in der asymmetrischen Einheit	7322	7322
Wassergehalt der Kristalle [%]	45	45
eingebaute Wassermoleküle	158	120
Auflösung [Å]	2.8	2.7
Anzahl der Reflexe:		
insgesamt	28356	26442
Test-Satz	1364	1327
R_{work} [%]	23.9	21.7
R_{free} -Faktor [%]	30.8	28.3
r.m.s.d. von Idealwerten der Bindungslängen und Bindungswinkel [Å] / Winkel [°]	0.0078 / 1.294	0.0151 / 1.807
Diederwinkel [%]		
energetisch günstig	85.9	86.2
zusätzlich erlaubt	12.8	13.4
energetisch ungünstig	0.8	0.3
nicht erlaubt	0.5	0.1
durchschnittlicher Temperaturfaktor [Å ²]	46.3	36.6
r.m.s.d. von gekoppelten Temperaturfaktoren [Å ²]	4.0	4.2
r.m.s.d. von Atompositionen der NCS-verwandten Moleküle	0.096	0.187
Produktbesetzung in Monom. A, B, C und D	1.0 / 0.4 / 0.7 / 0.7	n.b.

Der Unterschied zwischen den durchschnittlichen Temperaturfaktoren des AB-Dimers (34 Å²) und des CD-Dimers (61 Å²) kommt durch unterschiedliche Umgebungen beider Dimere in der Kristallpackung zustande. Das CD-Dimer ist gegenüber dem AB-Dimer an weniger Kristallkontakten beteiligt und hat deshalb mehr Bewegungsfreiheit, was zu höheren durchschnittlichen Temperaturfaktoren führt.

Die Überlagerung von NCS-verwandten Sekundärstrukturelementen in den Molekülen der AU ergibt niedrige r.m.s.d.-Werte (Tabelle 7). Größere strukturelle Abweichungen werden in den *loops* L11, L5, L8 und L13 gefunden.

Die folgenden Aminosäuren sind in der Elektronendichte der cMm-CNS nicht definiert, da sie zu flexiblen *loop*-Bereichen gehören: Glu187(A), Lys183(B)-Gly184(B), Gly52(C)-Ile56(C), Asp204(C), Gly52(D), Lys54(D) und Gly230(D).

4.2.5 Struktur der cMm-CNS

Die asymmetrische Einheit wird von einem cMm-CNS-Homotetramer gebildet (Abbildung 23), das sich aus zwei Dimeren zusammensetzt. Die beiden Dimere sind durch eine zweizählige nicht-kristallographische Symmetrieachse miteinander verwandt. Eine weitere zweizählige nicht-kristallographische Symmetrieachse verläuft durch die Zentren der beiden Dimere, so dass die Monomere eines Dimers durch 180 °-Drehung aufeinander abgebildet werden können.

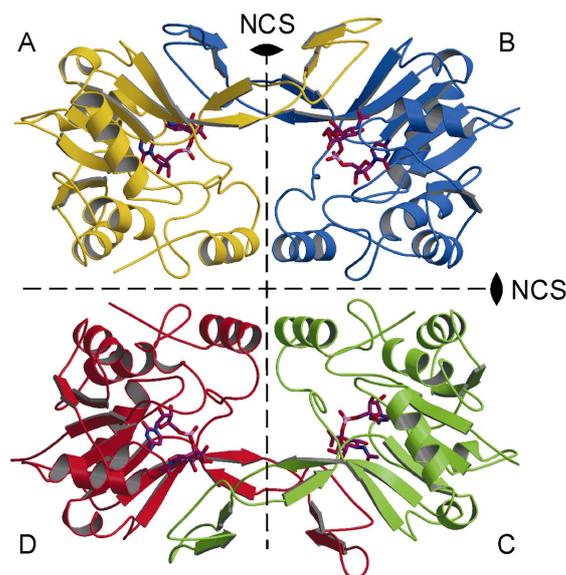


Abbildung 23: cMm-CNS-Tetramer.

Ein Monomer der cMm-CNS gliedert sich in eine zentrale globuläre Domäne und eine abgewinkelte Dimerisierungsdomäne (Abbildung 24). Die zentrale Domäne weist eine offene $\alpha\beta$ -Faltung auf. Die ersten 100 Aminosäuren der zentralen Domäne zeigen eine ähnliche Topologie wie Nukleotidbindende Proteine (*Rossmann fold*).

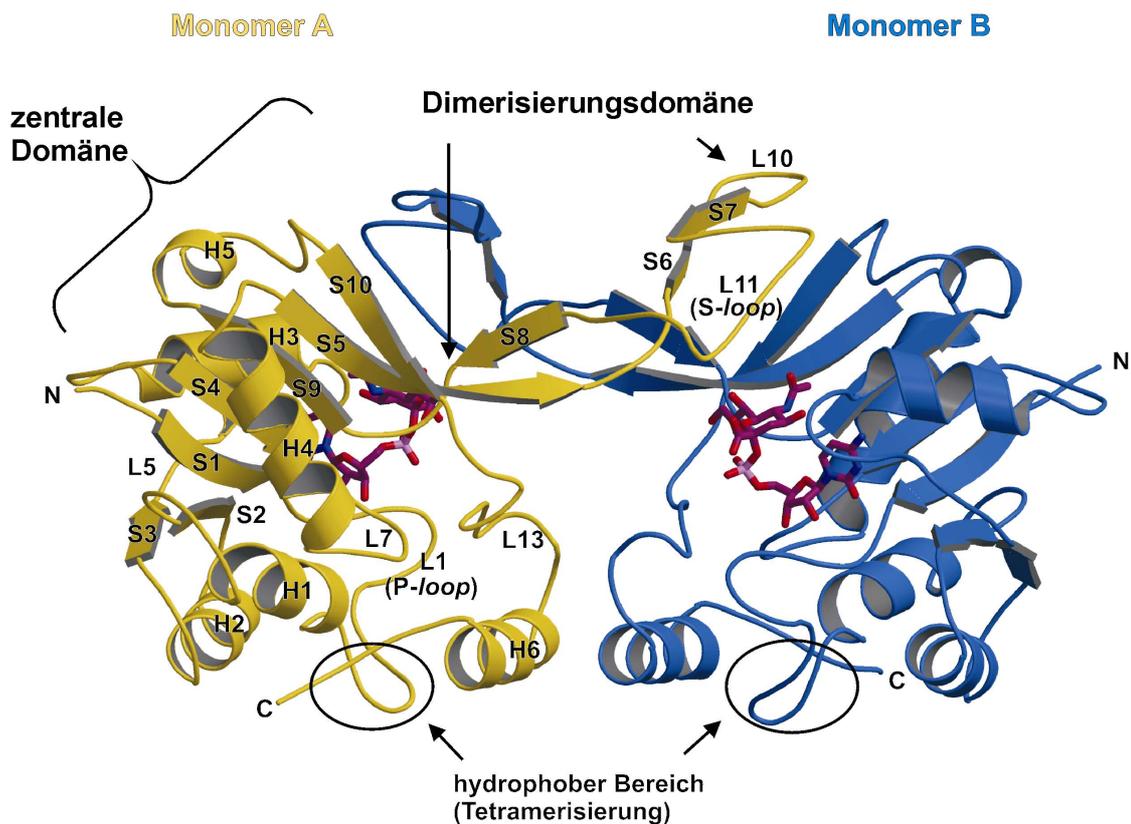


Abbildung 24: cMm-CNS-Dimer. Zwei ineinander verschränkte Monomere bilden ein stabiles Dimer, das der Hälfte eines Tetramers entspricht.

Das β -Faltblatt der zentralen Domäne setzt sich aus sechs parallelen (S1, S2, S3, S4, S5, S10) β -Strängen und einem antiparallelen β -Strang (S9) zusammen. Dieses Faltblatt ist von beiden Seiten von α -Helices umgeben. Der Strang S10 und die C-terminale Helix H6 sind durch den ausgedehnten *loop* L13 verbunden, der Teil des katalytischen Zentrums ist. Zur Dimerisierungsdomäne gehört der ausgedehnte *S-loop* und zwei antiparallele β -Faltblätter (S5, S8 und S6, S7), die einen Winkel von etwa 90° einschließen. Die abgewinkelten Dimerisierungsdomänen von zwei gegenüberliegenden Monomeren sind ineinander verschränkt und stabilisieren das cMm-CNS-Dimer durch Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und hydrophobe Kontakte. Die intermolekulare Kontaktfläche, die das cMm-CNS-Dimer stabilisiert, beträgt 2443 \AA^2 .

Das aktive Zentrum der cMm-CNS wird von den Strängen S4, S5 und S9 der zentralen β -Faltblatt-Struktur, sowie den *loops* L5, L13 und dem *P-loop* eines Monomers gebildet. In der cMm-CNS-Struktur verschließt der *S-loop* des im Dimer gegenüberliegenden Monomers das aktive Zentrum und bringt den katalytisch wichtigen Aminosäurerest

Arg202(B) in eine für die Katalyse notwendige Position. Zusammen mit der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Glu211(A) und Arg199(B) stabilisiert der Kontakt zwischen Arg202(B) und Asp247(A) die *S-loop*-Konformation. Außerdem könnte ein Kontakt zwischen Arg201(B) und dem möglicherweise phosphorylierten Ser117(A) die Konformation des *S-loops* stabilisieren (siehe Abschnitt 5.2.5.).

Das Tetramer, das in der asymmetrischen Einheit gefunden wurde, hat Abmessungen von $82 \text{ \AA} \times 77 \text{ \AA} \times 39 \text{ \AA}$. Die intermolekulare Kontaktfläche zwischen zwei Dimeren, die ein Tetramer bilden, ist mit 920 \AA^2 deutlich kleiner als die Kontaktfläche zwischen zwei Monomeren im Dimer. Hauptsächlich kommt diese Kontaktfläche durch Interaktionen von hydrophoben Aminosäureresten des *P-loops* (Ala65, Gly66 und Val67) und zwei Resten des C-Terminus' (Leu260 und Phe265) zustande. Weiterhin bilden die vier C-terminalen Helices H6 ein Bündel, das durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den vier Resten Gln257 der einzelnen Monomere stabilisiert wird.

Tabelle 8: Spezifische Wechselwirkung zwischen Resten der cMm-CNS und CMP-Neu5Ac.

Atome des Produktes CMP-Neu5Ac	kontaktierende Reste
CMP-Anteil:	
O2'	Asn60(A)N δ
O3'	Asn60(A)O δ
N3	Arg109(A)N ϵ
O2	Ala49(A)N, Arg50(A)N
N4	Thr113(A)CO, Ser118(A)CO, Thr119(A)CO
Neu5Ac-Anteil:	
O1A	Arg202(B)N
O8	Gln141(A)N ϵ 2
N5 (<i>N</i> -Acetyl)	Gln141(A)O ϵ 1
O10 (CO des <i>N</i> -Acetyl)	Arg199(B)N ϵ , Arg199(C)N
C11	Ile124(A), Tyr216(A), Leu228(A)

Die Bezeichnung der Sauerstoff- und Stickstoffatome in CMP-Neu5Ac ist von dem Kohlenstoff- oder Phosphoratom abgeleitet zu dem sie kovalent gebunden sind.

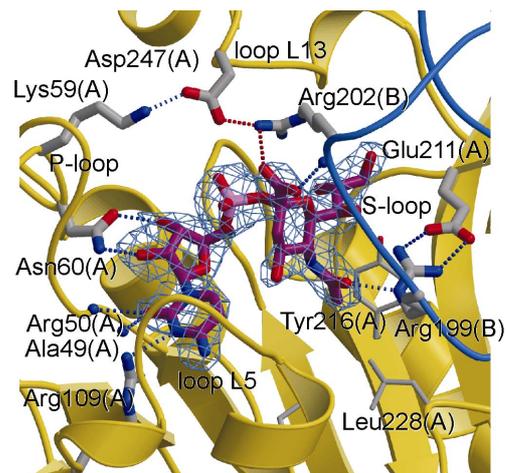


Abbildung 25: Spezifische Wechselwirkungen zwischen Resten der cMm-CNS und CMP-Neu5Ac.
Das CMP-Neu5Ac-Molekül ist in Rot und die zugehörige Elektronendichte (2.5σ) in Blau dargestellt.

Die klar definierte Elektronendichte für das co-kristallisierte Produkt CMP-Neu5Ac im aktiven Zentrum von Monomer A erlaubt die Analyse der Bindungskontakte zwischen Resten des aktiven Zentrums und dem Produktmolekül. Das Nukleotid wird zwischen dem *loop* L5 und dem *P-loop* gebunden (Abbildung 25). Die Cytidinbase ist durch Wasserstoffbrückenbindungen des O2-Sauerstoffs und des N3-Stickstoffs des Cytidins zu den peptidischen Amidgruppen der Reste Ala49(A) und Arg50(A) an das Protein assoziiert. Außerdem besteht zwischen dem N3-Atom des Cytidins und dem Arg109(A) eine Wasserstoffbrückenbindung (Abbildung 25). Die selektive Erkennung der Cytidinbase wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der NH4-Gruppe des Cytidins und dem peptidischen Carbonylsauerstoff der Reste Thr113, Ser118 und Thr119 ermöglicht.

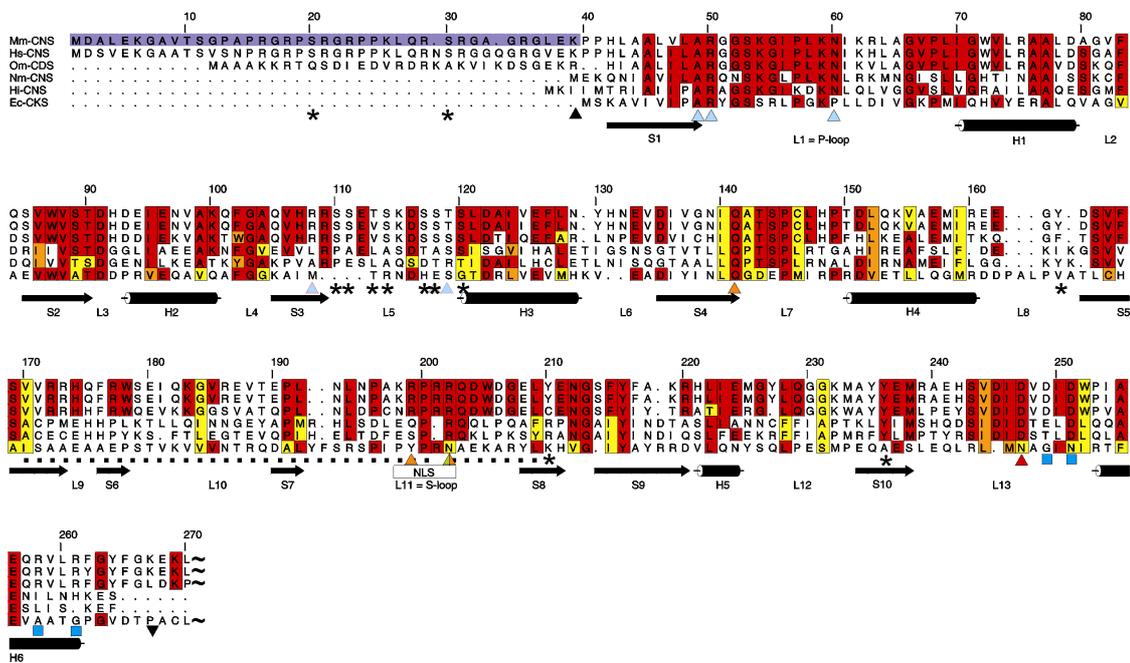
Der Ribosering kommt auf der zentralen β -Faltblatt-Struktur des aktiven Zentrums zu liegen und wird durch direkte Wasserstoffbrückenbindungen des Asn60(A) zu den 2'- und 3'-OH-Gruppen der Ribose positioniert. Der Zuckerring der Neu5Ac bindet zwischen den β -Strängen S4 und S8, den *loops* L13 und L5 und dem *S-loop* des Monomers B. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carboxylsauerstoff der Neu5Ac-Gruppe und der peptidischen Amidgruppe von Arg202(B), sowie zwischen dem O8-Sauerstoff der Neu5Ac und der Seitenkette von Gln141(A) stabilisieren die Lage des Zuckerringes im aktiven Zentrum.

Der Carbonylsauerstoff der N-Acetylgruppe am C5-Kohlenstoff des gebundenen Produktes bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Arg199(B) aus. Außerdem

existieren hydrophobe Kontakte der C11-Methyl-Gruppe des Neu5Ac-Ringes mit den hydrophoben Resten Ile124(A), Tyr216(A) und Leu228(A) (Abbildung 25).

4.2.6 Sequenzalignment

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der cMm-CNS und den CNS-Enzymen aus *Homo sapiens*, *Oncorhynchus mykiss*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* und der verwandten CMP-2-keto-3-deoxy-manno-octulosonsäure-Synthetase (CKS) aus *Escherichia coli* zeigen eine Sequenzübereinstimmung von 22 % bis 94 %. Die konservierten Aminosäurereste befinden sich vor allem im S-loop, dem P-loop und dem loop L13, die Teile des aktiven Zentrums bilden (Abbildung 26).



- ▲ N-Terminus des kristallisierten Proteins
- ▼ C-Terminus des kristallisierten Proteins
- ▲ Asp247 (Positionierung des katalyt. Wassers)
- ▲ Stabilisierung des Übergangszustandes
- ▲ CTP-Bindung
- ~ nicht gezeigte C-terminale Sequenz
- ▲ Neu5Ac-Bindung
- H6(A)-H6(B)-Wechselwirkung
- Dimerisierungsdomäne
- ▬ destabilisierende Pro/Gly-reiche Sequenz; durch Aminopeptidase-M verkürzt
- * potentielle Phosphorylierungsstelle
- NLS Kernlokalisationssequenz

Abbildung 26: Sequenzalignment. Der katalytisch aktive Teil der *Mus musculus*-CNS (cMm-CNS), *Homo sapiens*-CNS (Hs-CNS), *Oncorhynchus mykiss*-CDS (Om-CDS) sowie der bakteriellen Synthetasen *Neisseria meningitidis*-CNS (Nm-CNS), *Haemophilus influenzae*-CNS (Hi-CNS) und *Escherichia coli*-CKS (Ec-CKS) werden verglichen. Die rot unterlegten Bereiche zeigen identische Aminosäuren an, orange und gelb unterlegte Bereiche zeigen Aminosäuresubstitutionen mit höherem bzw. niedrigerem Konservierungsgrad an. Die Lage der Kernlokalisationssequenzen (NLS) ist durch eine offene Box markiert.

Die direkt an der Katalyse beteiligten Reste Asp247 und Arg202 sind in CNS-Enzymen konserviert. Weiterhin ist der in Eukaryoten stark konservierte Sequenzabschnitt Arg199 - Trp205 in der Dimerisierungsdomäne von Sequenzen flankiert, die sich in den einzelnen CNS-Enzymen stark unterscheiden.

In cMm-CNS und der Ec-CKS sind 22 % der Reste identisch. Ungeachtet dessen zeigt ein Vergleich der Kristallstrukturen von cMm-CNS, Nm-CNS und Ec-CKS ähnliche aktive Zentren, was auf einen gemeinsamen Katalysemechanismus hindeutet (Jelakovic and Schulz, 2002; Mosimann et al., 2001).

Eine Datenbanksuche nach Proteinen mit struktureller Ähnlichkeit zur cMm-CNS wurde mit Hilfe des DALI-Servers (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>) durchgeführt. Dabei wurde eine strukturelle Verwandtschaft der cMm-CNS zu Nukleotidylmono- oder -diphosphat-Transferasen wie zum Beispiel *N*-Acetylglucosamin-1-phosphat-Uridyltransferase (Brown et al., 1999), Glucose-1-phosphat-Thymidyltransferase (Blankenfeldt et al., 2000) und 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methylerythritol-Synthetase (Richard et al., 2001) gefunden. Diesen Enzymen ist gemein, dass sie ihre Substrate durch die Bildung einer energiereichen Phosphoresterbindung aktivieren, was deren Nutzung für anabole Prozesse erlaubt.

5. DISKUSSION

5.1 Diskussion IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten

Die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des IgG1-Fc-Fragmentes im Komplex mit dem Fc γ RIII-Rezeptor hat gezeigt, dass nur eine einzelne direkte Wasserstoffbrücke zwischen dem Fc γ RIII und den Kohlenhydratketten des Fc-Fragmentes besteht (Abbildung 4) (Sondermann et al., 2000). Diese polare Wechselwirkung zwischen dem GlcNAc1 in der B-Kette des Fc-Fragmentes und dem Rest Arg152 des Fc γ RIII ist aufgrund der Zugänglichkeit für das Lösungsmittel relativ schwach. Es war daher überraschend, dass man bei dem eng verwandten Fc-Rezeptor Fc γ RIIb eine drastische Verminderung der Fc-Fragment-Affinität feststellte, wenn die Kohlenhydratketten des Fc-Fragmentes verkürzt waren (Mimura et al., 2001). Diese Resultate zeigen, dass die Glykosylierung von Fc-Fragmenten einen Einfluss auf deren Struktur und auf die Bindungsaffinität zu Fc γ -Rezeptoren hat.

Durch die strukturelle Untersuchung verschiedener Fc-Glykosylierungsvarianten sollte geklärt werden, ob die Kohlenhydratketten für die strukturelle Integrität innerhalb der C γ 2-Domänen notwendig sind oder ob deren Hauptaufgabe darin liegt, den Abstand zwischen den beiden C γ 2-Domänen konstant zu halten, um einen „offenen“ Zustand des hufeisenförmigen Fc-Fragmentes zu stabilisieren und so die Rezeptorbindung zu erleichtern.

5.1.1 Regulation des Öffnungszustandes des Fc-Fragmentes

Die Überlagerung von C γ 3-Domänen verschiedener Fc-Glykosylierungsvarianten zeigt, dass die Struktur der C γ 3-Domänen identisch ist und dass sich außerdem die relativen Positionen der C γ 3-Domänen zueinander nicht ändern. Dagegen findet man die C γ 2-Domänen in verschiedenen Fc-Glykosylierungsvarianten in unterschiedlichen Orientierungen relativ zu C γ 3, was durch eine flexible Scharnierregion zwischen der C γ 2- und C γ 3-Domäne ermöglicht wird. Diese Flexibilität zwischen den Domänen des

Fc-Fragmentes ist auch in IgE-Fc-Strukturen beschrieben worden und kann demnach als allgemeingültige Eigenschaft von Fc-Strukturen angesehen werden (Wan et al., 2002).

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Fc-Glykosylierung und der Position der C γ 2-Domänen muß beachtet werden, dass die Positionen der C γ 2-Domänen in den Kristallen verschiedener Raumgruppen schon allein auf Grund der unterschiedlichen Kristallkontakte stark variieren (Abbildung 17). So beträgt der Abstand zwischen den C γ 2-Domänen der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ in der Raumgruppe C222₁ 33.7 Å und in der Raumgruppe P2₁2₁2₁ 26.6 Å. Daher wurden für die Beurteilung des Fc-Öffnungszustandes nur Fc-Strukturen der Raumgruppe P2₁2₁2₁ einbezogen (Tabelle 3, Abbildung 16). Der Vergleich der C γ 2(A) - C γ 2(B)-Abstände macht deutlich, dass sich mit abnehmender Länge der Zuckerketten die C γ 2-Domänen gegenseitig annähern, dass die Kohlenhydratketten also einen Einfluss auf den Öffnungszustand des Fc-Fragmentes haben. Interessanterweise ist der C γ 2(A) - C γ 2(B)-Abstand in der am stärksten verkürzten Glykosylierungsvariante (MN2F)₂ um 2.3 Å kleiner als in der Glykosylierungsvariante (M3N2F)₂, die zusätzlich zwei Mannosereste (Man5 und Man6) am Verzweigungspunkt trägt. Der Kohlenhydratstamm einschließlich der Mannosereste 5 und 8 hat also eine wichtige Bedeutung für die Regulation des Öffnungszustandes. Da der maximale C γ 2(A) - C γ 2(B)-Abstand in der Glykosylierungsvariante (G2F)₂ beobachtet wird, müssen auch die äußeren Zucker in den beiden Armen der Zuckerkette einen Einfluss auf den Fc-Öffnungszustand haben.

Die Kohlenhydratketten der C γ 2-Domänen des nativen Fc-Fragmentes stehen über ihre Zuckerreste Man8 in Kontakt. Auch bei Verkürzung der Kohlenhydratketten, die mit der beschriebenen Annäherung der C γ 2-Domänen verbunden ist, bleibt der Man8(A) - Man8(B) Kontakt erhalten, da die Position der Zuckerketten aufgrund der zahlreichen schwachen Zucker-Protein-Wechselwirkungen variabel ist (Abbildung 19, Tabelle 4). Daher ist der Man4(A)-Man4(B)-Abstand (Tabelle 3), der als Maß für die Distanz der Kohlenhydratketten gewählt wurde, in den Fc-Glykosylierungsvarianten sehr ähnlich. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zuckerketten als *spacer* wirken und den minimalen Abstand zwischen den beiden C γ 2-Domänen festlegen.

Wenn die C γ 2-Domänen weit von ihren symmetrischen Positionen abweichen, wie im Fall der nativen Fc-Struktur (Hochsalz) (Abbildung 17), dann werden die Zucker-Zucker-Wechselwirkungen reorganisiert und gehen im Fall der Glykosylierungsvariante (G2F)₂

(C222₁) ganz verloren. Die unterschiedlichen Positionen der C γ 2-Domänen in Fc-Strukturen verschiedener Raumgruppen zeigen, wie flexibel die Scharnierregion zwischen der C γ 2- und der C γ 3-Domäne ist.

Die Daten von *differential scanning calorimetry*-Experimenten (DSC) haben gezeigt, dass die Affinität des Fc-Fragmentes für den Fc γ RIIb-Rezeptor in Abwesenheit der verzweigenden Zuckerreste Man5 und Man8 signifikant abnimmt, dass gleichzeitig aber keine thermische Destabilisierung der C γ 2-Domänen auftritt (Mimura et al., 2000). In Verbindung mit den gelösten Kristallstrukturen lässt sich daraus schlussfolgern, dass eine Annäherung der C γ 2-Domänen einer effektiven Fc γ R-Bindung entgegensteht. Man8 ist also ein wichtiger Kontaktpunkt der beiden Kohlenhydratketten und bestimmt den minimalen C γ 2(A) - C γ 2(B)-Abstand. Man5 hingegen, der erste Zucker im α 6-Arm, könnte durch seinen Kontakt zur C γ 2-Domäne für die Positionierung der Zuckerkette auf der C γ 2-Domäne wichtig sein. Eine getrennte Betrachtung der strukturellen Funktion von Man5 und Man8 ist hier nicht möglich, da die Protokolle zur Herstellung von Fc-Glykosylierungsvarianten nicht die Herstellung der Glykosylierungsvariante (M2N2F)₂ erlauben, die nur einen der beiden verzweigenden Zuckerreste Man5 und Man8 in der Kohlenhydratkette tragen würde.

Der komplette Verlust der Fc γ RIIb-Bindung des komplett deglykosylierten Fc-Fragmentes (Mimura et al., 2001) könnte dadurch zustande kommen, dass die Aminosäurereste der C γ 2-Domänen in direkten Kontakt treten und die Fc γ R-Bindungsstelle nicht mehr zugänglich ist. Ein wichtiger Grund für den kompletten Affinitätsverlust des deglykosylierten Fc-Fragmentes liegt außerdem in der fehlenden Stabilisierung der C γ 2-Domänen durch Zucker-Protein-Wechselwirkungen, die zu internen Fehlordnungen der C γ 2-Domäne führen können. Die Tatsache, dass das deglykosylierte Fc-Fragment nicht kristallisiert werden konnte und eine erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedenen Proteasen aufweist (Tao and Morrison, 1989) stützt diese These.

5.1.2 Interne Strukturveränderungen in den C γ 2-Domänen

Wie unter 4.1.9 beschrieben, bewirkt das Fehlen der Zuckerreste GlcNAc6 und GlcNAc9 in den Glykosylierungsvarianten (M3N2F)₂ und (MN2F)₂ eine Verschiebung der

gesamten Kohlenhydratkette und eine Konformationsänderung im C'E-loop (Abbildung 18a).

Die Beobachtung, dass die C'E-loops der Fc-Glykosylierungsvarianten (M3N2F)₂ und (MN2F)₂ verschiedene Konformationen in der A- und B-Kette einnehmen ist insofern überraschend, als die Proteinsequenz und die Glykosylierung der beiden Ketten identisch ist. Offensichtlich gewinnt der C'E-loop durch die Verkürzung der Zuckerketten an Flexibilität, so dass die "weichen" C'E-loops durch unterschiedliche Kristallkontakte der C γ 2-Domänen A und B (siehe Abschnitt 4.1.10) in verschiedene Konformationen gezwungen werden. Die gefundenen strukturellen Veränderungen im C'E-loop haben einen direkten Einfluß auf die Affinität des Fc-Fragmentes zum Fc γ RIII, weil der C'E-loop Teil der Bindungsstelle des Fc γ RIII-Rezeptors ist (Sondermann et al., 2000).

Die Ergebnisse von Isothermen Titrationskalorimetrie- (ITC) und BIAcoreTM-Experimenten stimmten gut mit den strukturbasierten Ergebnissen überein. Es wurde eine leichte Abnahme der Fc γ RIIb-Affinität der Fc-Glykosylierungsvariante (M3N2F)₂ nachgewiesen, die durch eine Erhöhung der Entropie bedingt ist (Mimura et al., 2001). Die Bindung der "weichen" und bezüglich der Konformation wenig festgelegten Fc-Glykosylierungsvariante an Fc γ RIIb führt zu einer Abnahme von Konformationsmöglichkeiten und damit zu einer ungünstigen Entropie, die letztendlich zu einer geringeren Affinität zum Fc-Rezeptor führt. Der Grund für die höhere Affinität zwischen Fc γ RIIb und Fc-Glykosylierungsvarianten, deren Zuckerketten sich mindestens bis zu GlcNAc6 und GlcNAc9 ausdehnen, liegt in der resultierenden starren C'E-loop-Konformation, die sich während des Fc γ RIIb-Bindungsprozesses nicht ändert, was sich günstig auf den Entropie-Term der Bindungsenergie auswirkt.

Die beobachteten strukturellen Änderungen im C'E-loop, die durch eine Verkürzung der Zuckerketten hervorgerufen werden, konnten durch 1H-NMR-Untersuchungen mit dem komplett deglykosylierten Fc-Fragment bestätigt werden. Diese Untersuchungen belegen eine strukturelle Veränderung in der Nähe der Reportergruppe His268 (Matsuda et al., 1990). His268 befindet sich im BC-loop, der nahe dem C'E-loop und der N-Glykosylierungsstelle Asn297 liegt (Abbildung 18a). Die durch Deglykosylierung hervorgerufenen strukturellen Veränderungen im C'E-loop lösen chemische Verschiebungen (*chemical shifts*) in der Umgebung von His268 aus, die durch NMR-Experimente nachgewiesen wurden.

5.1.3 Zucker-Protein-Kontakte

Die Analyse der Zucker-Protein-Wechselwirkungen (Tabelle 4) zeigt, dass die Zucker des Kohlenhydratstamms GlcNAc1, GlcNAc3 und Man4 sowie die Zucker des α 6-Armes die Assoziation der Zuckerkette mit der Proteinoberfläche vermitteln. Die Überlagerung der C γ 2-Domänen von zwei Strukturen der Fc-Glykosylierungsvariante (G2F)₂ zeigt Unterschiede in den Positionen der Zucker im α 6-Arm (Abbildung 19). In der Struktur (G2F)₂ (C222₁) sind die Zucker Gal7 und Man5 an das Protein assoziiert und liegen co-planar zur Proteinoberfläche. Im Gegensatz dazu sind in der Struktur (G2F)₂ (P2_{1,2,1}) dieselben Zucker um 90° rotiert und nehmen eine dem Protein abgewandte Lage ein. Nur GlcNAc6 hat in beiden Strukturen einen Kontakt zum Protein und schützt den hydrophoben Rest Phe243 vor Exposition zum Lösungsmittel. In der Glykosylierungsvariante (M3N2F)₂, die kein GlcNAc6 in der Zuckerkette trägt, befinden sich zwei geordnete Wassermoleküle am Phe243 (Abbildung 27) was entropisch ungünstig ist.

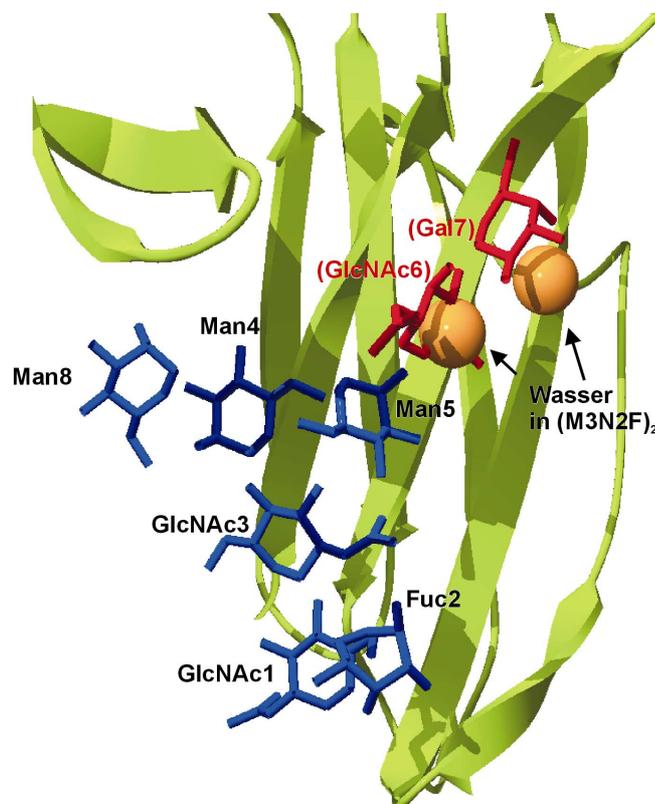


Abbildung 27: C γ 2(A)-Domäne der Glykosylierungsvariante (M3N2F)₂ (grün) mit Kohlenhydratkette (blau). An den Positionen, die normalerweise von den Zuckerresten GlcNAc6 und Gal7 besetzt werden (rot), sind in (M3N2F)₂ zwei geordnete Wassermoleküle gebunden (die orangenen Kugeln zeigen die Position der Sauerstoffatome an).

Der in Abbildung 19 gezeigte ungünstige Winkel der Ringebene des Zuckerrestes Man5 in der Glykosylierungsvariante (M3N2F)₂ verhindert einen effektiven Kontakt zum Protein. Es ist daher anzunehmen, dass Man5 keinen Beitrag zur Stabilisierung der C γ 2-Domäne leistet. Tatsächlich wurde durch *differential scanning calorimetry*-Experimente (DSC) nachgewiesen, dass die thermische Stabilität der C γ 2-Domäne in (M3N2F)₂ sehr ähnlich zu der in (MN2F)₂ ist, die kein Man5 enthält (Mimura et al., 2001).

Gegenüber den Fc-Glykosylierungsvarianten mit längeren Zuckerketten wurde ein signifikanter Abfall der Schmelztemperatur (T_m) und der Entfaltungsenthalpie der C γ 2-Domänen in der Glykosylierungsvariante (M3N2F)₂ festgestellt. Diese Beobachtung stimmt mit der strukturell abgeleiteten Aussage überein, dass GlcNAc6 für die Stabilisierung der C γ 2-Domänen essentiell ist.

Weiterhin ist der reziproke Zusammenhang zwischen den durchschnittlichen B-Faktoren und den Kettenlängen der Kohlenhydrate (Tabelle 5) auf die vielen nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Zuckerresten und Protein zurückzuführen, die eine gegenseitige Stabilisierung von Protein und Kohlenhydrat sicherstellen.

5.1.4 Zusammenfassung IgG1-Fc-Glykosylierungsvarianten

Aus der Kombination der Strukturen von Fc-Glykosylierungsvarianten und den Ergebnissen von thermodynamischen und BIAcoreTM-Experimenten lässt sich ableiten, dass die schrittweise Abnahme der Assoziationskonstante K_A ($K_A = k_{on} / k_{off}$) der Fc-Fc γ RIIb-Interaktion bei fortschreitender Deglykosylierung mit einer sinkenden Bindungsrate k_{on} bei gleichzeitig ansteigender Dissoziationsrate k_{off} erklärt werden kann.

Diese Hypothese wird von zwei unabhängigen Beobachtungen gestützt. Die geschlossene Struktur eines partiell deglykosylierten Fc-Fragmentes muss vor der Fc-Rezeptor-Bindung strukturell umgeordnet werden, was zu einer reduzierten Bindungsrate k_{on} führt. Demgegenüber ist eine geöffnete Fc-Struktur, die schon eine ähnliche Konformation wie im Komplex mit dem Fc-Rezeptor aufweist, die günstigste Konformation für die Rezeptorbindung. Außerdem führt die entropisch ungünstige Fixierung des flexiblen C'E-loops eines partiell deglykosylierten Fc-Fragmentes bei der Komplexbildung zu einer sinkenden k_{on} - und einer ansteigenden k_{off} -Rate. Die beschriebenen Effekte führen

zu einer insgesamt niedrigeren Assoziationskonstante K_A für partiell deglykosylierte Fc-Fragmente.

Um die Auswirkungen der Fc-Glykosylierung auf die k_{on} - und k_{off} - Geschwindigkeitskonstanten im Detail zu klären, sind allerdings weitere BIAcore™-Analysen des Fc-FcγR-Bindungsvorganges notwendig, die die separate Bestimmung beider Größen erlauben.

Es wurde durch strukturelle und thermodynamische Daten gezeigt, dass durch die Modifikation der Fc-Glykosylierung die Funktionalität von Antikörpern verändert werden kann. Durch gezieltes “*glycoengineering*” von Antikörpern könnte man die Bindungsaffinität von Antikörpern zu den entsprechenden Fc-Rezeptoren modulieren und damit die Aktivität von Effektorzellen herauf- oder herunterregulieren. Es gibt heute schon Säugerzelllinien, die für die Produktion von menschlichen Antikörpern mit voller Aktivität genutzt werden. Durch das Einsetzen oder Entfernen von Genen für zuckermodifizierende Enzyme können in diesem System auch Antikörper mit Glykosylierungsmustern hergestellt werden, die in der Natur nicht vorkommen.

Ein chimärer anti-Neuroblastoma-IgG1-Antikörper (chCE7) mit maßgeschneiderten Zuckerketten wurde in Hamsterzellen (CHO) durch die Transfektion des $\beta(1-4)$ -N-Acetylglucosaminyltransferase-III-Gens hergestellt, das für ein Enzym kodiert, das einen zusätzlichen GlcNAc-Zuckerrest zwischen dem $\alpha3$ - und $\alpha6$ -Arm der Zuckerketten an das Man4 anfügt (Umana et al., 1999). Dieser veränderte Antikörper, der im menschlichen Blutplasma nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt, kann Neuroblastoma-Zellen bei 10- bis 20-fach geringeren Konzentrationen töten als gewöhnliches IgG1.

Es gibt außerdem den Ansatz, komplett deglykosylierte anti-T-Zell-IgG-Antikörper zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen einzusetzen. Solche Antikörper wirken immunosuppressiv, da sie fremde Antigene binden, aber durch ihr Unvermögen an Fc-Rezeptoren zu binden keine Immunreaktion auslösen (Friend et al., 1999). Deglykosylierte Antikörper haben gegenüber Fab-Fragmenten oder Fab₂-Fragmenten außerdem den Vorteil einer längeren Halbwertszeit.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Fc-FcγR-Wechselwirkung stark von der IgG-Fc-Glykosylierung abhängig ist. Eine gezielte Veränderung des Glykosylierungsprofils therapeutischer Antikörper könnte daher für die Beeinflussung bestimmter Effektorfunktionen ausgenutzt werden.

Trotz der eingehenden Analyse der Fc-Glykosylierung ist es heute noch nicht möglich, durch die rationale Veränderung von IgG-Glykosylierungsmustern die Effektorfunktionen von therapeutischen Antikörpern zu steuern. Die vorliegenden Daten können aber zum besseren Verständnis der Rolle der Zuckerketten für die Struktur und Funktion von IgG-Antikörpern beitragen.

Neben der Veränderung von IgG-Glykosylierungsmustern gibt es auch andere Ansätze, die IgG-Effektorfunktionen zu beeinflussen. Beispielsweise versuchten Shields et al. durch die Mutation von einzelnen Aminosäureresten in der C γ 2 - C γ 3-Kontaktregion von IgG1-Fc eine Fc-Konformation zu etablieren, die für eine Fc γ R-Bindung ideal ist (Shields et al., 2001). Die Ergebnisse eines Mutations-*screenings* aller an der Oberfläche exponierten Aminosäureseitenketten zeigte, dass auch Reste, die weit von der Rezeptorbindungsstelle entfernt liegen die Affinität des Antikörpers zu Fc-Rezeptoren beeinflussen können. Beispielsweise führt die Mutation Glu430Ala in der C γ 2-C γ 3-Kontaktregion von IgG1 zu einer besseren Bindung an den Fc γ RIIb-Rezeptor. Dieser Effekt könnte mit der Fixierung des C γ 2-C γ 3-Scharnieres zusammenhängen, die zu einer optimalen C γ 2-C γ 3-Distanz für die Fc γ RIIb-Bindung führt.

5.2 Diskussion cMm-CNS

5.2.1 Strukturvergleich bekannter CNS-Strukturen

Sialinsäuren sind in Eukaryoten, mit Ausnahme von Pflanzen, weit verbreitet. Außerdem werden sie in einzelnen gram-negativen Bakterien gefunden. Weiterhin sind in verschiedenen gram-positiven Bakterienstämmen, in Cyanobakterien und in Archaea DNA-Sequenzen nachzuweisen, die für Proteine kodieren, die höchstwahrscheinlich an der Sialinsäure-Synthese und -Übertragung beteiligt sind (Angata and Varki, 2002). Obwohl es in Bakterien und Vertebraten verschiedene biochemische Synthesewege zur Erzeugung von Sialinsäuren gibt und sich folglich die beteiligten Enzyme unterscheiden, werden alle Sialinsäuren durch CTP aktiviert. Die bakteriellen und eukaryotischen Enzyme, die an dieser Aktivierung beteiligt sind, weisen Sequenzähnlichkeit auf (Abbildung 26).

Die Polypeptidsequenz der CMP-Neu5Ac-Synthetasen von Vertebraten (ca. 430 Aminosäuren) umfasst einen N-terminalen katalytisch aktiven Teil und einen C-terminalen funktionell und strukturell nicht charakterisierten Teil. Im Gegensatz dazu findet man in Bakterien verkürzte CNS-Enzyme, die ca. 270 Aminosäuren enthalten und einige Bereiche hoher Sequenzhomologie zu Wirbeltier-CNS-Enzymen aufweisen.

Die Sequenzhomologie zwischen der cMm-CNS und der kürzlich strukturell untersuchten CNS von *Neisseria meningitidis* (Mosimann et al., 2001) ist 27 %. Weiterhin ist die Topologie beider Enzyme und der Aufbau der aktiven Zentren ähnlich. Im Folgenden soll ein Strukturvergleich beider Enzyme durchgeführt werden.

Die r.m.s.d.-Abweichung der C α -Atome von 97 strukturell konservierten Aminosäureresten in den zentralen β -Faltblattstrukturen von cMm-CNS und Nm-CNS ist 1.3 Å. Signifikante strukturelle Abweichungen werden dagegen in der Dimerisierungsdomäne und in den *loops* L1 (*P-loop*) und L13 gefunden, die Teile des aktiven Zentrums bilden (Abbildung 28a). Beiden Enzymen ist gemein, dass sich zwei ihrer Monomere mit Hilfe der Dimerisierungsdomänen zu stabilen Dimeren zusammenlagern. Eine Besonderheit der cMm-CNS besteht darin, dass sich zwei ihrer Dimere zu einem Tetramer zusammenlagern, was für das bakterielle Enzym aus *Neisseria meningitidis* nicht beobachtet wird (Abbildung 28b). Das Nm-CNS-Dimer hat eine ausgestreckte Konformation, in der die beiden Monomere nur über ihre verschränkten Dimerisierungsdomänen zusammengehalten werden. Im Gegensatz dazu schließen die Monomere im cMm-CNS-Dimer einen um 25° kleineren Winkel ein als im Nm-CNS-Dimer (Abbildung 28a, b), wodurch eine zusätzliche Kontaktfläche zwischen den C-terminalen Helices H6(A) und H6(B) gebildet wird.

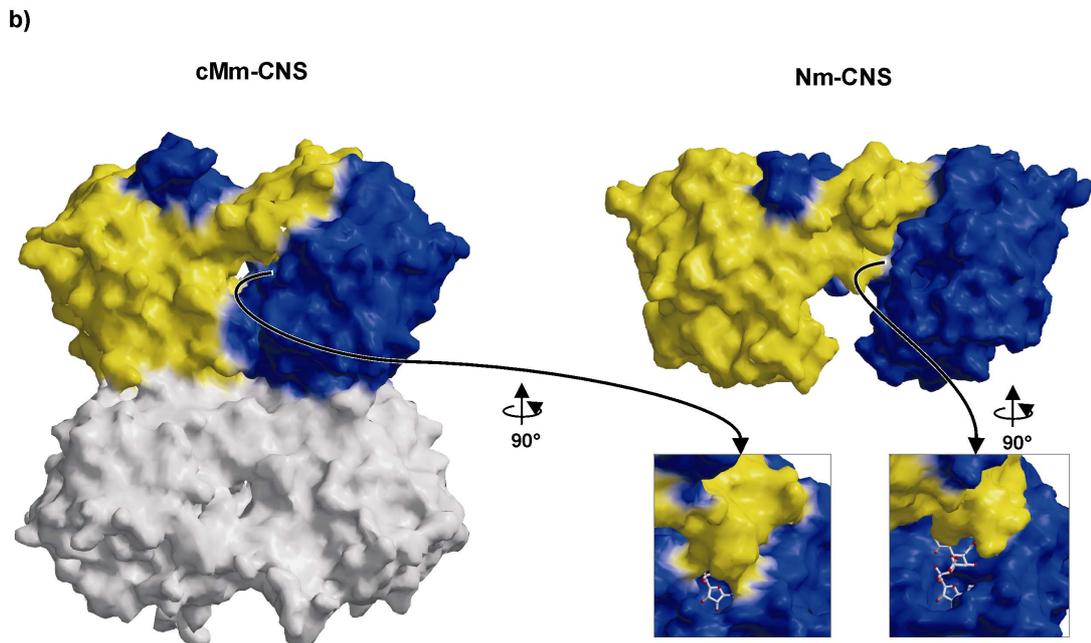
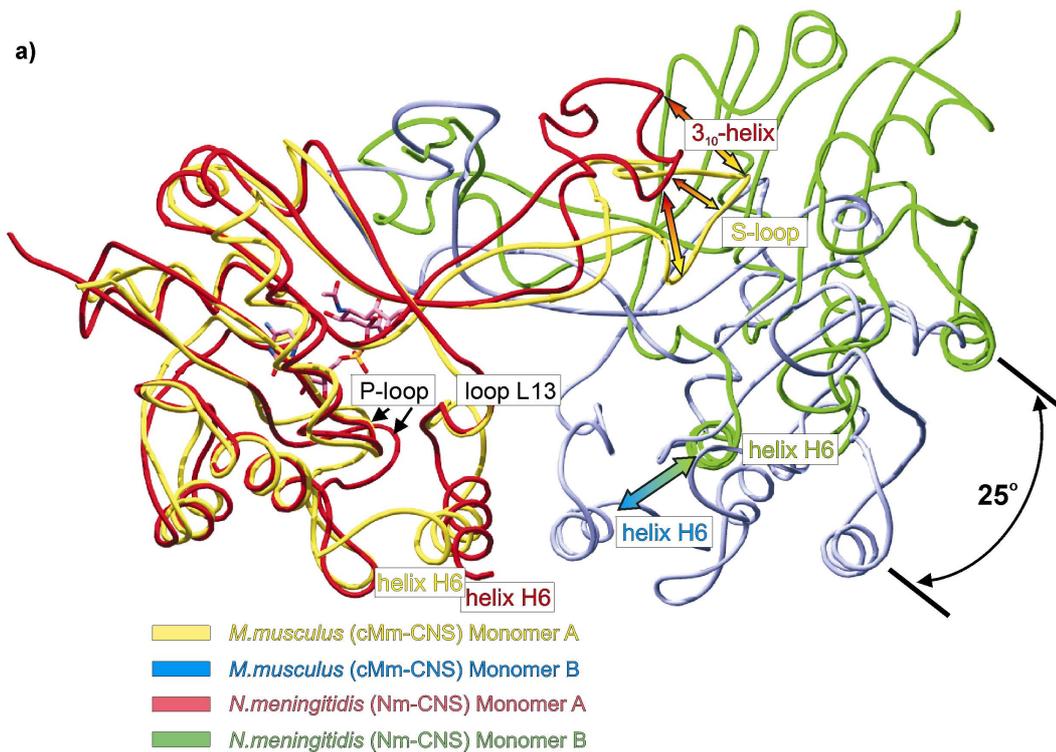


Abbildung 28: a) Überlagerung des Polypeptidrückgrades des cMm-CNS-Dimers (orange/blau) und des Nm-CNS-Dimers (rot/grün). Die auffälligsten strukturellen Änderungen sind mit Pfeilen angezeigt. Das co-kristallisierte CMP-Neu5Ac ist als Stäbchenmodell in einem der aktiven Zentren der cMm-CNS dargestellt. b) Oberflächendarstellung des cMm-CNS-Tetramers und des Nm-CNS-Dimers. Die Monomere sind in Blau und Gelb dargestellt, das zweite Dimer im cMm-CNS-Tetramer ist in Weiss dargestellt. In der Detailansicht ist der Zugang zum aktiven Zentrum dargestellt. Entsprechend des Öffnungszustandes des aktiven Zentrums ist in cMm-CNS nur ein kleiner Teil des Produktes und in Nm-CNS der größte Teil des Produktes im aktiven Zentrum zu sehen. Anhand der Position des mit Nm-CNS co-kristallisierten CDP konnte das Produkt CMP-Neu5Ac im aktiven Zentrum der Nm-CNS korrekt positioniert werden.

Bevor die strukturellen Unterschiede beider Enzyme im Detail diskutiert werden sei darauf hingewiesen, dass die cMm-CNS mit dem Produkt CMP-Neu5Ac co-kristallisiert wurde und daher einen Zustand nach dem Ablauf der katalytischen Reaktion darstellt (post-Reaktions-Zustand). Die Nm-CNS wurde dagegen mit dem Substratanalogen CDP co-kristallisiert und stellt daher den Zustand vor der Katalyse dar (prä-Reaktions-Zustand). Die Konformationen mehrerer *loops* im aktiven Zentrum der beiden Enzyme unterscheiden sich stark und scheinen daher von den co-kristallisierten Verbindungen beeinflusst zu werden. Diese Strukturunterschiede liefern neue Informationen über mögliche Strukturveränderungen während der Katalyse. Die größten strukturellen Abweichungen im aktiven Zentrum sind im Sequenzabschnitt Asn195(B)-Asp204(B) zu finden, der die in allen CNS-Enzymen konservierten Aminosäurereste Pro200, Arg202 und Gln203 enthält. Die Aminosäuren dieses Abschnittes bilden im murinen Enzym einen ausgedehnten Teil des *S-loops*, der das aktive Zentrum verschließt. Außerdem bilden die Aminosäuren Arg199(B) und Arg202(B) Kontakte zum Substrat Neu5Ac aus. Arg202(B) ist zusätzlich für die Orientierung des katalytischen Restes Asp247 wichtig. Im Gegensatz dazu bilden die Reste Ser195-Glu198 in der Nm-CNS eine 3_{10} -Helix aus, die das aktive Zentrum im geöffneten Zustand hält. Daher ist in der Nm-CNS das aktive Zentrum für Substrate zugänglich (Abbildung 28b) und die katalytisch wirksamen Aminosäuren des *S-loops* sind mehr als 5 Å weit von den für die Katalyse notwendigen Positionen entfernt. Die Diederwinkel der Aminosäuren, die den *S-loop* in cMm-CNS bzw. die 3_{10} -Helix in Nm-CNS bilden, unterscheiden sich stark. Trotzdem können die beschriebenen Sequenzabschnitte beider Enzyme sowohl einen *S-loop* als auch eine 3_{10} -Helix ausbilden, was durch Ramachandran-Plots gezeigt wurde. Daher ist anzunehmen, dass das aktive Zentrum von CNS-Enzymen zwischen einer geschlossenen katalytisch aktiven Konformation (Bsp. cMm-CNS) und einer offenen katalytisch inaktiven Konformation (Bsp. Nm-CNS) wechselt. In der geschlossenen Konformation ist das aktive Zentrum von Lösungsmittelmolekülen abgeschirmt, was die unproduktive Hydrolyse von CTP verhindert. Außerdem reicht in der geschlossenen Konformation die Seitenkette des katalytisch wichtigen Arg202(B) tief in das katalytische Zentrum hinein und stabilisiert dort durch eine Salzbrücke die Position des Asp247(A), das sich nahe der anomeren Hydroxylgruppe der Neu5Ac befindet (Abbildung 29).

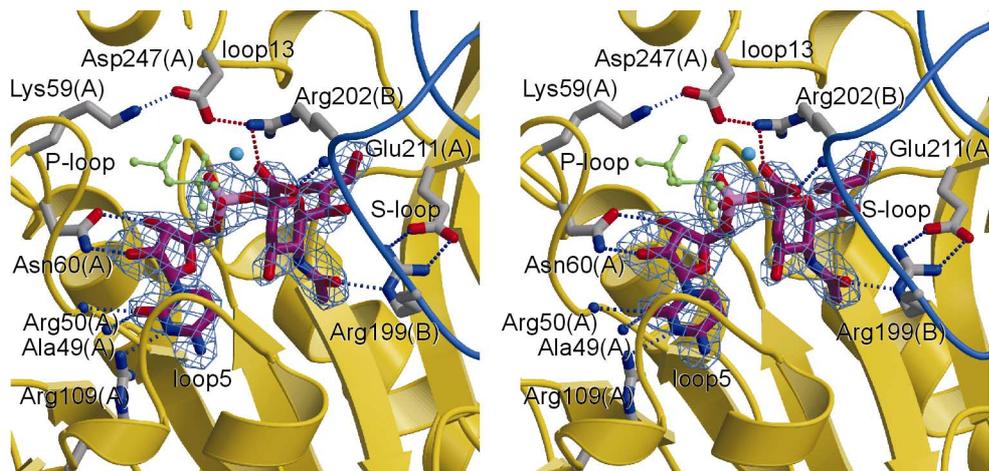


Abbildung 29: Stereoansicht des aktiven Zentrums der cMm-CNS. Das Monomer A ist in Gelb und das Monomer B in Blau dargestellt. Die für den Katalysemechanismus wichtigen Reste Asp247(A) und Arg202(B) sowie Reste, die sich an der Substratbindung und der Stabilisierung des S-loops beteiligen, sind gezeigt. Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen sind durch blaue bzw. rote gestrichelte Linien dargestellt. Das Produkt CMP-Neu5Ac ist in Rot dargestellt, das Phosphoratom in Pink. Für das Produkt CMP-Neu5Ac ist die Elektronendichte einer *annealed composite omit map* dargestellt, die bei 2.5σ konturiert ist. Zur Veranschaulichung der Positionen der α - und β -Phosphate des Substrates CTP wurden die α - und β -Phosphate des mit Nm-CNS co-kristallisierten CDP im aktiven Zentrum der cMm-CNS dargestellt.

5.2.2 Katalysemechanismus

Der Rest Asp247(A) befindet sich im aktiven Zentrum nahe der anomeren Hydroxylgruppe des Produktes Neu5Ac (Abbildung 29). Die Carboxylgruppe von Asp247(A) ist allerdings noch zu weit von der anomeren Hydroxylgruppe des Neu5Ac entfernt (4.8 \AA) um sie deprotonieren zu können. Deshalb wird davon ausgegangen, dass ein Wassermolekül, das von dem konservierten Aminosäurerest Asp247(A) koordiniert wird, als Base (*general base*) fungiert und die anomere Hydroxylgruppe deprotoniert (Abbildung 29). Ein Wassermolekül, das als *general base* fungiert, wurde bereits im Katalysemechanismus für die Nm-CNS vorgeschlagen (Mosimann et al., 2001) und konnte im aktiven Zentrum der Ec-CKS identifiziert werden (Jelakovic and Schulz, 2002). Ein katalytisches Wassermolekül ist in der Elektronendichte der cMm-CNS-Struktur nicht zu finden, da in der Struktur des cMm-CNS-CMP-Neu5Ac-Komplexes das Asp247 eine zusätzliche Salzbrückenbindung mit dem konservierten Aminosäurerest Lys59 im P-loop eingeht und daher nicht für die Positionierung eines katalytischen Wassermoleküles zur Verfügung steht. Dieser Asp247-Lys59-Kontakt kann nicht mehr aufrecht erhalten werden, wenn das Substrat CTP im aktiven Zentrum bindet, denn dann

ist das Lys59 an der Bindung des α - und β -Phosphates des CDP beteiligt, was aus der Struktur der Nm-CNS im Komplex mit CDP abgeleitet werden kann.

Ein Vergleich der Struktur von cMm-CNS im Komplex mit CMP-Neu5Ac, die den post-Reaktionszustand darstellt, mit der Struktur des Nm-CNS-CDP-Komplexes (Mosimann et al., 2001), die den prä-Reaktionszustand darstellt, erlaubt die Ableitung des folgenden Reaktionsmechanismus: CTP bindet im aktiven Zentrum der CNS und wird an den Phosphaten von Lys59(A) kontaktiert. Folglich ist die Seitenkette von Asp247(A) nicht mehr durch Lys59(A) fixiert und ist bereit, das katalytische Wassermolekül zu komplexieren. Als zweites Substrat bindet Neu5Ac an das aktive Zentrum (Samuels et al., 1999). Dabei geht die Carboxylgruppe der Neu5Ac eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Amid-Stickstoff des Restes Arg202(B) im *S-loop* ein. Dieser Kontakt führt zur Umlagerung der 3_{10} -Helix zum *S-loop*, der das aktive Zentrum verschließt. Die geschlossene Konformation wird durch drei Salzbrücken stabilisiert, die zwischen Asp247(A) und Arg202(B), zwischen Arg199(B) und Glu211(A) (Abbildung 29) und zwischen Arg201(B) und dem möglicherweise phosphorylierten Ser117(A) (Abbildung 31a) gebildet werden. Das Asp247(A) hat also eine Doppelfunktion, weil es durch den Kontakt zu Arg202(B) zum Schließen des aktiven Zentrums beiträgt und gleichzeitig das katalytische Wasser positioniert. Dieses aktivierte Wassermolekül deprotoniert die anomere Hydroxylgruppe des Neu5Ac, so dass das resultierende Oxyanion Neu5Ac-O⁻ das α -Phosphat des CTP angreifen kann. Dieser nach S_N2 verlaufende nukleophile Angriff wird dadurch begünstigt, dass Arg202(B) und ein Mg^{2+} -Ion die α - und β -Phosphate koordinieren und dabei den elektrophilen Charakter des α -Phosphates von CTP verstärken (Abbildung 30a). Weiterhin wird der pentakovalente Übergangszustand, der am α -Phosphat des CTP entsteht, durch die Guanidino-Gruppe des Arg202(B) stabilisiert, die nur 4.3 Å vom α -Phosphat des CMP-Neu5Ac entfernt ist (Abbildung 30b).

Von der Architektur des aktiven Zentrums der cMm-CNS und der Position der Phosphate im Nm-CNS-CDP-Komplex (Mosimann et al., 2001) lässt sich ableiten, dass die positiv geladenen Reste des *P-loops* (Arg50(A), Lys54(A) und Lys59(A)) die β - und γ -Phosphate bzw. das entstehende Pyrophosphat während der Katalyse stabilisieren.

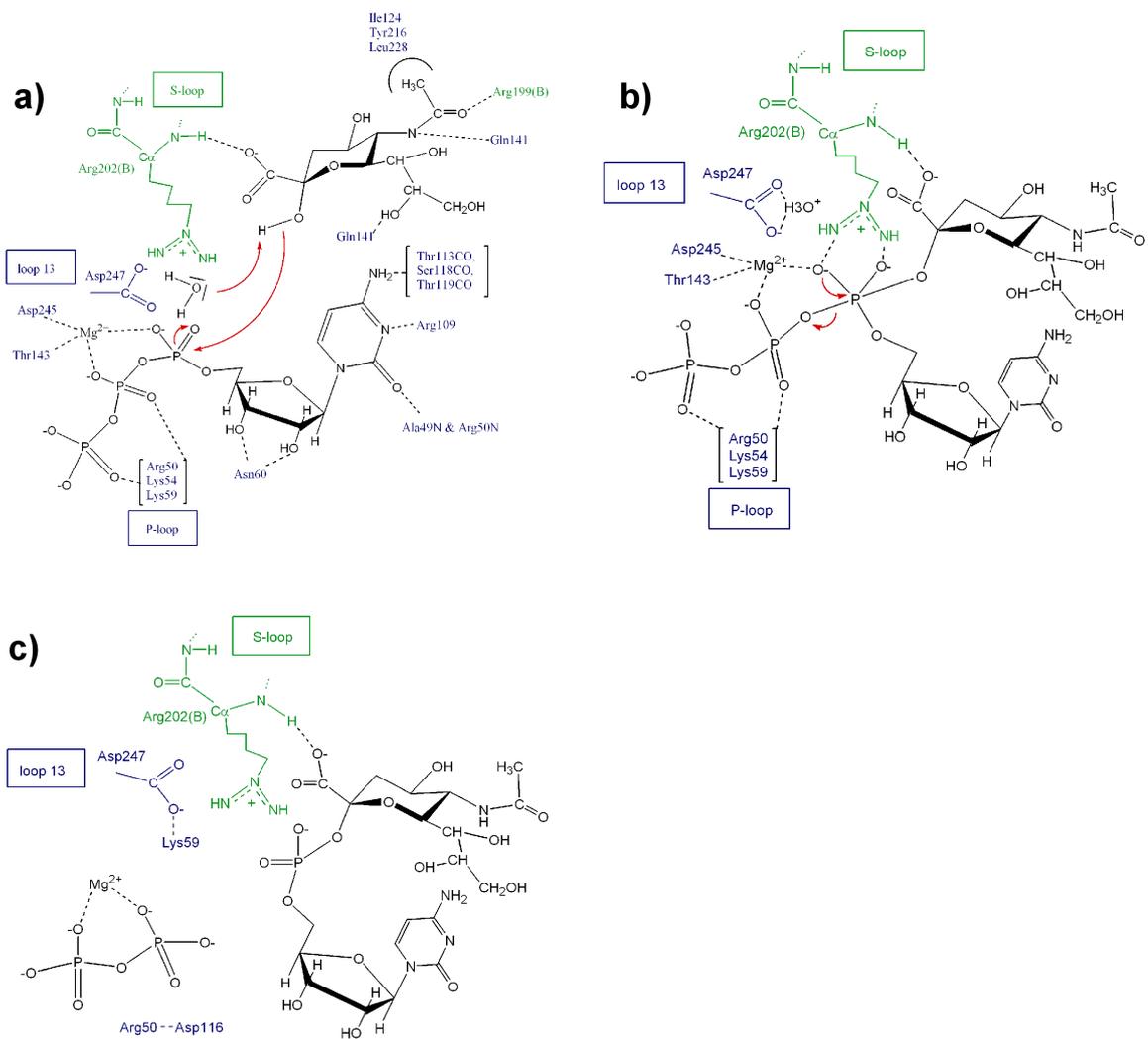


Abbildung 30: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Katalysemechanismus der cMm-CNS. Aminosäurereste aus den Monomeren A und B sind in Blau und grün dargestellt. **a)** Zustand vor der Reaktion. **b)** Pentakovalenter Übergangszustand. **c)** Zustand nach der Reaktion.

Kinetische Messungen mit *Haemophilus ducreyi*-CNS haben gezeigt, dass das Pyrophosphat das erste Produkt ist, welches das aktive Zentrum verlässt (Samuels et al., 1999). Ein Hinweis darauf, dass Pyrophosphat für das Öffnen des aktiven Zentrums entscheidend ist, ergibt sich aus der Tatsache, dass die cMm-CNS im Komplex mit CMP-Neu5Ac, also in Abwesenheit des Pyrophosphates, eine geschlossene Konformation zeigt. Es ist anzunehmen, dass die zusätzliche negative Ladung am entstehenden Pyrophosphat eine elektrostatische Abstoßung von Asp247 zur Folge hat, die in der Verdrängung des P-loops und der Freisetzung des Pyrophosphates resultiert. Nachdem das Pyrophosphat das aktive Zentrum verlassen hat, bilden die Reste Lys59 und Arg50 aus dem P-loop Salzbrücken zu den Resten Asp247 und Asp116 (Abbildung 30c). Der

katalytische Zyklus endet schließlich mit der Freisetzung von CMP-Neu5Ac, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katalyse (Samuels et al., 1999).

5.2.3 Spezifität der cMm-CNS für Neu5Ac

Kinetische Analysen belegen, dass die Mm-CNS das Substratanalogon KDN (2-keto-3-deoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-nonulosonsäure) 15-mal langsamer umsetzt als ihr natürliches Substrat Neu5Ac (Nakata et al., 2001). Im Gegensatz dazu zeigt die CMP-KDN-Synthetase aus der Regenbogenforelle [*Oncorhynchus mykiss*], (Om-CDS), hohe Umsatzraten mit beiden Substraten Neu5Ac und KDN (Terada et al., 1996).

Der charakteristische Unterschied zwischen Neu5Ac und KDN ist die *N*-Acetyl-Gruppe am Kohlenstoff C5, die in KDN durch eine Hydroxylgruppe ersetzt ist. Folglich unterscheidet die Mm-CNS zwischen Sialinsäurederivaten, die verschiedene C5-Substituenten tragen. Alle spezifischen Kontakte zwischen dem co-kristallisierten Produkt CMP-Neu5Ac und Resten der cMm-CNS sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Der Rest Arg199(B), der in eukaryotischen CNS-Enzymen konserviert ist, bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-Sauerstoff der *N*-Acetyl-Gruppe aus und trägt so zur spezifischen Bindung von *N*-Acetylneuraminsäuren bei. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung führte die Mutation Arg199Ala in Mm-CNS zu einer Reduktion der katalytischen Aktivität (Munster et al., 2002), was möglicherweise auf eine verminderte Bindungsaffinität der Neu5Ac zurückzuführen ist.

Der Aminosäurerest Arg199 ist allerdings auch in der Aminosäuresequenz der Om-CDS konserviert, die nur eine geringe Substratspezifität zeigt. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Aminosäure Arg199 in der Om-CDS eine andere Position einnimmt, da durch die Verkürzung des *loops* L12 wahrscheinlich die Wasserstoffbrücke zwischen Gln229 und Arg199 nicht mehr gebildet werden kann. Durch die Verkürzung des *loops* L12 in Om-CDS kann außerdem die spezifische Erkennung der C11-Methylgruppe der Neu5Ac beeinträchtigt werden, da in diesem Fall der Rest Leu228 wahrscheinlich nicht mehr zur Ausbildung der hydrophoben Bindungstasche für die C11-Methylgruppe beitragen kann.

Im Gegensatz zu CNS-Enzymen, die ihr Substrat in der 2C_5 -Sesselkonformation binden, wird KDO, das Substrat von Ec-CKS-Enzymen, in der 5C_2 -Sesselkonformation gebunden. Daher ist die Substratspezifität von CNS- und CKS-Enzymen nicht vergleichbar.

5.2.4 Kooperativität

In CNS-Enzymen schließt sich an den *loop* L13, der die katalytische Aminosäure Asp247 trägt, die C-terminale Helix H6 an. Außerdem zeigt die Struktur des cMm-CNS-Dimers, dass die beiden Helices H6 durch ein Salzbrückensystem miteinander in Verbindung stehen. An diesem symmetrischen Salzbrückensystem sind neben sechs Resten der beiden Helices H6 auch die beiden Reste Asp249(A, B) aus den *loops* L13 beteiligt (Abbildung 31a, b).

Wenn man davon ausgeht, dass CNS-Enzyme in zwei verschiedenen Zuständen vorkommen können, in einem ausgestreckten Zustand, der keine Wechselwirkung der Helices H6 erlaubt (Nm-CNS) und in einem abgewinkelten Zustand, der eine Anlagerung der Helices H6 ermöglicht (cMm-CNS), dann sind die Konformationen der *loops* L13 in beiden Zuständen verschieden. Tatsächlich zeigt ein Vergleich der cMm-CNS und der Nm-CNS, dass sich die *loops* L13 um 2-5 Å unterscheiden und dass die Peptidbindung zwischen Ile246 und Asp247 um 180 ° gedreht ist. Diese Umordnung des *loops* L13 beeinflusst die Position des katalytischen Restes Asp247.

Da das Salzbrückensystem zwischen den Helices H6 symmetrisch ist, werden Konformationsänderungen im *loop* L13 immer gleichzeitig in beiden Monomeren induziert. Weiterhin müssen die beiden in einem Tetramer vereinten cMm-CNS-Dimere dieselbe gestreckte oder abgewinkelte Konformation einnehmen, weil der Zustand des AB-Monomers durch das 4-Helix-Bündel und weitere hydrophobe Kontaktbereiche auf das CD-Monomer übertragen wird (siehe oben). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die *loops* L13 in den vier aktiven Zentren im gleichen aktiven oder inaktiven Zustand vorliegen.

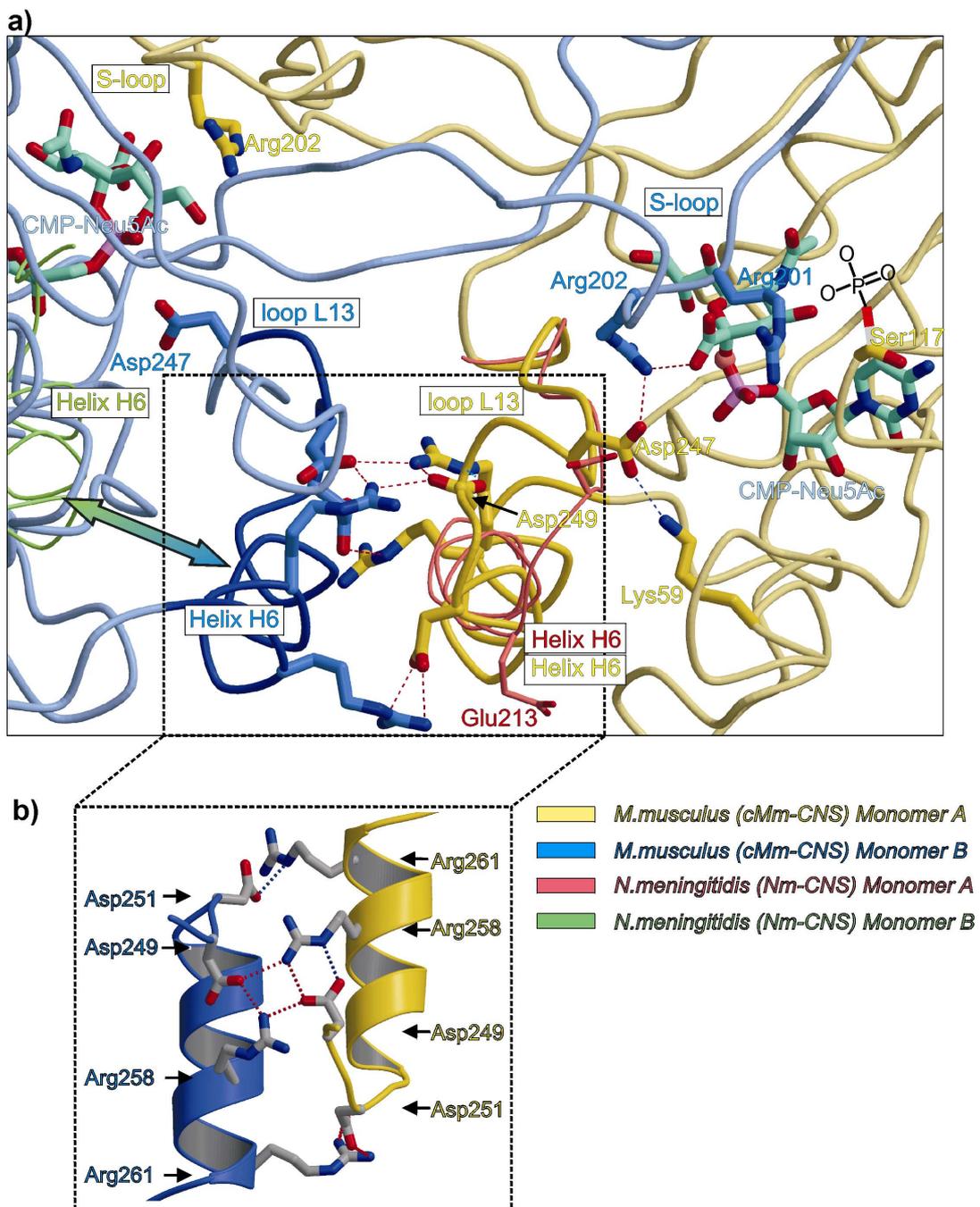


Abbildung 31: Darstellung der H6-H6-Kontaktregion im cMm-CNS-Dimer. a) Die Helices H6 und die loops L13 der Monomere A und B von cMm-CNS sind gelb bzw. blau dargestellt. Die Helices H6 des Nm-CNS-Dimers, das mit dem Monomer A der cMm-CNS überlagert wurde, sind grün und rot dargestellt. Das Produkt CMP-Neu5Ac im aktiven Zentrum des cMm-CNS-Monomers A ist als Stäbchenmodell dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien in Blau bzw. in Rot dargestellt. Die möglicherweise phosphorylierte Seitenkette von Ser117 ist schematisch dargestellt. b) Detailansicht des Helix H6-Kontaktes, mit den Resten, die zu dem Salzbrückensystem beitragen.

Wenn wir annehmen, dass die gleichzeitige Umlagerung des Restes Asp247 in den vier Monomeren die katalytische Aktivität der cMm-CNS beeinflusst, dann resultiert daraus ein stark kooperatives Verhalten des Enzyms.

Es kann spekuliert werden, dass der Übergang von der 3_{10} -Helix zum *S-loop* und umgekehrt die Tendenz des Dimers beeinflusst, eine abgewinkelte oder gestreckte Konformation einzunehmen. Die Beobachtung, dass die Besetzung der vier aktiven Zentren zwischen 0.4 und 1.0 liegt (Tabelle 7), dass aber trotzdem alle aktiven Zentren im geschlossenen Zustand vorliegen, weist allerdings darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen der Konformation des Dimers und der Ausbildung des *S-loops* gibt. Die beschriebenen Hypothesen zur kooperativen Arbeitsweise der cMm-CNS müssen allerdings noch durch kinetische Messungen bewiesen werden.

Da im Nm-CNS-Dimer die Reste, die sich an dem Salzbrückensystem zwischen den Helices H6 beteiligen, nicht konserviert sind, zeigt das Enzym vermutlich auch keine Kooperativität.

5.2.5 Regulation und Phosphorylierung

Es ist bereits mehrfach gezeigt worden, dass sich das Verteilungsmuster von Sialinsäuren auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen beispielsweise während der Entwicklung und Differenzierung ändert. Es ist daher anzunehmen, dass der Bedarf an aktivierten Sialinsäuren im Lebenszyklus einer Zelle schwankt und deshalb reguliert werden muss (Muchmore, 1992; Schauer, 1995).

Ein erster Hinweis auf einen möglichen Regulationsmechanismus der cMm-CNS ergab sich aus der Beobachtung, dass sich alle Neu5Ac-aktivierenden Enzyme, von Fischen bis zu den Säugetieren, aus einer N-terminalen CMP-Neu5Ac-Synthetasedomäne und einer C-terminalen Domäne mit ungeklärter Funktion zusammensetzen. Im Gegensatz dazu wurde in den CNS-Enzymen der meisten Bakterien, z. B. *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* keine C-terminale Domäne gefunden. Eine Ausnahme bildet die CNS aus *Streptococcus agalactiae* (Serogroup III), die eine zusätzliche C-terminale Domäne besitzt, welche aber keine Sequenzähnlichkeit zu C-terminalen Domänen von Säuger-CNS-Enzymen aufweist. Die Suche nach Proteinsequenzen, die Ähnlichkeit zum C-terminalen Teil der cMm-CNS aufweisen, ergab eine 24-32 %ige Identität zu einem Protein unbestimmter Funktion (*open reading frame*), das in den verschiedenen

Bakteriengattungen *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Escherichia* und *Vibrio* vorkommt und YrbI genannt wird. Das in *Haemophilus influenzae* identifizierte YrbI-Gen kodiert für ein Protein, das eine entfernte Sequenz-Verwandtschaft zu einer Phosphoserin-Phosphatase aufweist, die zur L-2-haloacid-Dehalogenase (HAD)-Superfamilie gehört (Parsons et al., 2002). Interessanterweise liegt dieses YrbI-Gen auf demselben Operon im direkten Anschluss an das Gen YrbH, das für ein Protein kodiert, das in *Haemophilus influenzae* die Bezeichnung „*polysialic acid expression protein*“ trägt und zu 25.4 % mit der cMm-CNS übereinstimmt. Das Vorkommen von YrbI und YrbH im selben Operon lässt vermuten, dass es einen funktionellen und/oder regulatorischen Zusammenhang zwischen beiden Proteinen in bakteriellen Systemen gibt. Die Kristallstruktur des YrbI-Proteins aus *H. influenzae* (Parsons et al., 2002) zeigt ein typisches Phosphatase-Faltungsmotiv. Durch Phosphatase-Aktivitätstests wurde nachgewiesen, dass das YrbI-Protein die Substrate 6-Phosphogluconat und Phosphotyrosin dephosphorylieren kann, was die Hypothese stützt, dass das YrbI-Protein *in vivo* als Phosphatase wirkt. Wie bereits erwähnt, ist die CNS aus höheren Eukaryoten ein zusammengesetztes Protein, dessen N-terminaler Teil Sequenzähnlichkeit zu YrbH und dessen C-terminaler Teil Sequenzähnlichkeit zu YrbI zeigt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der C-terminale Teil der Mm-CNS eine Phosphatase darstellt, die eventuell für die regulatorische Dephosphorylierung des N-terminalen katalytisch aktiven Teils der Mm-CNS verantwortlich ist.

Der N-terminale katalytisch aktive Teil der Mm-CNS enthält sechs Serinreste, einen Threoninrest und drei Tyrosinreste, die als mögliche regulatorische Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden. Besonders Ser117, das in einer Casein-Kinase-II-Erkennungssequenz (TS¹¹⁷KD) oder einer Protein-Kinase-C-Erkennungssequenz (TS¹¹⁷K) liegt, ist prädestiniert für eine regulatorische Phosphorylierung. Der Rest Ser117(A) (Abbildung 31a) liegt an der Kontaktstelle zwischen dem *S-loop* und Resten des aktiven Zentrums. Ein phosphoryliertes Ser117(A) könnte eine Salzbrücke zu Arg201(B) ausbilden und damit zur Stabilisierung der *S-loop*-Konformation und zur Schließung des aktiven Zentrums beitragen.

5.2.6 Zusammenfassung cMm-CNS

Enzyme, die irreversible metabolische Reaktionen katalysieren, unterliegen normalerweise einer starken Regulation. Prokaryotische Enzyme werden in der Regel von den Substraten aktiviert und von den Reaktionsprodukten inhibiert. Eukaryotische Enzyme werden zusätzlich zu diesen relativ unspezifischen Regulationsmechanismen oft durch extrazelluläre Signale gesteuert, die z. B. vom Hormonspiegel im Organismus und dem Entwicklungsstadium der Zelle abhängen.

Die Mm-CNS scheint ein Schlüsselenzym im Sialinsäurestoffwechsel zu sein, weil sie einen irreversiblen metabolischen Schritt katalysiert und wahrscheinlich einer komplexen Regulation unterworfen ist. Die Struktur der murinen CNS zeigt im Vergleich zu den bakteriellen Homologen einen klaren Trend zu besserer Regulierbarkeit. Dagegen zeigt ein struktureller Vergleich der beiden Ec-CKS-Komplexe mit dem Substrat CTP oder dem Produkt CMP-KDO nur kleine Konformationsänderungen im Bereich von 1 - 2 Å. Daher können die Reste Asp225(A) und Arg162(B), die im aktiven Zentrum äquivalente Positionen zu Asp247(A) und Arg202(B) der cMm-CNS einnehmen, keinen Kontakt zueinander herstellen. Die Ec-CKS könnte also permanent in einem offenen Zustand vorliegen, was eine wirksame Regulation verhindern und unspezifische Seitenreaktionen, wie die CTP-Hydrolyse erlauben würde. Da alle Kristalle, die für die Strukturlösung von Ec-CKS verwendet wurden, zur Raumgruppe (P2₁) gehören (Jelakovic and Schulz, 2002), kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der in (P2₁) bestehenden Kristallkontakte die Ec-CKS nur mit offenem aktiven Zentrum kristallisiert wurde, dass das Enzym aber in Lösung alternativ im geschlossenen Zustand vorkommen kann.

In Nm-CNS und Mm-CNS wird der Öffnungszustand des aktiven Zentrums vermutlich durch das alternative Auftreten des *S-loops* oder der 3₁₀-Helix gesteuert. Außerdem hat die Dimerisierung funktionelle Bedeutung, denn zur Ausbildung des aktiven Zentrums tragen Reste beider Monomere bei und die Konformation des *loops* L13 im aktiven Zentrum hängt von der Orientierung der Monomere im Dimer ab. Außerdem gibt die cMm-CNS-Struktur einen Hinweis darauf, dass die aktiven Zentren des cMm-CNS-Tetramers kooperativ zusammenwirken und die Enzymaktivität möglicherweise durch reversible Phosphorylierung reguliert wird.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ambrose, M.G., Freese, S.J., Reinhold, M.S., Warner, T.G. and Vann, W.F. (1992) ¹³C NMR investigation of the anomeric specificity of CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **31**, 775-80.
- Anderson, C.L., Shen, L., Eicher, D.M., Wewers, M.D. and Gill, J.K. (1990) Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J. Exp. Med.*, **171**, 1333-45.
- Anegón, I., Cuturi, M.C., Trinchieri, G. and Perussia, B. (1988) Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, **167**, 452-72.
- Angata, T. and Varki, A. (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev.*, **102**, 439-69.
- Blankenfeldt, W., Asuncion, M., Lam, J.S. and Naismith, J.H. (2000) The structural basis of the catalytic mechanism and regulation of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA). *Embo J.*, **19**, 6652-63.
- Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.*, **294**, 1351-62.
- Blundell, T.L. and Johnson, L.N. (1976) *Protein Crystallography*. Academic Press, London.
- Bratosin, D., Mazurier, J., Debray, H., Lecocq, M., Boilly, B., Alonso, C., Moisei, M., Molas, C. and Montreuil, J. (1995) Flow cytometric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins. Evidence that sialic acids control their life span. *Glycoconj. J.*, **12**, 258-67.
- Brown, K., Pompeo, F., Dixon, S., Mengin-Lecreux, D., Cambillau, C. and Bourne, Y. (1999) Crystal structure of the bifunctional N-acetylglucosamine 1-phosphate uridylyltransferase from *Escherichia coli*: a paradigm for the related pyrophosphorylase superfamily. *Embo J.*, **18**, 4096-107.

- Brünger, A.T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472-5.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.*, **D54**, 905-21.
- Burton, D.R. and Woof, J.M. (1992) Human antibody effector function. *Adv. Immunol.*, **51**, 1-84.
- Carter, C.W., Jr. and Carter, C.W. (1979) Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12219-23.
- CCP4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography Collaborative Computational Project, Number 4. *Acta Cryst.*, **D50**, 760-3.
- Creek, K.E. and Morre, D.J. (1981) Translocation of cytidine 5'-monophosphosialic acid across Golgi apparatus membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **643**, 292-305.
- Daniel, L., Trouillas, J., Renaud, W., Chevallier, P., Gouvernet, J., Rougon, G. and Figarella-Branger, D. (2000) Polysialylated-neural cell adhesion molecule expression in rat pituitary transplantable tumors (spontaneous mammatropic transplantable tumor in Wistar-Furth rats) is related to growth rate and malignancy. *Cancer Res.*, **60**, 80-5.
- de La Fortelle, E. and Bricogne, G. (1997) Maximum Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods. *Meth. Enzymol.*, **276**, 472-94.
- Deisenhofer, J. (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry*, **20**, 2361-70.
- Deisenhofer, J., Colman, P.M., Huber, R., Haupt, H. and Schwick, G. (1976) Crystallographic structural studies of a human Fc-fragment. I. An electron-density map at 4 Å resolution and a partial model. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.*, **357**, 435-45.

- Dell, A., Morris, H.R., Easton, R.L., Patankar, M. and Clark, G.F. (1999) The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 196-205.
- Drenth, J. (1994) *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer Verlag, New York.
- Eckhardt, M., Bukalo, O., Chazal, G., Wang, L., Goridis, C., Schachner, M., Gerardy-Schahn, R., Cremer, H. and Dityatev, A. (2000) Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J. Neurosci.*, **20**, 5234-44.
- Eckhardt, M., Gotza, B. and Gerardy-Schahn, R. (1999) Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *J. Biol. Chem.*, **274**, 8779-87.
- Eckhardt, M., Muhlenhoff, M., Bethe, A., Koopman, J., Frosch, M. and Gerardy-Schahn, R. (1995) Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature*, **373**, 715-8.
- Engh, R.A.u.H., R. (1991) Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein-Structure Refinement. *Acta Cryst.*, **A47**, 392-400.
- Esnouf, R.M. (1997) An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph. Model.*, **15**, 132-4.
- Ewald, P.P. (1921) Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.*, **56**, 491-500.
- Fanger, M.W., Graziano, R.F., Shen, L. and Guyre, P.M. (1989) Fc gamma R in cytotoxicity exerted by mononuclear cells. *Chem. Immunol.*, **47**, 214-53.
- Figarella-Branger, D., Dubois, C., Chauvin, P., De Victor, B., Gentet, J.C. and Rougon, G. (1996) Correlation between polysialic-neural cell adhesion molecule levels in CSF and medulloblastoma outcomes. *J. Clin. Oncol.*, **14**, 2066-72.
- Fridman, W.H. (1993) Regulation of B-cell activation and antigen presentation by Fc receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, **5**, 355-60.
- Friend, P.J., Hale, G., Chatenoud, L., Rebello, P., Bradley, J., Thiru, S., Phillips, J.M. and Waldmann, H. (1999) Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. *Transplantation*, **68**, 1632-7.

- Guyre, C.A., Barreda, M.E., Swink, S.L. and Fanger, M.W. (2001) Colocalization of Fc gamma RI-targeted antigen with class I MHC: implications for antigen processing. *J. Immunol.*, **166**, 2469-78.
- Hoppe, W. (1957) Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse von Biflorin. *Z. Elektrochem.*, **61**, 1076-83.
- Huber, R. (1965) Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta. Cryst.*, **19**, 353-6.
- Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matsushima, M. and Palm, W. (1976) Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature*, **264**, 415-20.
- Inoue, S. and Inoue, Y. (2001) Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains. *J. Biol. Chem.*, **276**, 31863-70.
- Jefferis, R., Lund, J., Mizutani, H., Nakagawa, H., Kawazoe, Y., Arata, Y. and Takahashi, N. (1990) A comparative study of the N-linked oligosaccharide structures of human IgG subclass proteins. *Biochem. J.*, **268**, 529-37.
- Jelakovic, S. and Schulz, G.E. (2002) Catalytic mechanism of CMP:2-keto-3-deoxy-manno-octonic acid synthetase as derived from complexes with reaction educt and product. *Biochemistry*, **41**, 1174-81.
- Kleywegt, G.J. (1999) Experimental assessment of differences between related protein crystal structures. *Acta Cryst.*, **D55**, 1878-84.
- Kojima, N., Tachida, Y. and Tsuji, S. (1997) Two polysialic acid synthases, mouse ST8Sia II and IV, synthesize different degrees of polysialic acids on different substrate glycoproteins in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**, 1265-73.
- Kraulis, P.J. (1993) MOLSCRIPT - A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Scientist.*, **7**, 16-16.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Laskowski, R.A. (2001) PDBsum: summaries and analyses of PDB structures. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 221-2.

- Laskowski, R.A., McArthur, M.W., Moss, D.S. und Thornton, J.M. (1993) PROCHECK - A Programm to che check the stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-91.
- Mandrell, R.E. and Apicella, M.A. (1993) Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiology*, **187**, 382-402.
- Matsuda, H., Nakamura, S., Ichikawa, Y., Kozai, K., Takano, R., Nose, M., Endo, S., Nishimura, Y. and Arata, Y. (1990) Proton nuclear magnetic resonance studies of the structure of the Fc fragment of human immunoglobulin G1: comparisons of native and recombinant proteins. *Mol. Immunol.*, **27**, 571-9.
- McPherson, A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.*, **189**, 1-23.
- Mimura, Y., Church, S., Ghirlando, R., Ashton, P.R., Dong, S., Goodall, M., Lund, J. and Jefferis, R. (2000) The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol. Immunol.*, **37**, 697-706.
- Mimura, Y., Sondermann, P., Ghirlando, R., Lund, J., Young, S.P., Goodall, M. and Jefferis, R. (2001) Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45539-47.
- Mosimann, S.C., Gilbert, M., Dombrowski, D., To, R., Wakarchuk, W. and Strynadka, N.C. (2001) Structure of a sialic acid-activating synthetase, CMP-acylneuraminate synthetase in the presence and absence of CDP. *J. Biol. Chem.*, **276**, 8190-6.
- Muchmore, E. (1992) Developmental sialic acid modifications in rat organs. *Glycobiology*, **2**, 337-43.
- Muhlenhoff, M., Manegold, A., Windfuhr, M., Gotza, B. and Gerardy-Schahn, R. (2001) The impact of N-glycosylation on the functions of polysialyltransferases. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34066-73.
- Munster, A.K., Eckhardt, M., Potvin, B., Muhlenhoff, M., Stanley, P. and Gerardy-Schahn, R. (1998) Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 9140-5.

- Munster, A.K., Weinhold, B., Gotza, B., Muhlenhoff, M., Frosch, M. and Gerardy-Schahn, R. (2002) Nuclear localization signal of murine CMP-Neu5Ac synthetase includes residues required for both nuclear targeting and enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, **277**, 19688-96.
- Nakata, D., Munster, A.K., Gerardy-Schahn, R., Aoki, N., Matsuda, T. and Kitajima, K. (2001) Molecular cloning of a unique CMP-sialic acid synthetase that effectively utilizes both deaminoneuraminic acid (KDN) and N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) as substrates. *Glycobiology*, **11**, 685-92.
- Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.*, **A50**, 157-63.
- Otwinowski, Z., Minor, W. (1996) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.*, **276**, 307-26.
- Parsons, J.F., Lim, K., Tempczyk, A., Krajewski, W., Eisenstein, E. and Herzberg, O. (2002) From structure to function: YrbI from *Haemophilus influenzae* (HI1679) is a phosphatase. *Proteins*, **46**, 393-404.
- Poongodi, G.L., Suresh, N., Gopinath, S.C., Chang, T., Inoue, S. and Inoue, Y. (2002) Dynamic change of neural cell adhesion molecule polysialylation on human neuroblastoma (IMR-32) and rat pheochromocytoma (PC-12) cells during growth and differentiation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 28200-11.
- Potvin, B., Raju, T.S. and Stanley, P. (1995) Lec32 is a new mutation in Chinese hamster ovary cells that essentially abrogates CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30415-21.
- Pound, J.D., Lund, J. and Jefferis, R. (1993) Human Fc gamma RI triggering of the mononuclear phagocyte respiratory burst. *Mol. Immunol.*, **30**, 469-78.
- Ravetch, J.V. and Kinet, J.P. (1991) Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **9**, 457-92.
- Richard, S.B., Bowman, M.E., Kwiatkowski, W., Kang, I., Chow, C., Lillo, A.M., Cane, D.E. and Noel, J.P. (2001) Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C- methylerythritol synthetase involved in mevalonate- independent isoprenoid biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 641-8.
- Roseman, S. (1968) Studies on the biosynthesis of sialic acid, sialoglycoproteins, and gangliosides. *Univ. Mich. Med. Cent. J.*, 252-4.

- Rossmann, M.G. u. B., D.M. (1962) The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Actas. Cryst.*, **15**, 24-31.
- Samuels, N.M., Gibson, B.W. and Miller, S.M. (1999) Investigation of the kinetic mechanism of cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase from *Haemophilus ducreyi* with new insights on rate-limiting steps from product inhibition analysis. *Biochemistry*, **38**, 6195-203.
- Saphire, E.O., Stanfield, R.L., Crispin, M.D.M., Parren, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Burton, D.R. and Wilson, I.A. (2002) Contrasting IgG structures reveal extreme asymmetry and flexibility. *J. Mol. Biol.*, **319**, 9-18.
- Sarmay, G., Lund, J., Rozsnyay, Z., Gergely, J. and Jefferis, R. (1992) Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc gamma receptor. *Mol. Immunol.*, **29**, 633-9.
- Schauer, R. (1995) Biology of the sialic acids. *Plenum Press*.
- Schauer, R. (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj. J.*, **17**, 485-99.
- Seidenfaden, R., Gerardy-Schahn, R. and Hildebrandt, H. (2000) Control of NCAM polysialylation by the differential expression of polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *Eur. J. Cell. Biol.*, **79**, 680-8.
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A. and Presta, L.G. (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.*, **276**, 6591-604.
- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V. and Jacob, U. (2000) The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature*, **406**, 267-73.
- Steenbergen, S.M. and Vimr, E.R. (2003) Functional relationships of the sialyltransferases involved in expression of the polysialic acid capsules of *Escherichia coli* K1, K92 and *Neisseria meningitidis* groups B or C. *J. Biol. Chem.*, **10**, 10.

- Stevenson, G.T., Eady, R.P., Hough, D.W., Jurd, R.D. and Stevenson, F.K. (1975) Surface immunoglobulin of guinea-pig leukaemic lymphocytes. *Immunology*, **28**, 807-20.
- Stout, G.H. and Jensen, L.H. (1989) *X-ray structure determination*. John Wiley, New York.
- Tao, M.H. and Morrison, S.L. (1989) Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J. Immunol.*, **143**, 2595-601.
- Terada, T., Kitajima, K., Inoue, S., Koppert, K., Brossmer, R. and Inoue, Y. (1996) Substrate specificity of rainbow trout testis CMP-3-deoxy-D-glycero-D-galactono-ulosonic acid (CMP-Kdn) synthetase: kinetic studies of the reaction of natural and synthetic analogues of nonulosonic acid catalyzed by CMP-Kdn synthetase. *Eur. J. Biochem.*, **236**, 852-5.
- Terwilliger, T.C. and Berendzen, J. (1999) Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Cryst.*, **D55**, 849-61.
- Turk, D. (1992) Ph.D. Thesis. *Chemistry*. Technische Universität München, München.
- Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H. and Bailey, J.E. (1999) Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 176-80.
- van de Winkel, J.G. and Capel, P.J. (1993) Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today*, **14**, 215-21.
- Varki, A. (1992) Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*, **2**, 25-40.
- Vimr, E.R. and Troy, F.A. (1985) Regulation of sialic acid metabolism in *Escherichia coli*: role of N-acylneuraminate pyruvate-lyase. *J. Bacteriol.*, **164**, 854-60.
- Vogel, U. and Frosch, M. (2002) The genus *Neisseria*: population structure, genome plasticity, and evolution of pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **264**, 23-45.
- Wan, T., Beavil, R.L., Fabiane, S.M., Beavil, A.J., Sohi, M.K., Keown, M., Young, R.J., Henry, A.J., Owens, R.J., Gould, H.J. and Sutton, B.J. (2002) The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation. *Nat. Immunol.*, **3**, 681-6.

- Warren, L. and Blacklow, R.S. (1962) The biosynthesis of cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid by an enzyme from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.*, **237**, 3527-34.
- Womble, D.D. (2000) GCG: The Wisconsin Package of sequence analysis programs. *Meth. Mol. Biol.*, **132**, 3-22.