

Kai Timo Liesirova
Dr. med.

Kristallisation und Strukturanalyse von Glutaredoxinen und Glyoxalasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Plasmodium falciparum*

Promotionsfach: Infektiologie
Doktorvater: PD Dr. rer. nat. Marcel Deponte

Im Laufe der Evolution haben sich effektive Mechanismen zur Umwandlung schädlicher elektrophiler Verbindungen entwickelt. Hierzu zählen die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Glyoxalasen und Glutaredoxine – zwei Glutathion-abhängige Enzymsysteme, deren über die reine Entgiftungsrolle hinausreichende Bedeutung in der Zellhomöostase wir erst anfangen zu verstehen.

Das aus den Enzymen GloI und GloII bestehende Glyoxalasesystem betreibt den Abbau des toxischen Glykolysemetaboliten Methylglyoxal. Die Infektionskrankheit Malaria ist eine Erkrankung, die u.a. mit einer Anhäufung von Methylglyoxal einhergeht. Vom Malariaparasiten befallene Erythrozyten zeigten in Versuchen eine bis zu 75-fach gesteigerte Produktion von Methylglyoxal auf.

Glutaredoxine katalysieren die Glutathion-abhängige Reduktion von Disulfidbrücken und sind in die Steuerung komplexer Regelkreisläufe der Zelle eingebunden. So werden z.B. zelluläre Ungleichgewichte des Glutaredoxinsystems auch als Ursache neurodegenerativer Erkrankungen des Alters diskutiert.

Ziel dieser Arbeit war die Strukturanalyse durch Kristallisation der Glutaredoxine ScGrx6–8 aus *S. cerevisiae* und PfGrx aus *P. falciparum*, sowie der Glyoxalasen PfGloI und PfGloII. Hierzu wurden rekombinante His-tag Konstrukte der Enzyme erstellt und in *E. coli* exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über Metallaffinitätschromatographie und Gelfiltration. Die Kristallisation erfolgte nach dem Prinzip der Dampfdiffusion mittels der “hanging drop“-Methode bei 18°C und 4°C. Kristalle wurden im ESRF Grenoble und PSI Villigen analysiert. Die Datenauswertung erfolgte mittels des Molekularen Ersatzes in Kooperation mit dem BZH Heidelberg. Aktivitätsuntersuchungen von ScGrx6 wurden mittels des HEDS-Assays durchgeführt.

Kristalle von ScGrx8 lieferten aufgrund hoher Mosaizität keine brauchbaren Diffraktionsdaten. Als Ursache erscheint die Kristallisation einer Mischpopulation von flexibel konformierten Proteinen am wahrscheinlichsten. Verbesserte Protokolle mit einem verlangsamten Expressionschemata wurden getestet und die Optimierungsmöglichkeiten der Ausbeuten diskutiert.

Die hochkonzentrierte Aufreinigung von ScGrx6 zeigte die Ausbildung eines bislang nicht beschriebenen Oktamers. Bei der Kristallisation von ScGrx6 wurde eine schon beschriebene Degradation des N-Terminus beobachtet. In der Folge durchgeführte Degradationsversuche und Aktivitätsuntersuchungen im HEDS-Assay zeigten, dass eine autoproteolytische Aktivität in Abhängigkeit vom Cysteinrest im aktiven Zentrum von ScGrx6 bei Lagerung im Laufpuffer unwahrscheinlich erscheint. Versuche zur Stabilisierung von ScGrx6 mit Proteaseinhibitoren ergaben, dass die Verwendung von Roche complete EDTA-free die Degradation bis nach dem Kristallisationsfenster zeitlich verzögert und ab dann immer noch stark reduziert. Die Strukturanalyse erbrachte eine bisher nicht beschriebene asymmetrische Einheit orthorhombischer Form mit zwei enthaltenen Molekülen ScGrx6. Der N-Terminus konnte nicht aufgelöst werden. Volumenbetrachtungen der Packung lassen das mögliche Vorhandensein des N-Terminus zu, in der Elektronendichtekarte finden sich jedoch keine strukturellen Informationen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Strukturanalyse von ScGrx6 geglückt ist. Es

konnte eine neue Raumgruppe mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit dargestellt werden. Weitere neue strukturelle Erkenntnisse ergaben sich jedoch nicht. Für *PfGloI*, *PfcGloII*, *PfGrx*, *ScGrx7* und dessen angefertigte, verkürzte Konstrukte wurden Aufreinigungsprotokolle erstellt, sowie Optimierungsmöglichkeiten für die bisher erfolglose Kristallisation diskutiert. Sie stellen den Ausgangspunkt für weitergehende kristallographische Untersuchungen dar.