

Kristallstrukturanalyse
der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*

Die erste dreidimensionale Struktur einer Glycosyltransferase,
die die Bildung großer zyklischer Amylose katalysiert.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von
Ingo Przylas
aus Berlin

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1996 bis April 2000 unter Anleitung von Dr. Norbert Sträter und Prof. Dr. Wolfram Saenger im Institut für Kristallographie der Freien Universität Berlin im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Höhne

Eingereicht: 29.08.2000

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2000

Abstract

Carbohydrates are essential components of all living organisms and form the most abundant class of biological molecules. Polysaccharides such as starch are an important food reserve in plants and a major nutrient for animals. Whereas higher plants synthesize starch, bacteria, lower eukaryotes and animals accumulate glycogen. Due to the important biological role of these polysaccharides for energy storage and uptake, selective hydrolysis and formation of glycosidic bonds are critical steps for all organisms. Thus, various enzymes have been identified to act on starch. Amylomaltase catalyses the transglycosylation reaction of α -1,4-glucans and is a member of the α -amylase family of enzymes.

The crystal structure of amylomaltase from *Thermus aquaticus* was determined by multiple isomorphous replacement to 2.0 Å resolution and in complex with acarbose, a maltotetraose derivative, to 1.9 Å resolution. As a member of the α -amylase family the core structure of amylomaltase consists of a $(\beta, \alpha)_8$ barrel. In amylomaltase, the eight-fold symmetry of this barrel is disrupted by several insertions between the barrel strands. The largest insertions are between the third and fifth barrel strands, where two insertions form subdomain B1, as well as between the second and third barrel strands, forming the α -helical subdomain B2. Whereas part of subdomain B1 is also present in other enzyme structures of the α -amylase family, subdomain B2 is unique to amylomaltase. Remarkably, the C-terminal domain C, which is present in all related enzymes of the α -amylase family and essential for their catalytic activity, is missing in amylomaltase. The catalytic side chains (two Asp and one Glu) of amylomaltase show a similar arrangement as in previously characterized members of the α -amylase family, indicating similar mechanisms of the glycosyl transfer reaction. A unique feature of amylomaltase is its ability to catalyse the formation of cyclic amylose. In contrast to the well studied cyclodextrin glucanotransferases (CGTases), which synthesize cycloamylose with a ring size of 6-8, the amylomaltase from *Thermus aquaticus* produces cycloamyloses with a size of 22 glucose residues and higher. In the inhibitor bound structure of amylomaltase, two binding sites for acarbose were located. The analysis of these binding sites, the molecular surface and a comparison to related amylomaltase sequences revealed a possible binding mode for large amylose substrates and suggested candidates for amino acids, Tyr-54 and amino acids within the 250s and 460s loop, which might be varied by mutagenesis in order to influence the cyclization yield and the product ring size.

Danksagung

Diese Arbeit hätte in der vorliegenden Form nicht entstehen können ohne den Rat, Hilfe und Ermutigung zahlreicher Personen, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Prof. Dr. Wolfram Saenger für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe; durch seine Anregungen, sein Vertrauen und insbesondere das in ideeller und auch materieller Hinsicht freie Arbeiten wurde ein Umfeld geschaffen, das diese Dissertation ermöglicht hat.

Dr. Norbert Sträter, der für alle Diskussionen, egal ob wissenschaftlicher oder privater Natur, immer ein "offenes Ohr" gehabt hat. Seine Ratschläge und tatkräftige Hilfe bei allen kristallographischen Fragestellungen haben sehr viel zu dieser Arbeit beigetragen.

Claudia Alings für ihre unermüdlichen Anstrengungen, immer wieder neue, bessere Kristalle der Amylomaltase zu züchten.

Dr. Koji Tomoo für dessen Arbeit an der Darstellung der vielen Schweratomderivate.

Dr. Takeshi Takaha und *Yoshinobu Terada* von Glico Co., Japan für die äußerst enge und fruchtbare Zusammenarbeit an diesem Projekt und ihre Einladung nach Osaka.

Dr. Katrin Geßler, die nicht nur maßgeblich bei der Initiierung dieses Projektes beteiligt war, sondern mir auch bei sehr kritischen Angelegenheiten speziell mit G.B. beigestanden hat. Außerdem waren ihre Anregungen und Kommentare bei der Durchsicht dieser Arbeit außerordentlich hilfreich.

Dr. Thomas Knöfel und *Dr. Peter Orth* für ihre Freundschaft und Hilfe innerhalb und außerhalb des Labors.

Dr. Frank Bernhard für dessen Hilfe bei allen biochemischen Fragestellungen, *Dr. Franke* für die Aufnahme von MALDI-Massenspektren, *Dr. Werner Schröder* für die Durchführung des Aminosäureabbaus und *Frau Krems* für die Erledigung zahlreicher bürokratischer Aufgaben.

Mein Dank außerhalb des Labors gilt:

Meiner *Familie*, besonders meinen *Eltern*, die mich stets gefördert haben, mir bei meinen Entscheidungen immer zur Seite standen und mir - lieber selbst verzichtend - geholfen haben, meinen Weg zu gehen.

Und *Susanne Kluth*, die mich in den letzten drei Jahren meiner Studienzzeit sowie in den ersten beiden schwierigen Jahren der Doktorarbeit begleitet und mir sehr viel gegeben hat.

Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| Å | Ångström, 0.1 nm |
| °C | Grad Celsius |
| AU | Asymmetrische Einheit (<i>asymmetric unit</i>) |
| B-Faktor | Temperaturfaktor |
| C-terminal | carboxyl-terminal |
| CD | Cyclodextrin |
| CGTase | Cyclodextrin-Glucanotransferase |
| D-Enzym | Disproportionierungs-Enzym |
| Da | Dalton, g/mol |
| DESY | Deutsches Elektronen-Synchrotron |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DP | Polymerisationsgrad in Glucoseeinheiten (<i>degree of polymerization</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMBL | Europäisches Molekularbiologisches Labor (<i>european molecular biology laboratory</i>) |
| Hepes | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| Indels | Insertionen bzw. Deletionen in einem Sequenzalignment |
| IPTG | Isopropylthiogalactosid |
| 3KB-CNP-β-G5 | 2-Chloro-4-nitrophenyl-4,6-O-3-ketobutyliden-β-maltopentaosid |
| MAD | multiple anomale Dispersion |
| MALDI-MS | <i>matrix assisted laser desorption ionization</i> -Massenspektrometrie |
| MIR | multipler isomorpher Ersatz (<i>multiple isomorphous replacement</i>) |
| N-terminal | amino-terminal |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PDB | Protein-Datenbank |
| PEG8000 | Polyethylenglykol mit einer mittleren Molmasse von 8000 g/mol |
| rmsd | Standard-Abweichung (<i>root mean square deviation</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>) |
| σ _{rms} | Standard-Abweichung auf eins normiert. |

| | |
|-------------------|--|
| SV | Säulenvolumen |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tris-HCl | Durch Zugabe von Salzsäure auf einen bestimmten pH-Wert eingestellte Lösung von Tris |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| UV ₂₈₀ | Ultraviolette Absorption bei 280 nm |
| (v/v) | Verhältnis des Volumen [l] einer Substanz zum Gesamtvolumen [l] |
| (w/v) | Verhältnis der Masse [kg] einer Substanz zum Gesamtvolumen [l]. |

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.1 | Polysaccharide | 1 |
| 1.1.1 | D-(+)-Glucose | 1 |
| 1.1.2 | Polymeraufbau mit Glucose | 2 |
| 1.1.2.1 | Cellulose | 2 |
| 1.1.2.2 | Stärke | 3 |
| 1.1.2.3 | Glykogen | 3 |
| 1.2 | Metabolismus der Stärke | 3 |
| 1.2.1 | Der Stärkeanabolismus | 3 |
| 1.2.2 | Der Stärkekatabolismus | 4 |
| 1.3 | Die Amylomaltase | 4 |
| 1.3.1 | Vorkommen | 4 |
| 1.3.2 | Klassifizierung | 5 |
| 1.3.3 | Katalytische Eigenschaften | 5 |
| 1.3.4 | Physiologische Bedeutung | 7 |
| 1.3.5 | Biochemisch verwandte Enzyme | 8 |
| 1.4 | Industrielle Anwendung der Stärke-prozessierenden Enzyme und deren Produkte | 9 |
| 1.5 | Zielsetzung | 10 |

MATERIALIEN UND METHODEN

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.1 | Materialien | 11 |
| 2.1.1 | Bakterielle Stämme | 11 |
| 2.1.2 | Expressionsvektoren | 11 |
| 2.1.3 | Lösungen und Puffer | 11 |
| 2.1.4 | Nährmedien für die Zellanzucht | 12 |
| 2.1.5 | Chemikalien und Proteine | 13 |
| 2.2 | Biochemische Methoden | 13 |
| 2.2.1 | Umklonierung des <i>malQ</i> -Gens in Methionin-auxotrophe Stämme | 13 |
| 2.2.2 | Expressionsoptimierung | 14 |
| 2.2.3 | Fermentation | 15 |
| 2.2.4 | Zellaufschluß und Proteinreinigung | 15 |
| 2.2.5 | Konzentrationsbestimmung | 16 |
| 2.2.6 | Bestimmung der Glucanotransferase-Aktivität | 17 |
| 2.2.7 | Bestimmung des isoelektrischen Punktes | 17 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.3 | Kristallographische Methoden | 17 |
| 2.3.1 | Kristallisation | 17 |
| 2.3.2 | Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten | 18 |
| 2.3.2.1 | Vorbereitung der Kristalle zum Messen bei Raumtemperatur | 18 |
| 2.3.2.2 | Vorbereitung der Kristalle zum Messen bei 100 K | 18 |
| 2.3.2.3 | Datensammlung | 18 |
| 2.3.3 | Phasenbestimmung mittels MIR | 19 |
| 2.3.3.1 | Darstellung der Schweratomderivate | 19 |
| 2.3.3.2 | Bestimmung der Schweratomlagen | 19 |
| 2.3.3.3 | Berechnung der Phasen | 20 |
| 2.3.4 | Berechnung der Elektronendichte und angewandte Dichtemodifikationen | 20 |
| 2.3.5 | Interpretation der Elektronendichte und Verfeinerung des Modells | 21 |
| 2.3.5.1 | Modellbau | 21 |
| 2.3.5.2 | Verfeinerung der Struktur | 22 |
| 2.3.6 | Darstellung von Komplexen der Amylomaltase mit Oligosaccharid-Abkömmlingen | 23 |
| 2.3.7 | Bau und Verfeinerung eines Komplexes der Amylomaltase mit Acarbose | 23 |
| 2.3.8 | Koordinatenanalyse und Koordinatenhinterlegung in der Protein-Datenbank | 23 |

ERGEBNISSE

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1 | Proteinchemische Untersuchungen | 25 |
| 3.1.1 | Expressionsoptimierung | 25 |
| 3.1.1.1 | Expression der Amylomaltase durch MC1062 | 25 |
| 3.1.1.2 | Expression der Amylomaltase durch Methionin-auxotrophe Wirte | 26 |
| 3.1.2 | Proteinreinigung | 28 |
| 3.1.3 | Charakterisierung der drei Proteinfractionen | 29 |
| 3.2 | Strukturlösung | 30 |
| 3.2.1 | Kristallisation | 30 |
| 3.2.2 | Messung von Beugungsdaten | 32 |
| 3.2.3 | Raumgruppenbestimmung | 33 |
| 3.2.4 | Das Phasenproblem | 33 |
| 3.2.4.1 | Multiple anomale Dispersion | 34 |
| 3.2.4.2 | Multipler isomorpher Ersatz | 35 |
| 3.2.5 | Modellbau | 39 |
| 3.2.6 | Kristallographische Verfeinerung | 40 |
| 3.2.6.1 | Verfeinerung der Hauptkomponente der Chromatographischen Reinigung | 40 |
| 3.2.6.2 | Verfeinerung einer zweiten Form der Amylomaltase | 41 |
| 3.2.6.3 | Verfeinerung der Inhibitor-gebundenen Amylomaltase-Struktur | 42 |

STRUKTURANALYSE

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1 | Tertiärstruktur und Hauptkettenverlauf | 46 |
| 4.1.1 | Das (β , α) ₈ -Faß, eine Supersekundärstruktur | 46 |
| 4.1.2 | Domänenstruktur der Amylomaltase | 47 |
| 4.1.3 | Aufbau und Form der Unterdomänen | 48 |
| 4.2 | Amylomaltase in Komplex mit Acarbose | 49 |
| 4.2.1 | Struktur der Acarbose | 49 |
| 4.2.2 | Bindungsstellen | 51 |
| 4.2.2.1 | Acarbose gebunden im aktiven Zentrum | 51 |
| 4.2.2.2 | Eine zweite Bindungsstelle für Acarbose in der Nähe des aktiven Zentrums | 54 |
| 4.2.2.3 | Eine dritte Bindungstasche | 56 |
| 4.3 | Kristallkontakte | 57 |
| 4.4 | Thermostabilität und Temperaturfaktoren | 59 |

DISKUSSION UND SCHLUßFOLGERUNGEN

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.1 | Vergleich der nativen und Inhibitor-gebundenen Struktur | 63 |
| 5.2 | Sequenzalignment verschiedener Amylomaltasen und eines D-Enzyms | 64 |
| 5.3 | Vergleich der Struktur der Amylomaltase mit verwandten Strukturen aus der α-Amylase-Familie | 66 |
| 5.3.1 | Vergleich mit Strukturen in der Protein-Daten-Bank | 66 |
| 5.3.2 | Strukturelles Alignment ausgewählter Enzyme der Familie-13 | 68 |
| 5.3.3 | Vergleich der Amylomaltase mit einer CGTase und α -Amylase | 69 |
| 5.3.3.1 | Vergleich der aktiven Zentren | 70 |
| 5.3.3.2 | Topographischer Vergleich | 73 |
| 5.3.3.3 | Überlagerung der Strukturen | 77 |
| 5.3.3.4 | Molekulare Oberfläche und die Bedeutung der 250er-Schleife | 78 |
| 5.4 | Diskussion der Inhibitor-gebundenen Struktur | 81 |
| 5.4.1 | Bindungsmodus der Acarbose im aktiven Zentrum | 81 |
| 5.4.2 | Die zweite Bindungsstelle für Acarbose | 83 |
| 5.5 | Möglicher Bindungspfad längerer Substrate und Mechanismus der Ringbildung | 85 |
| 5.5.1 | Die Struktur von Amylose und der Substratbindungstaschen | 85 |
| 5.5.2 | Bindung längerer Substratketten | 87 |
| 5.5.3 | Angenommene wichtige Faktoren für die Ringbildung | 88 |
| 5.5.3.1 | Die 460er-Schleife | 88 |
| 5.5.3.2 | Die zweite Bindungstasche | 89 |

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

| | | |
|------------|--|-----------|
| 6.1 | Die Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der Amylomaltase | 90 |
| 6.2 | Die kristallographischen Arbeiten | 90 |
| 6.3 | Die Struktur | 91 |
| 6.4 | Die Bildung zyklischer Amylose | 92 |
| 6.5 | Ausblick | 92 |

| | |
|------------------|-----------|
| LITERATUR | 94 |
|------------------|-----------|

ANHANG

| | |
|------------------------------|------------|
| Abbildungsverzeichnis | 108 |
| Tabellenverzeichnis | 111 |
| Lebenslauf | 112 |
| Veröffentlichungen | 113 |
| Vorträge | 113 |