

1 Einleitung

Kohlenhydrate sind lebensnotwendige Stoffe für alle lebenden Organismen und Pflanzen. Sie stellen die variabelste Stoffklasse der Natur dar. Aufgebaut werden die auch als Polysaccharide bezeichneten Kohlenhydrate aus verschiedenen Pentosen und Hexosen, die über glycosidische Bindungen zu makromolekularen Verbindungen polymerisiert werden. Das weit verbreitete polymere Kohlenhydrat Stärke enthält zwei Komponenten, die lineare, aus α -1,4-verknüpften D-Glucosen bestehende Amylose und das verzweigte Amylopektin, das außerdem α -1,6-Bindungen aufweist. Die Amylomaltase (4- α -Glucanotransferase) katalysiert die Umsetzung der polymeren Amylose in ringförmige Strukturen mit einer minimalen Größe von 22 D-Glucosen.

1.1 Polysaccharide

Die wichtigsten Polysaccharide sind Cellulose, Stärke und Glykogen. Sie enthalten alle als Monomer die D-(+)-Glucose.

1.1.1 D-(+)-Glucose

Glucose ist eines der vielen in der Natur vorkommenden Monosaccharide. Je nach Anzahl der Kohlenstoffatome unterscheidet man bei den Monosacchariden zwischen Tetrosen, Pentosen, Hexosen. Monosaccharide, die eine Aldehydgruppe enthalten, werden Aldosen, solche, die eine Ketogruppe enthalten, Ketosen genannt. Glucose ist ein C₆-Zucker mit einer Aldehydgruppe und wird daher als Aldohexose bezeichnet.

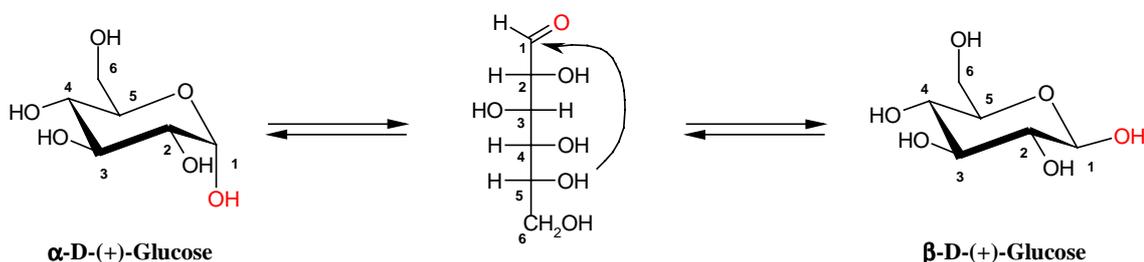


Abbildung 1: Mutarotation der Glucose in wässriger Lösung. Die Numerierung der Kohlenstoffatome ist angegeben. Die relevante Gruppe ist rot hervorgehoben. Die offenkettige Form der Glucose ist in der Fischer-Projektion gezeigt. Die axiale Hydroxylgruppe im linken Halbacetal *mutiert* über die offenkettige Form der Glucose in die äquatoriale Stellung im rechten Halbacetal.

In wässriger Lösung unterliegt die Glucose einer *Mutarotation*. Dabei *dreht* sich die Konfiguration am ersten Kohlenstoffatom C1 um, so daß zwei Diastereomere entstehen. Die beiden Stereoisomere heißen Anomere und das C1-Kohlenstoffatom anomeres Kohlenstoffatom (Abbildung 1).

1.1.2 Polymeraufbau mit Glucose

Die wichtigsten Polysaccharide in der Natur sind Cellulose, Stärke und Glykogen. Sie alle enthalten als Monomer die D-(+)-Glucose und sind über die Kohlenstoffe 1 und 4 polymerisiert bzw. besitzen zusätzliche α -1,6-Verknüpfungen. Liegt bei einem Polysaccharid α -Glucose als Monomer vor, so spricht man von einem α -verknüpften Polymer; analog gilt dies für die β -verknüpften Polymere.

Die Kettenenden werden durch die Angabe der chemischen Reaktivität unterschieden. Die Halbacetalgruppe (C1) wird als das reduzierende Ende, die Hydroxylgruppe am C4 als das nicht-reduzierende Ende des Polysaccharides bezeichnet.

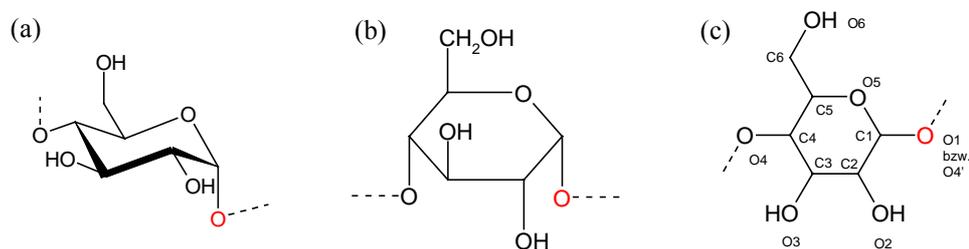


Abbildung 2: Struktur der α -D-(+)-Glucose in α -1,4-verknüpften Sacchariden in der (a) Sesselkonformation, (b) Haworth-Projektion und (c) schematisch mit Angabe der Atombennungen. Der für die Bezeichnung der Konfiguration am anomeren C-Atom wichtige Sauerstoff ist rot dargestellt. Ist er in axialer Position, spricht man von α -Glucose. Bei einer α -1,4-Verknüpfung wird der Sauerstoff O1 bei der Kondensation der Glucosen abgespalten, weshalb im Polymer O1 als O4' bezeichnet wird.

1.1.2.1 Cellulose

Die Cellulose ist Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand und das technisch wichtigste Kohlenhydrat. In Cellulose ist Glucose über glycosidische β -1,4-Verknüpfungen zu langen Ketten polymerisiert.

1.1.2.2 Stärke

Stärke ist das wichtigste Speicherpolysaccharid in Pflanzen und ein Hauptsubstrat im Metabolismus von Pflanzen und tierischen Organismen. Es kommt in den meisten höheren Pflanzen und in praktisch jeder Art von Gewebe vor: Blätter, Früchte, Samenpollen, Wurzeln, Knospen und Stämme. Die Stärke liegt als wasserunlösliche Körner in membrangebundenen Organellen, den Plastiden, vor. Diese Körner enthalten zwei verschiedene Polysaccharide: Amylose und Amylopektin. Amylose besteht aus D-Glucosen, die durch α -1,4-Bindungen kettenartig verknüpft sind. Die mittleren Kettenlängen von 10^2 bis 10^4 Glucosemoleküle variieren innerhalb verschiedener Pflanzenarten (Shannon & Garwood, 1984). Amylopektin ist ein hochverzweigtes Polymer, wobei durch α -1,4-Bindungen gebildete D-Glucoseketten (DP 24-30) über α -1,6-Bindungen verknüpft sind. Ein Amylopektinmolekül besteht aus etwa 10^4 bis 10^5 Glucoseeinheiten (Shannon & Garwood, 1984; Hizukuri, 1996).

1.1.2.3 Glykogen

Höhere Pflanzen synthetisieren Stärke; Bakterien, Eukayonten und Tiere speichern Glykogen als Energiereserve. Glykogen ist analog dem Amylopektin aufgebaut, wobei die D-Glucoseketten (DP 8-12) zwischen den Verzweigungspunkten kürzer sind. Der Polymerisationsgrad ist aber vergleichbar mit dem des Amylopektins (Shannon & Garwood, 1984).

1.2 Metabolismus der Stärke

1.2.1 Der Stärkeanabolismus

Der Metabolismus des Stärkeaufbaus ist heute recht gut verstanden (Preiss, 1991). Das Enzym ADP-Glucose-Pyrophosphorylase katalysiert die Bildung von ADP-Glucose aus Glucose-1-phosphat und ATP. Die Stärke-Synthetase katalysiert den Glycosyltransfer von ADP-Glucose zur wachsenden α -1,4-D-Glucankette. Der Amylopektinaufbau wird durch das Stärke-Verzweigungsenzym katalysiert, welches den Glucantransfer zum Aufbau der α -1,6-Verzweigungen bewerkstelligt.

1.2.2 Der Stärkeketabolismus

Der Stärkeabbau ist noch nicht vollständig verstanden. Prinzipiell sind zwei mögliche Wege bekannt (Manners, 1985; Steup, 1988). Zum einen über die Hydrolyse der α -1,4-Bindungen durch α -Amylasen unter Bildung von löslichen Maltooligosacchariden, die weiter durch die β -Amylase zu Maltose oder durch die α -Glucosidase zu Glucose abgebaut werden. Ein zweiter Weg ist die Phosphorolyse durch die Stärke-Phosphorylase, wobei die α -1,4-Bindung vom nicht-reduzierenden Kettenende unter Freisetzung von Glucose-1-phosphat gespalten wird. Das kleinste Substrat ist allerdings Maltopentaose (Steup & Schächtele, 1981), so daß es für den vollständigen Stärkeabbau über Phosphorolyse weitere noch unbekannte Systeme geben muß. α -1,6-Bindungen können nach heutigem Wissensstand nur durch die Pullulanase oder die Isoamylase hydrolytisch gespalten werden.

1.3 Die Amylomaltase

1.3.1 Vorkommen

Zuerst wurde die Amylomaltase in *E. coli* entdeckt (Monod & Torriani, 1948). Seitdem wurde das Enzym in verschiedenen Organismen gefunden und das entsprechende Gen aus *Chlamydia psittaci* (Hsia *et al.*, 1997), *Clostridium butyricum* (Goda *et al.*, 1997), *Escherichia coli* (Pugsley & Dubreuil, 1988), *Streptococcus pneumoniae* (Lacks *et al.*, 1982), *Thermococcus litoralis* (Jeon *et al.*, 1997), *Thermogota maritima* (Liebl *et al.*, 1992), *Thermotoga neapolitana* (Berezina, *et al.*, 1999) und *Thermus aquaticus* (Terada *et al.*, 1999) kloniert.

Analoge Gene wurden in den Genomen von *Aquifex aeolicus* (Deckert *et al.*, 1998), *Borrelia burgdorferi* (Fraser *et al.*, 1997), *Chlamydia pneumoniae* (Kalman *et al.*, 1999), *Chlamydia trachomatis* (Stephens *et al.*, 1998), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) und *Synechocystis sp.* (Kaneko *et al.*, 1996) gefunden.

Ein ähnliches Enzym ist auch in Pflanzen bekannt und wird als Disproportionierungsenzym (D-Enzym) (EC 2.4.1.25) bezeichnet. Die katalytischen Eigenschaften des pflanzlichen Enzyms aus der Kartoffel (Jones & Whelan, 1969) und Gerste (Yoshio *et al.*, 1986) stimmen mit denen der bakteriellen Amylomaltase überein. Die Sequenzanalyse des D-Enzyms aus der Kartoffel zeigt in

Übereinstimmung mit den katalytischen Eigenschaften eine signifikante Homologie mit den bakteriellen Amylomaltasen; 41 % Sequenzhomologie mit der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* (Takaha *et al.*, 1993).

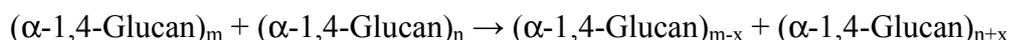
1.3.2 Klassifizierung

Die Amylomaltase und das pflanzliche D-Enzym sind als Stärke-spaltende Enzyme in den Stärkemetabolismus involviert. Aufgrund der wichtigen biologischen Bedeutung von Stärke für die Nahrungsaufnahme und Speicherung ist die selektive Hydrolyse und Glykogenbildung ein kritischer Vorgang für alle Organismen. Daher existieren etliche verschiedene Enzyme, die auf der Basis ihrer Substrat- und Reaktionsspezifität (IUBMB, 1992) in Glycosyl-Hydrolasen (EC 3.2.1.x) und Glycosyl-Transferasen (EC 2.4.x.y) unterteilt werden.

Basierend auf der evolutionären Verwandtschaft und den gemeinsamen Reaktionsmechanismus werden diese Enzyme aufgrund ihrer Sequenzhomologie in Familien und Klans eingeteilt. Die Amylomaltase (4- α -Glucanotransferase; EC 2.4.1.25) wird der Familie-13 (α -Amylase-Familie) der Glycosyl-Hydrolasen zugeordnet (Janeček, 1997). In der Familie-13 kennt man bis zu 80 verschiedene Enzyme (Henrissat 1991; Henrissat & Bairoch 1993; Henrissat & Bairoch 1996; Janeček *et al.*, 1999; Coutinho & Henrissat 1999), die α -1,4- und α -1,6-glycosidische Bindungen unter Retention der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom C1 transformieren (Janeček, 1995; Janeček *et al.*, 1997; Janeček, 1997; Kuriki & Imanaka, 1999). Retention heißt dabei, daß die α -Konformation der Hydroxylgruppe am anomeren Kohlenstoffatom C1 bei der Reaktion erhalten bleibt. Bei Inversion würde sie in β -Stellung übergehen.

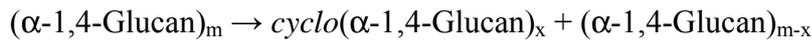
1.3.3 Katalytische Eigenschaften

Amylomaltasen und das pflanzliche D-Enzym katalysieren einen Glycosyltransfer. Bei der Transglycosylierung wird von einem α -1,4-Glucan ein Fragment abgespalten und auf ein zweites α -1,4-Glucan oder auf Glucose übertragen.



Diese intermolekulare Reaktion ist reversibel und wird oft als Disproportionierung bezeichnet. Den Spezialfall mit $x = m$ bezeichnet man als Kupplung, bei der zwei Ketten miteinander verknüpft werden.

Desweiteren katalysieren die beiden homologen Enzyme auch die intramolekulare Transglycosylierung, bei der aus einer einzelnen Kette ein zyklisches Produkt entsteht.



Zu einem geringen Anteil werden Glucane von diesen Enzymen auch hydrolysiert.

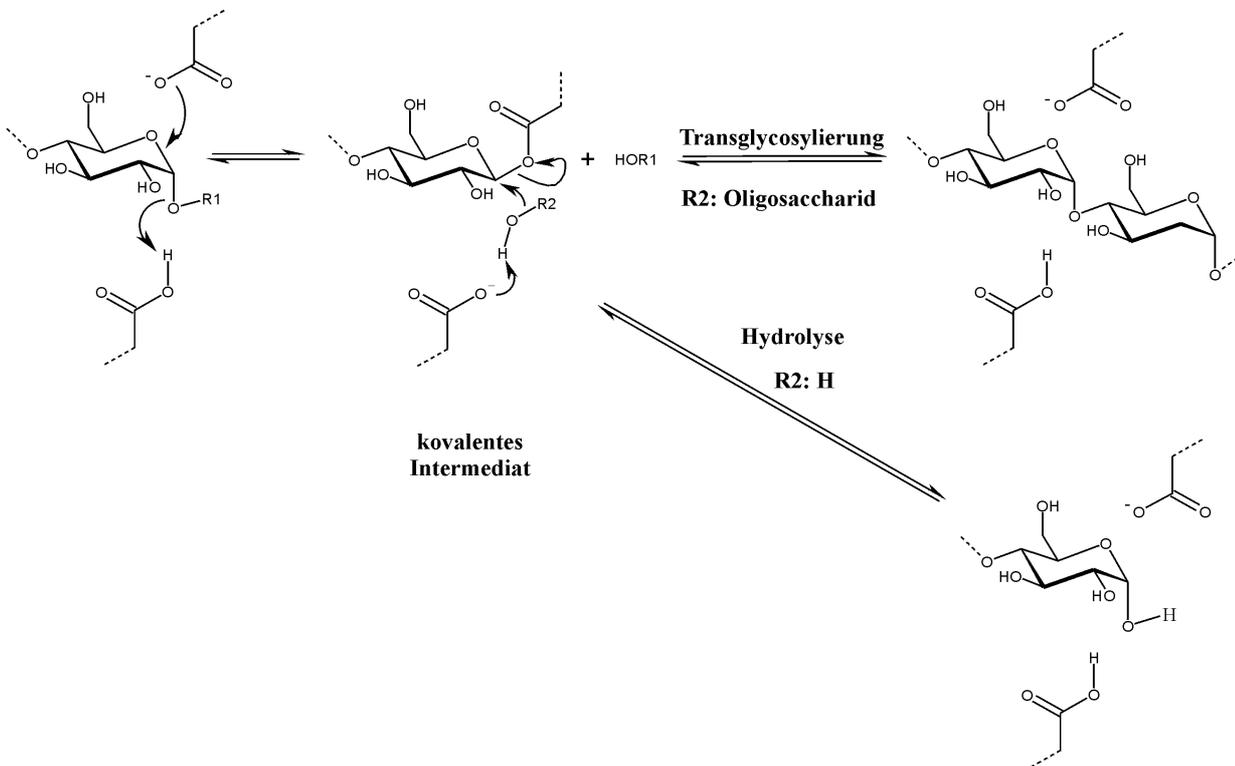
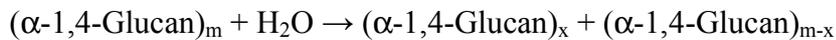


Abbildung 3: Reaktionsmechanismus für α -1,4-reagierende Enzyme unter Retention der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff. Ob die Reaktion wirklich über ein kovalentes Intermediat verläuft, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Aufgrund der konservierten Reste im aktiven Zentrum (vgl. Kapitel 5.3.3.1) wird angenommen, daß die Amylomaltasen und das D-Enzym nach dem gleichen Mechanismus wie die CGTasen Maltooligosaccharide umsetzen. Bei einem vorgeschlagenen Mechanismus wird dabei im ersten

Schritt der Katalyse ein kovalentes Intermediat gebildet, das je nach Reaktionspartner und Enzym unter Hydrolyse oder Transglycosylierung weiterreagiert (Uitdehaag *et al.*, 1999) (Abbildung 3). Welche Faktoren für die unterschiedlichen Reaktionsspezifitäten verantwortlich sind, ist noch immer unbekannt.

Für die Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* ist Maltotriose der kleinste Donor und Glucose sowohl die kleinste Transfereinheit als auch der kleinste Akzeptor. Die obere Grenze der Kettenlänge von Donor und Akzeptor wird nur durch die Löslichkeit der Verbindungen begrenzt und es werden ausschließlich α -1,4-Bindungen gespalten und gebildet (Terada *et al.*, 1999).

1.3.4 Physiologische Bedeutung

In *E. coli* wird die Amylomaltase (*malQ*) mit der Phosphorylase (*malP*) von demselben Operon exprimiert. Sie ist wahrscheinlich Teil des Transport und Verwendungssystems für Maltooligosaccharide (Schwartz, 1987) und spielt bei der Umwandlung von kurzen zu längeren Maltooligosacchariden, mit denen die Phosphorylase reagieren kann, eine wichtige Rolle (Takaha & Smith, 1999).

Wie die Genomanalyse von *Haemophilus influenza* und *Aquifex aeolicus* zeigte, scheinen die Transportgene für Maltose allerdings zu fehlen. Bei diesen Organismen ist das Gen für die Amylomaltase Teil des Glykogenoperons und es gibt keine zu *E. coli* homologen Gene (*malE*, *malF* und *malG*), die wichtig für den Transport der Maltooligosaccharide ins Cytoplasma sind. Dies legt den Schluß nahe, daß in *H. influenza* und *A. aeolicus* die Amylomaltase nicht Teil des Systems zur Aufnahme und Umsetzung von Maltooligosacchariden ist, sondern eher eine Rolle im Glykogenmetabolismus spielt (Takaha & Smith, 1999).

Dies würde bedeuten, daß die physiologische Funktion der Amylomaltase zwischen den Organismen variiert. Interessanterweise zeigt die Amylomaltase aus *H. influenza* allerdings eine engere Verwandtschaft mit der aus *E. coli* als mit der aus *A. aeolicus* (Takaha & Smith, 1999), so daß keine Korrelation zwischen Sequenz und angenommener Funktion zu beobachten ist.

Die physiologische Funktion der großen Cycloamylosen ist noch vollkommen unbekannt, da sie erst vor kurzem entdeckt wurden (Takaha *et al.*, 1996). Weitere Untersuchungen müssen zeigen,

wo diese Makrozyklen in Pflanzen bevorzugt synthetisiert und angereichert werden bzw. welche Funktion sie bei Bakterien spielen.

Die genaue Funktion der Amylomaltase und des pflanzlichen D-Enzyms ist noch nicht geklärt.

1.3.5 Biochemisch verwandte Enzyme

Die Cyclodextrin-Glucanotransferasen (CGTasen) (EC 2.4.1.19) weisen ähnliche katalytische Eigenschaften wie die Amylomaltasen und D-Enzyme auf. Ein Unterschied besteht allerdings in den unterschiedlichen Ringgrößen der Cycloamylose-Produkte. Bei diesen Enzymen werden aus langen Amyloseketten am Anfang der Reaktion zunächst große Ringe gebildet (Takaha *et al.*, 1997, Terada *et al.*, 1999), die im Laufe der Reaktion sukzessiv verkleinert werden. Hauptprodukte bei der CGTase sind Cycloamylosen mit einem Polymerisierungsgrad (DP; degree of polymerisation) zwischen 6 und 8, die α -, β - und γ -Cyclodextrine genannt werden. Im Gegensatz dazu stellt die Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* Ringe mit einer Größe von 22 bis einigen Hundert her, die als Cycloamylosen bezeichnet werden. Die minimal gebildete Ringgröße variiert bei den Amylomaltasen und den D-Enzymen zwischen den unterschiedlichen Organismen; bei Amylomaltase aus *E. coli* und *Thermus aquaticus* ist sie 17 bzw. 22, beim D-Enzym aus der Kartoffel 17 (Takaha & Smith, 1999). Wie die minimale Ringgröße beeinflusst wird, ist noch unbekannt, aber von großem Interesse.

Die CGTasen und Amylomaltasen weisen nur eine sehr geringe bzw. nicht-signifikante Homologie von ~13 % in der Aminosäuresequenz auf. In den Alignments können lediglich vier kurze homologe Regionen gefunden werden, die die drei konservierten, biochemisch aktiven Seitenketten enthalten (Takaha & Smith, 1999). Diese vier Regionen sind ein Merkmal der α -Amylase-Familie, zu der die Enzyme gehören. Basierend auf Primärsequenzalignments ist die Amylomaltase das am entferntesten verwandte Enzym der Familie, während bemerkenswerterweise die hydrolytischen α -Amylasen mit den CGTasen die höchste Sequenzhomologie von ~25 % aufweisen (Janeček, 1997).

1.4 Industrielle Anwendung der Stärke-prozessierenden Enzyme und deren Produkte

Die am Stärkeabbau beteiligten Enzyme besitzen eine außerordentliche biotechnologische Bedeutung in der Lebensmittelindustrie. α -Amylase, Glucoamylase und Glucose-Isomerase stellen drei der vier am meisten produzierten Enzyme für biotechnologische Zwecke. Ihr Haupteinsatzgebiet liegt in der Produktion von Glucose- und Fructosesirup aus Stärke sowie in der Brauindustrie und der Backindustrie.

Die von den CGTasen produzierten Cyclodextrine werden sowohl in der Lebensmittel-, pharmazeutischen und kosmetischen Industrie als auch als Säulenmaterial für chromatographische Reinigungen verwendet (Hedges, 1998). Die Grundlage für die verschiedenen Anwendungen liegt in der Eigenschaft der Cyclodextrine, verschiedene Moleküle in ihren inneren hydrophoben Hohlräumen zu komplexieren. Mit Hilfe der Amylomaltase können erstmals größere Ringe hergestellt werden. Die Kristallstrukturanalyse einer Cycloamylose mit 26 Glucoseresten zeigt, daß dieser Makrozyklus sich in zwei kurze antiparallele linkshändige V-Amylosen faltet. Dabei entstehen zwei hydrophobe Tunnel mit einem Durchmesser von 5.0-5.5 Å entlang der Achse der V-Amylose (Abbildung 4) (Geßler *et al.*, 1999).

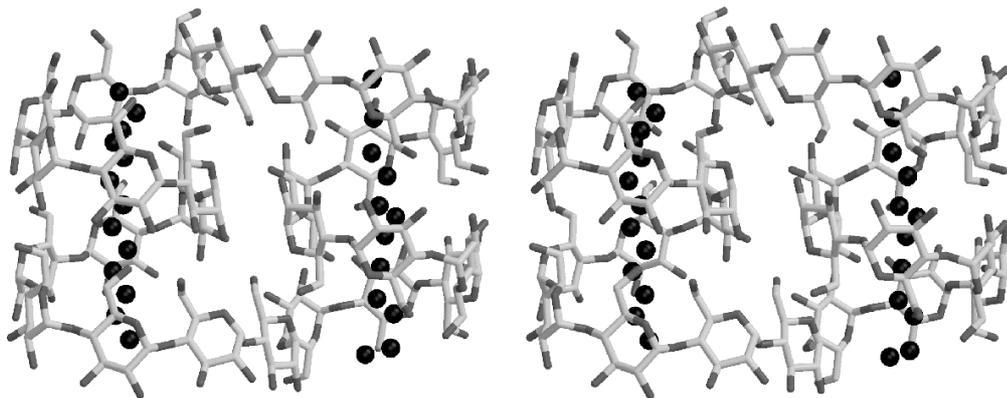


Abbildung 4: Struktur der Cycloamylose mit 26 Glucoseresten (Geßler *et al.*, 1999) (Stereobild). Kohlenstoffatome sind hellgrau, Sauerstoffatome dunkelgrau gefärbt. Die Wassermoleküle im Inneren der beiden antiparallelen Helices sind schwarz eingefärbt.

Daher sollten im Vergleich zu den Cyclodextrinen die größeren Ringe, die Cycloamylosen, größere und vor allem langkettige Moleküle komplexieren können und so die industriellen Anwendungsmöglichkeiten der zyklischen Amylosen stark erweitern.

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals die Struktur einer Amylomaltase kristallographisch untersucht werden. Ziel war dabei, die Unterschiede zur CGTase zu erarbeiten und insbesondere erste Hinweise auf Faktoren zu erhalten, die die Größe der Cycloamyloseprodukte bestimmen, um die Spezifität des Enzyms für bestimmte Ringgrößen mit gentechnischen Methoden erhöhen zu können.