

3 Ergebnisse

3.1 Proteinchemische Untersuchungen

3.1.1 Expressionsoptimierung

Zur Strukturanalyse von Proteinen mittels Röntgenbeugung werden große Mengen Protein (mg-Maßstab) benötigt. Für die präparative Herstellung wird das kodierende Gen falls möglich in einen geeigneten Überexpressionsvektor kloniert und in *E. coli* exprimiert. Das gewünschte Produkt wird nach dem Aufschluß der Zellen für die Kristallisation bis zur Homogenität gereinigt. Um die Ausbeute bei der Proteinpräparation zu optimieren, wurde die Biosynthese der Amylomaltase in den verschiedenen Wirten optimiert.

3.1.1.1 Expression der Amylomaltase durch MC1062

Der Klon mit dem Gen der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* auf dem rekombinanten Plasmid pFQG8 im *E. coli* Stamm MC1062 wurde freundlicherweise von T. Takaha, Ezaki Glico Co., Japan, zur Verfügung gestellt. Für die Optimierung der Expression wurden der Induktionszeitpunkt (OD_{600} 0.2, 0.7 und 1.0), die IPTG-Konzentration (10 und 1000 μM) und die Expressionsdauer (3, 6 und 24 h) variiert. Mittels SDS-PAGE wurde die produzierte Menge an Amylomaltase bestimmt (Abbildung 6).

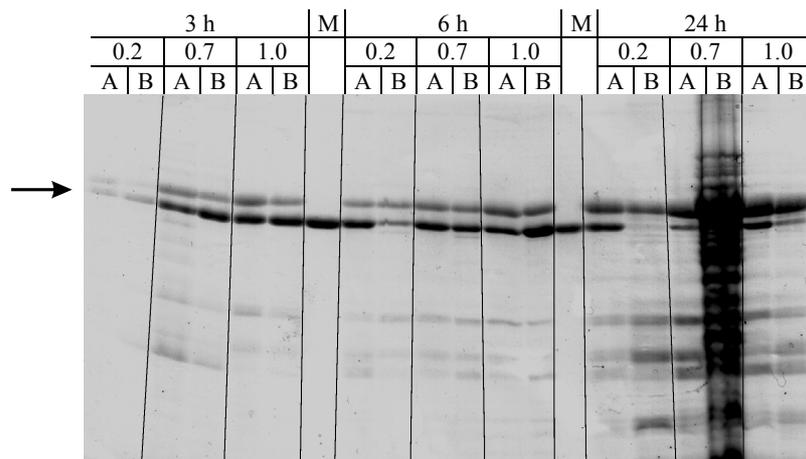


Abbildung 6: Expressionsoptimierung der Amylomaltase mit der Zelllinie MC1062 in LB-Medium. Variiert wurde die Expressionsdauer (3, 6 und 24 h), der Induktionszeitpunkt (OD_{600} 0.2, 0.7 und 1.0) und die Konzentration von IPTG (A = 10 μM und B = 1000 μM). Als Marker (M) wurde reine Amylomaltase verwendet und ist mit einem Pfeil markiert.

Bei den untersuchten Bedingungen steigt mit der Optischen Dichte (OD) und Expressionsdauer die Expression der Amylomaltase bis 6 h Inkubation an. Bei der Kontrolle nach 24 h ist die Menge der synthetisierten Amylomaltase signifikant weniger. Die höchste Ausbeute wurde bei einem Expressionszeitraum von 6 h, einer OD_{600} von 1.0 für den Expressionszeitpunkt und einer IPTG-Konzentration von 1 mM erhalten.

3.1.1.2 Expression der Amylomaltase durch Methionin-auxotrophe Wirte

Zur Lösung des kristallographischen Phasenproblems wurden parallel zwei Wege gewählt. Ein Lösungsansatz erfolgte mit der herkömmlichen Suche nach Schweratomderivaten und der Strukturlösung mittels MIR. Als zweite Methode wurde versucht, sämtliche Methionine im Protein durch Selenomethionin zu ersetzen und das Phasenproblem mittels multipler anomaler Streuung (MAD) zu lösen. Grundlage für die Anwendung der MAD-Methode ist das Vorhandensein starker anomaler Streuer im Protein. Der Austausch aller zehn Methionine gegen Selenomethionin sollte ein ausreichend starkes Signal für die Phasenberechnung erzeugen (Deacon & Ealick, 1999). Für die erfolgreiche Einführung des Selenomethionins anstelle des Methionins bei der Proteinbiosynthese ist die Auswahl eines geeigneten Wirtes notwendig. Dieser darf nicht in der Lage sein, die natürliche Aminosäure Methionin selbst zu synthetisieren, so daß das im Nährmedium vorgelegte strukturell sehr ähnliche Selenomethionin (Abbildung 7) als Methioninquelle dient.

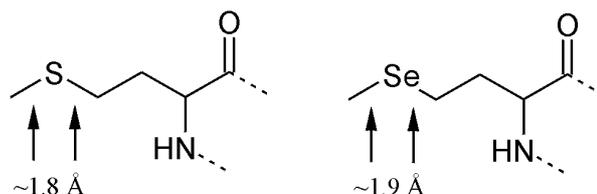


Abbildung 7: Vergleich zwischen Methionin und Selenomethionin. Der Bindungsabstand zwischen Schwefel und Kohlenstoff ist nahezu der gleiche wie zwischen Selen und Kohlenstoff.

Als Wirt dienten zwei verschiedene *met⁻* Stämme von *E. coli* (DSM5912 und B834(DE3)). Für die erste Zelllinie mußte lediglich das Plasmid, welches das Gen für die Amylomaltase enthält, in den *met⁻* Wirt transformiert werden. Bei der zweiten Zelllinie ist die sehr schnell arbeitende RNA-Polymerase aus dem T7-Bakteriophagen bereits in die chromosomale DNS eingebaut. Diese wird mittels Induktion mit IPTG exprimiert. Daher mußte das Gen *malQ* aus dem ursprünglichen

Plasmid erst herausgeschnitten werden, in ein den T7 Promoter enthaltendes Plasmid insertiert und in den neuen Wirt (B834(DE3)) transformiert werden. Da die Expression von Proteinen in Minimal-Medium im Vergleich zum LB-Medium stark herabgesetzt ist, wurde eine Expressionsoptimierung mit NM-Medium mit Zugabe von Methionin durchgeführt. Hierbei wurde neben der Expressionsinduktion (OD_{600} von 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 und 1.2) und der IPTG-Konzentration (EK 10, 100, 1000 μM) auch die Expressionsdauer (2, 4, 6, 12, 24 und 48 h) variiert.

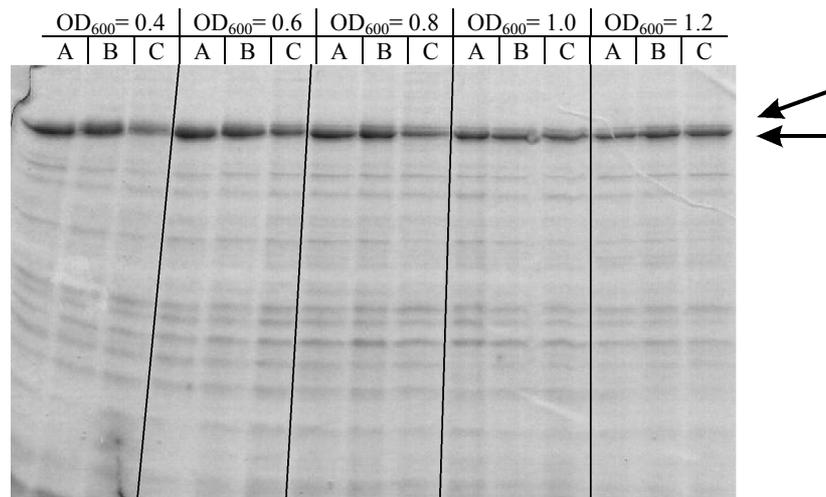


Abbildung 8: Expression der Amylomaltase mit der Zelllinie DSM5912 mit NM-Medium und Methionin. Die Menge der produzierten Amylomaltase wird durch den waagerechten Pfeil markiert. Auf eine auftretende zweite Bande weist der zweite Pfeil (schräg) hin. Gezeigt wird die Menge des synthetisierten Enzyms nach 24 h in Abhängigkeit des Induktionszeitpunktes (OD_{600} 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 und 1.2) und einer IPTG-Konzentration von A = 10 μM , B = 100 μM und C = 1000 μM .

So wurde für jede Zelllinie der Expressionslevel bei 90 verschiedenen Bedingungen untersucht. Die relativ höchste Ausbeute an Amylomaltase wurden bei einer Expressionszeit von 24 h erzielt. Die absolute Ausbeute der Expression mit der Zelllinie DSM5912 war allerdings insgesamt sehr gering. Außerdem wurde das Auftreten von Doppelbanden beobachtet (Abbildung 8).

Die Verwendung des B834(DE3) *E. coli*-Stammes lieferte vergleichsweise eine sehr viel höhere Ausbeute an Amylomaltase. Die besten Bedingungen für die Überproduktion des *malQ*-Gens sind bei einer OD_{600} von 0.8 und IPTG-Konzentration von 100 μM (Abbildung 9) nach 24-stündiger Expression.

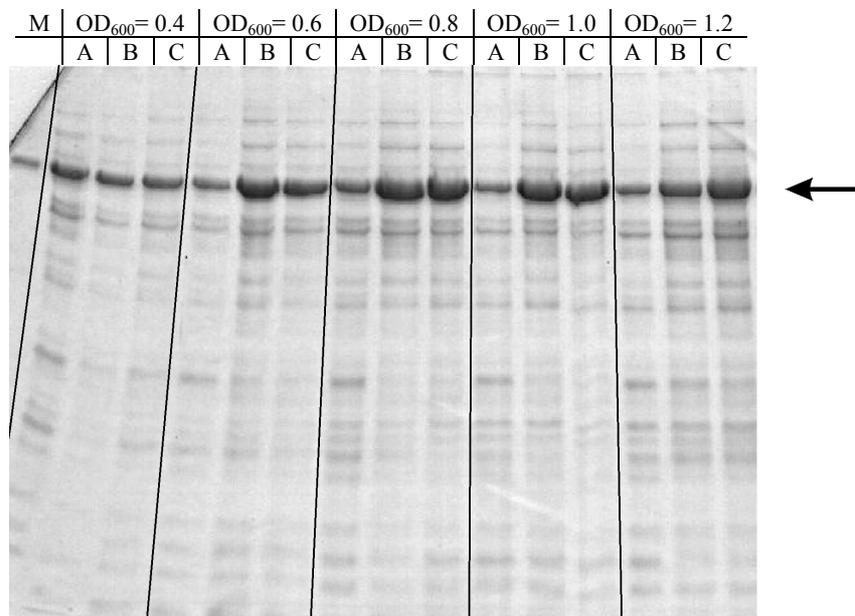


Abbildung 9: Expression der Amylomaltase mit der Zelllinie B834(DE3) mit NM-Medium und Methionin. Die Menge der produzierten Amylomaltase wird durch den waagerechten Pfeil markiert. Gezeigt wird die Variation der Proteinbiosynthese in Abhängigkeit des Induktionszeitpunktes (OD₆₀₀ 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 und 1.2) und der Konzentration von IPTG (A = 10 μ M, B = 100 μ M und C = 1000 μ M) bei einer Expressionsdauer von 24 h. Als Marker (M) wurde reine Amylomaltase verwendet.

Das neue System wurde getestet und verifiziert, indem die Amylomaltase mit dem neuen Wirt B834(DE3) unter den optimalen Expressionsbedingungen (OD₆₀₀ 0.8, IPTG 100 μ M, 24h) mit Verwendung von nativem Methionin exprimiert, gereinigt, aufkonzentriert und erfolgreich kristallisiert wurde.

3.1.2 Proteinreinigung

Nach der in der Literatur beschriebenen (Terada *et al.*, 1999) und von Terada (persönliche Mitteilung) modifizierten Reinigung erhält man nach einer Hitzefällung und zweifacher Säulenchromatographie nach SDS-PAGE Analyse reine Amylomaltase. Zur Züchtung von Kristallen ist es notwendig, hochreine Proteinlösungen zu präparieren. Daher wurde im letzten Reinigungsschritt qualitativ hochwertigeres Säulenmaterial (MonoQ, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet als bisher beschrieben (Source 15Q bzw. Sepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Im UV₂₈₀-Chromatogramm der höher aufgelösten Anionenaustauschchromatographie konnte nachgewiesen werden, daß sich die in der

SDS-PAGE homogene hochreine Amylomaltase in drei unterschiedliche Fraktionen aufteilt (Abbildung 10). Die drei Fraktionen eluieren bei ca. 150 mM, 162 mM und 173 mM Natriumchlorid. Die Fraktionen der drei Peaks wurden einzeln vereinigt, untersucht und aufkonzentriert. Die aufkonzentrierten Fraktionen waren bei 6 °C stabil und zeigten auf dem analytischen Anionenaustauschchromatogramm auch nach vier Wochen keinerlei Umwandlung zu den anderen Fraktionen.

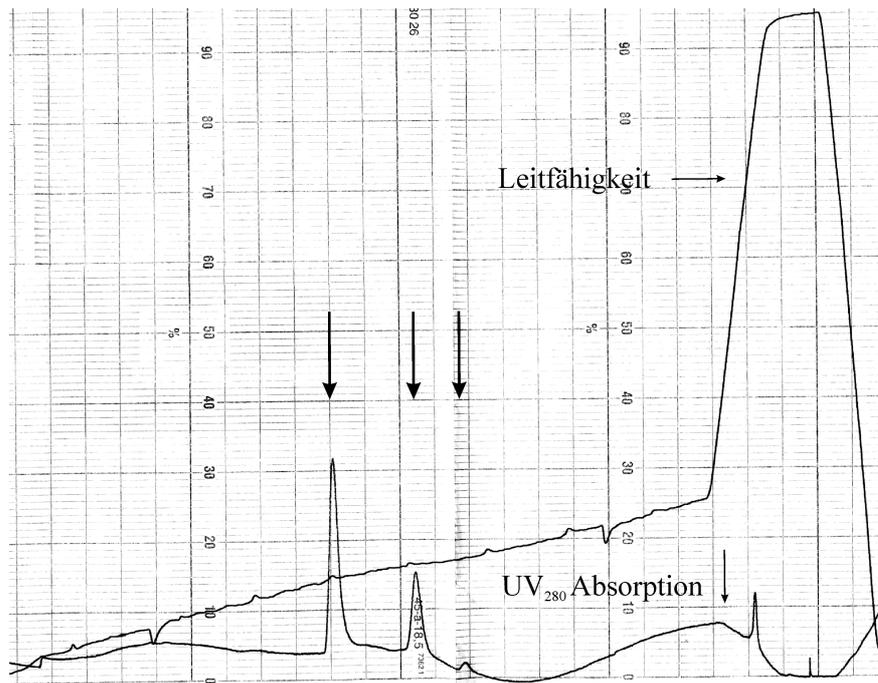


Abbildung 10: Anionenaustauschchromatogramm des letzten Reinigungsschrittes der Amylomaltase. An eine MonoQ-Säule wurde ein linearer Gradient von 0 bis 250 mM NaCl angelegt und die Leitfähigkeit und UV₂₈₀-Absorption detektiert. 10 Skalenteile entsprechen einem Konzentrationsunterschied von 100 mM Natriumchlorid. Die drei unterschiedlichen Peaks bei der Chromatographie sind mit dicken senkrechten Pfeilen markiert.

3.1.3 Charakterisierung der drei Proteinfractionen

Um die Unterschiede der drei Proteinfractionen zu charakterisieren, wurden folgende Methoden angewandt: Aktivitätstests, N-terminaler Aminosäureabbau, MALDI-Massenspektrometrie und isoelektrische Fokussierung. Mit den drei erstgenannten Methoden konnten keine signifikanten Differenzen ermittelt werden, d. h. alle drei Fraktionen besitzen im Rahmen der Meßgenauigkeit die selbe Aktivität und die selbe molekulare Masse. Keine der Fraktionen zeigt einen N-terminalen Aminosäureabbau.

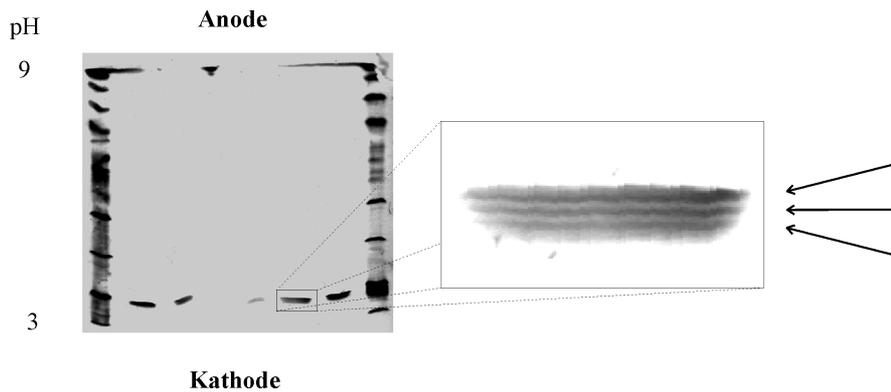


Abbildung 11: Isoelektrische Fokussierung der Amylomaltase. Die nach der Reinigung erhaltenen drei Fraktionen zeigen bei der IEF leicht unterschiedliche Isoelektrische Punkte (Pfeile).

Das unterschiedliche Verhalten auf dem Anionenaustauscher konnte allerdings durch isoelektrische Fokussierung (IEF) verifiziert werden. Die drei Fraktionen der Amylomaltase von der Anionenaustauschchromatographie wurden vereinigt und mit Hilfe der IEF untersucht (Abbildung 11). Man kann drei Banden bei einem pI von ~ 4.0 erkennen, die sich nur geringfügig ($\Delta pI \approx 0.1$) unterscheiden. Mit der IEF konnte das unterschiedliche Laufverhalten auf dem Anionenaustauscher klar als Eigenschaft der Amylomaltase bestätigt werden. Alle drei Fraktionen variieren leicht in ihren isoelektrischen Punkten und zeigen daher ein gering unterschiedliches Elutionsverhalten bei der Ionenaustauschchromatographie.

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der drei Fraktionen, die keine Aktivitäts- und Masseunterschiede aufweisen wäre z. B. die Desaminierung einer Amidseitenkette der Aminosäuren Asparagin oder Glutamin. Der Masseunterschied wäre je nach Protonierungszustand der Seitenkette null bis ein Dalton.

3.2 Strukturlösung

3.2.1 Kristallisation

Die Kristallisationsexperimente wurden hauptsächlich von Claudia Alings ausgeführt. Die auf 10 mg/ml konzentrierte Amylomaltase wurde nach der Dampfdiffusionsmethode (Ducruix & Giegé, 1992) kristallisiert. Unter Verwendung der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Reinigung für die Amylomaltase wuchsen innerhalb von zwei Tagen Nadeln in den Ansätzen 25, 29, 30, 37, 38 und 46 eines Kristallscreens nach Jancarik & Kim (1991). Hexagonale Kristalle in Form von

Brillanten und Zylindern mit einer Größe von bis zu $0.1 \times 0.1 \times 0.08 \text{ mm}^3$ wurden unter den Bedingungen von 40, 41 und 42 gefunden. (Abbildung 12).

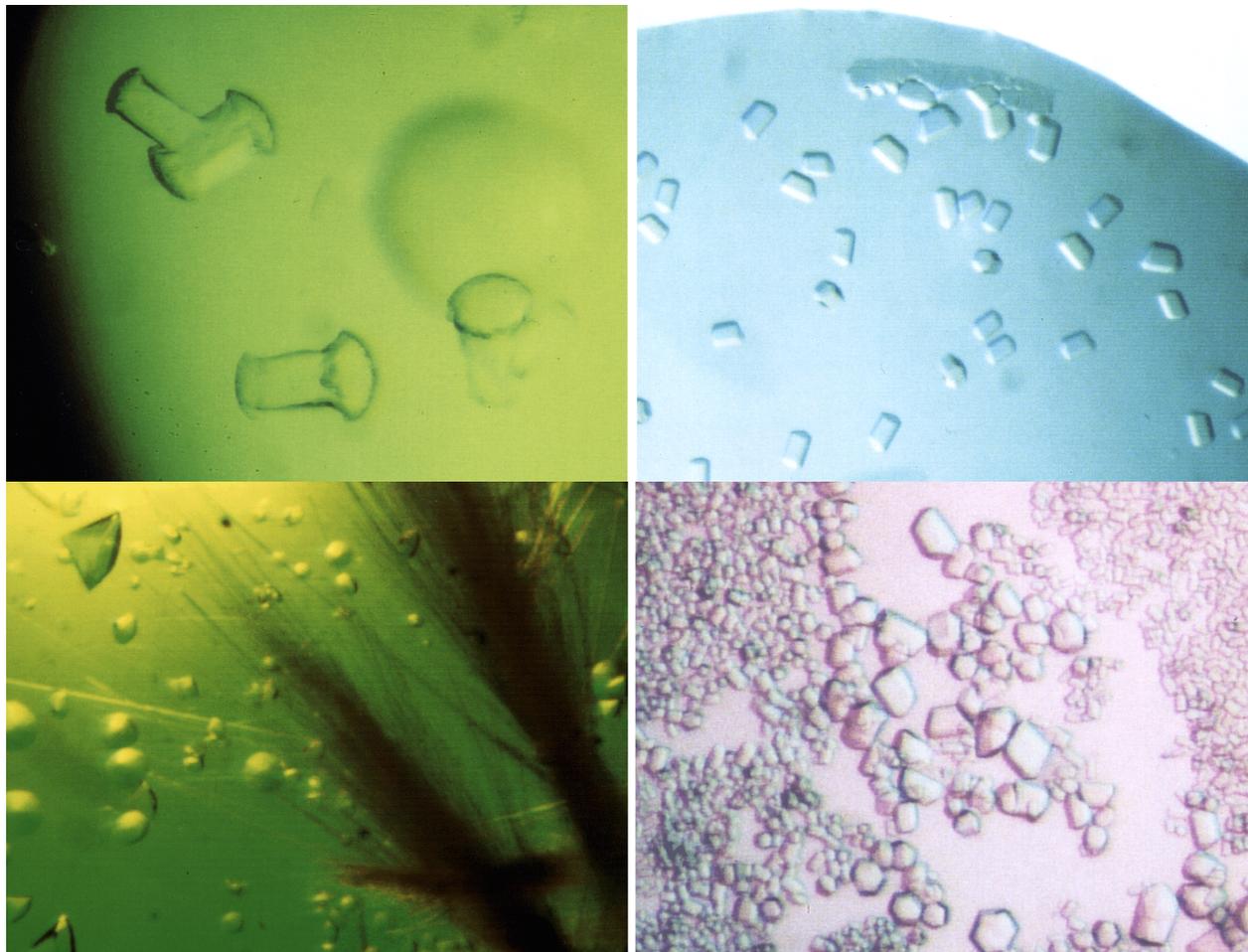


Abbildung 12: Kristalle der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* bei verschiedenen Bedingungen eines Kristallscreens.

Die anfängliche maximale Auflösung der Röntgendaten, die am Instituts-eigenen Röntgendiffraktometer aufgenommen wurden, betrug 4.5 \AA . Nach weiterer Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen konnte die Kristallgröße auf $0.4 \times 0.4 \times 0.3 \text{ mm}^3$ (Abbildung 13) und die maximale Auflösung der Röntgenbeugung am Instituts-eigenen Generator auf 2.8 \AA verbessert werden.

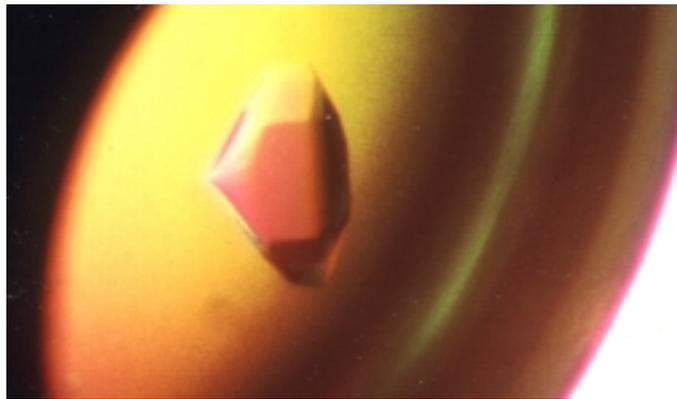


Abbildung 13: Kristall der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*. Der Kristall hat eine Größe von 0.4 x 0.4 x 0.3 mm³ und wurde bei den verfeinerten Kristallisationsbedingungen erhalten.

Die Kristallisation erfolgte stets unter Variation des pH-Wertes und der Salzkonzentration (100 mM Puffer (Bicine pH 9.0 bzw. Hepes pH 7.6), 16 - 18 % (w/v) PEG 8000, 10 % (v/v) Ethylenglykol und 0 bzw. 100 mM NaCl), da keine der vier Bedingungen den jeweils anderen dreien reproduzierbar überlegen war.

3.2.2 Messung von Beugungsdaten

Röntgenstrahlung besitzt eine hohe Energie, die neben der kristallspezifischen Diffraktion auch zu Ionisierung und Radikalbildung im Kristall führt. Die Radikale reagieren mit den Proteinkomplexen und stören deren periodische Anordnung im Kristall, so daß die Beugungsqualität der Kristalle abnimmt. Um die Diffusion der gebildeten Radikale und die Reaktionsgeschwindigkeit der Sekundärreaktion im Kristall zu vermindern, werden Beugungsdaten von Proteinkristallen seit einigen Jahren überwiegend an eingefrorenen Kristallen bei 100 K gemessen. Wesentlich für das erfolgreiche Einfrieren von Proteinkristallen ist die Verwendung eines geeigneten Gefrierschutzmittels bzw. Tieftemperaturpuffers. Da die meisten Proteinkristalle einen Solvensanteil zwischen 40 und 60 % haben und die sich beim Einfrieren bildenden Eiskristalle den Aufbau des Proteinkristalls zerstören würden, ist ein teilweiser Austausch des Wassers im Inneren des Kristalls und an seiner Oberfläche gegen ein Gefrierschutzmittel notwendig. Die Erhöhung der Ethylenglykol-Konzentration des Kristallisationspuffers von 10 auf 30 % (v/v) erbrachte den gewünschten Effekt. Das Einfrieren verursacht aufgrund der geringeren thermischen Bewegung der Moleküle eine leichte Verkleinerung der kristallographischen Elementarzelle. Dabei werden die Achsen oft unterschiedlich beeinflusst. Im vorliegenden Fall verkürzte sich die c-Achse um

etwa 4 Å, während die a, b-Achsen konstant blieben. Die Verwendung von Synchrotronstrahlung (DESY, Hamburg) steigerte die Auflösung für Raumtemperaturmessungen auf 2.6 Å (Meßstation X11) und für Tieftemperaturmessungen auf bis zu 1.9 Å (Meßstation X11).

Tabelle 1: Statistiken der verwendeten nativen kristallographischen Datensätze. Der Datensatz Nativ-4 stammt von einem Kristall vom zweiten Hauptpeak der chromatographischen Reinigung. Der Inhibitor-Datensatz bezieht sich auf einen Komplex der Amylomaltase mit dem Maltotetraosederivat Acarbose.

	Nativ-1	Nativ-2	Nativ-3	Nativ-4	Inhibitor
Meßstation	Berlin	X11	BW7a	X11	X11
Temperatur [K]	298	277	100	100	100
Zellkonstante a ^a [Å]	156.17	155.49	155.68	155.83	155.17
Zellkonstante c ^a [Å]	66.96	68.40	64.23	63.83	64.36
Mosaizität	0.32	0.10	0.35	0.70	0.36
max. Auflösung [Å]	2.8	2.6	2.0	2.14	1.89
gesammelte Reflexe	100007	120487	347606	719661	763094
unabhängige Reflexe	21895	28067	56277	47201	66004
Vollständigkeit ^b [%]	94.4 (85.6)	95.6 (98.1)	94.0 (93.8)	96.5 (86.4)	94.4 (74.2)
R _{sym} ^{b, c} [%]	9.3 (46.0)	8.5 (33.7)	7.4 (33.7)	5.4 (19.1)	4.1 (26.2)

^aEs sind nur die variablen Zellkonstanten a und c der Raumgruppe P6₄ angegeben. Für die anderen gilt: a = b, α = β = 90°, γ = 120°.

^bDie Werte in Klammern beziehen sich auf die äußerste Auflösungsschale (2.90-2.80 Å), (2.69-2.60 Å), (2.07-2.00 Å), (2.22-2.14 Å), (1.96-1.89 Å).

^cR_{sym} = Σ |I_{obs} - <I>| / Σ <I>.

3.2.3 Raumgruppenbestimmung

Die Amylomaltase kristallisiert unter den genannten Bedingungen in der hexagonalen Raumgruppe P6₄. Die Punktsymmetrie wurde mit der Auswertungssoftware DENZO und SCALEPACK ermittelt und mit den Statistiken für R_{sym} überprüft. Die Bestimmung der Zähligkeit der Schraubenachse erfolgte durch die Auswertung der Intensitäten entlang der sechszähligen Achse. Mit dem Programm SCALEPACK, das die Intensitäten der vermeintlich ausgelöschten Reflexe mit deren Standardabweichungen ausgibt, wurden die Ergebnisse verifiziert.

3.2.4 Das Phasenproblem

Wird ein Einkristall mit Röntgenlicht durchstrahlt, so tritt aufgrund der Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit der Elektronenhülle Beugung auf. Die Beugung der Strahlung

resultiert aus der konstruktiven Interferenz zwischen den Teilstreuwellen benachbarter, um eine Translationsperiode verschobener Atome im Kristall*. Jeder einzelne Reflex ist durch seine Lage, Amplitude und Phase charakterisiert†. Mit den verwendeten Flächendetektoren lassen sich die Lagen und Intensitäten+ der einzelnen Beugungsreflexe bestimmen, die Phaseninformation jedoch geht verloren. Um dieses Phasenproblem zu lösen, gibt es verschiedene Methoden: Direkte Methoden, molekularer Ersatz, multiple anomale Dispersion (MAD) und der multiple isomorphe Ersatz (MIR). Direkte Methoden lassen sich mit heutigen Programmen nur für Strukturen bis maximal 10-15 kDa bei außergewöhnlich guter Auflösung von ca. 1.0 Å durchführen. Bei der Methode des Molekularen Ersatzes benutzt man die Struktur eines verwandten Enzyms als Startmodell. Da die Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* eine Masse von 55 kDa hat und keine homologen Strukturen existieren, wurden in dieser Arbeit die letzten beiden Ansätze zur Lösung des Phasenproblems verfolgt.

3.2.4.1 Multiple anomale Dispersion

Aufgrund der anomalen Dispersion gilt das Friedelsche Gesetz ($F(hkl) = F(-h-k-l)$) nicht mehr. In der Nähe der Absorptionskante eines Atoms ist die anomale Streuung am stärksten; sie nimmt mit steigender Elektronenzahl zu. Nur für Elemente mit einer Ordnungszahl größer als 24 liegt die K-Absorptionskante bei Wellenlängen, die an Synchrotronstrahlrohren verfügbar sind. Sammelt man in der Umgebung der Absorptionskante eines anomalen Streuatoms Diffraktionsdaten, kann man aus den unterschiedlichen anomalen Differenzen die Phasen berechnen (Smith, 1991). Proteine bestehen nur aus Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Wasserstoff, die alle relativ geringe Massen haben und damit nur sehr geringe anomale Dispersion zeigen. Der biochemische Einbau von Selen in Proteine, indem die natürliche Aminosäure Methionin durch

* Für jeden Reflex gilt die Braggsche Bedingung: $2d(hkl)\sin\vartheta = n\lambda$, wobei $d(hkl)$ der Abstand zwischen den reflektierenden imaginären Netzebenen beschrieben durch die Miller Indizes hkl , λ die Wellenlänge des eingestrahlten Röntgenlichts, n die Beugungsordnung und ϑ der Reflexionswinkel ist.

† Jeder Reflex wird durch den als Strukturfaktor bezeichneten Wellenvektor $\mathbf{F}(hkl) = F(hkl)e^{i\alpha(hkl)}$ vollständig beschrieben. F stellt die Amplitude ($F = |\mathbf{F}|$) und α die Phase der gebeugten Röntgenwelle dar.

+ Die Intensität eines Reflexes entspricht dem Betrag seines Strukturfaktors zum Quadrat ($I(hkl) = |\mathbf{F}(hkl)|^2$).

Selenomethionin ausgetauscht wird, ist ein neuer Ansatz, um schwere Atome in Proteine einzubauen (Hendrickson *et al.*, 1990, Budisa *et al.*, 1995).

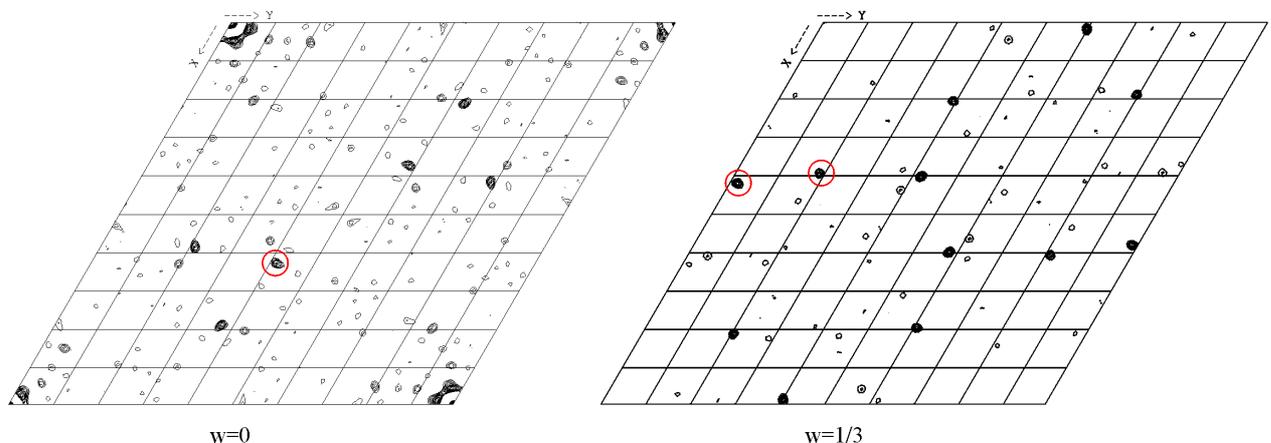
Aufgrund der erfolgreichen Phasenbestimmung mittels MIR wurde der Ansatz der multiplen anomalen Dispersion mit Selenomethionin nur bis zur Optimierung und Verifizierung der konstruierten Expressionssysteme verfolgt (Kapitel 3.1.1.2).

3.2.4.2 Multipler isomorpher Ersatz

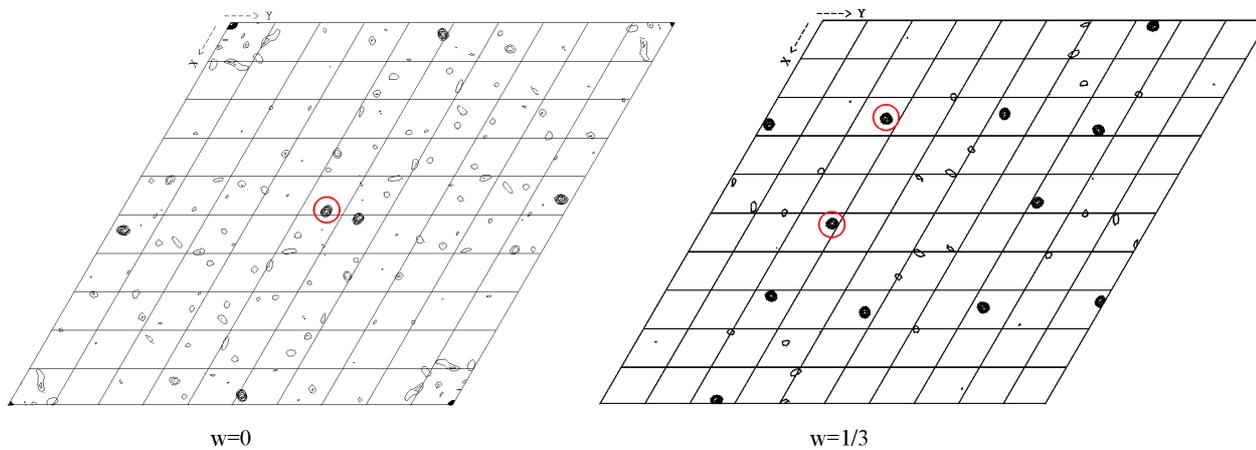
Um die Methode des multiplen isomorphen Ersatzes erfolgreich anwenden zu können, müssen neben dem nativen Datensatz noch isomorphe Schweratomdatensätze erhalten werden. Theoretisch reichen dafür zwei Derivatdatensätze aus. Aus den Streubeiträgen der Schweratome und dem resultierenden Unterschied zum nativen Datensatz können die Phasen berechnet werden (Busing & Levy, 1961). In der Praxis ist das Kriterium der Isomorphie meist nicht perfekt gegeben, weshalb in der Regel mehr als zwei Derivate für die Strukturlösung nötig sind.

Von Amylomaltase-Kristallen konnten mit sechs Schweratomreagenzien Derivate erhalten werden: *para*-Chlormercuribenzensulfonat (PCMBS), HgCl_2 , K_2PtCl_4 , $\text{KAu}(\text{CN})_2$, $\text{K}_2\text{Pt}(\text{SCN})_6$ und $(\text{CH}_3)_3\text{PbAc}$. Die Präparation und Analyse der Schweratomderivate wurde in Zusammenarbeit mit Dr. K. Tomoo durchgeführt. Bemerkenswerterweise haben alle Schweratome an unterschiedlichen Bindungsstellen angebunden (Abbildung 14, Tabelle 2).

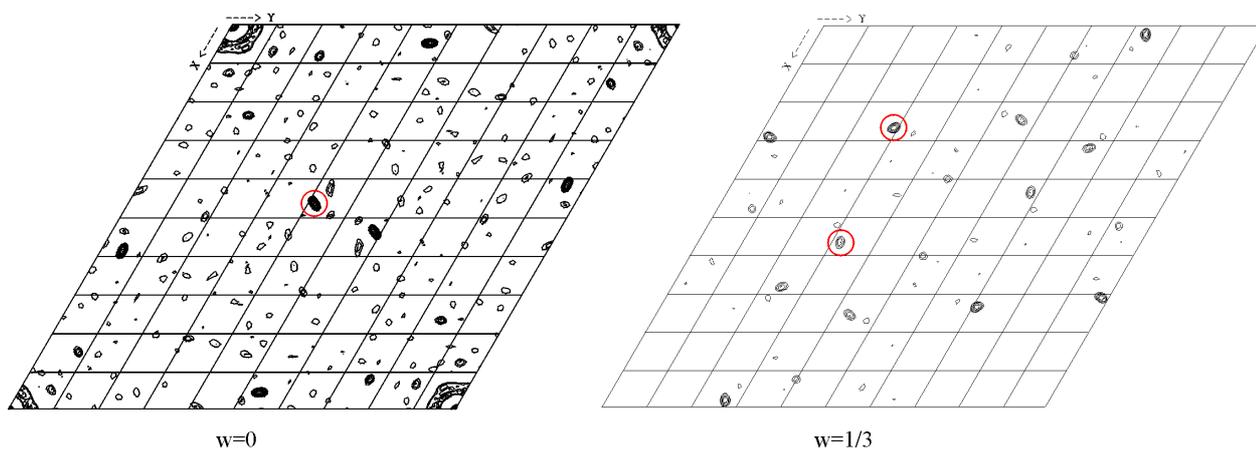
(a) PCMBS



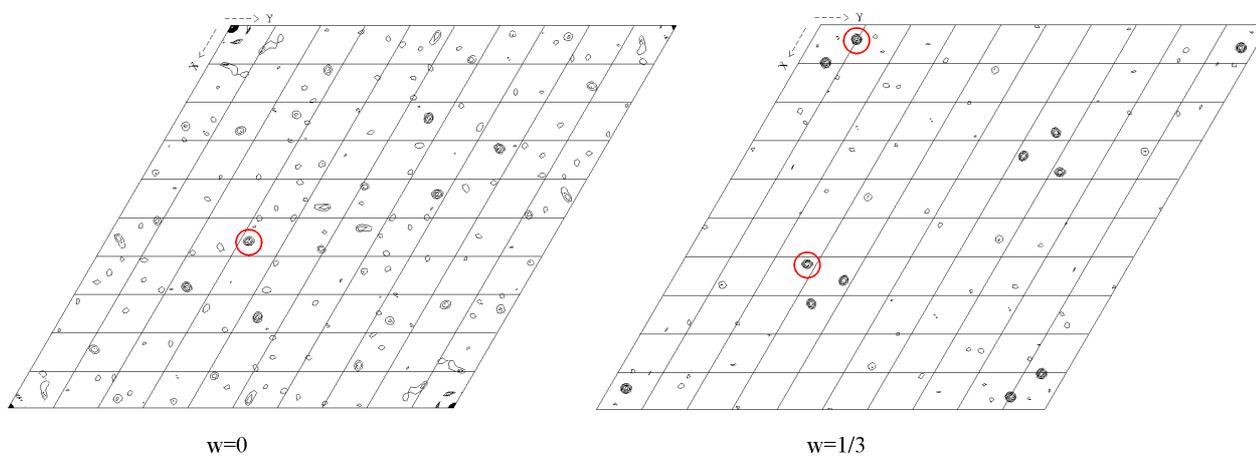
(b) HgCl_2



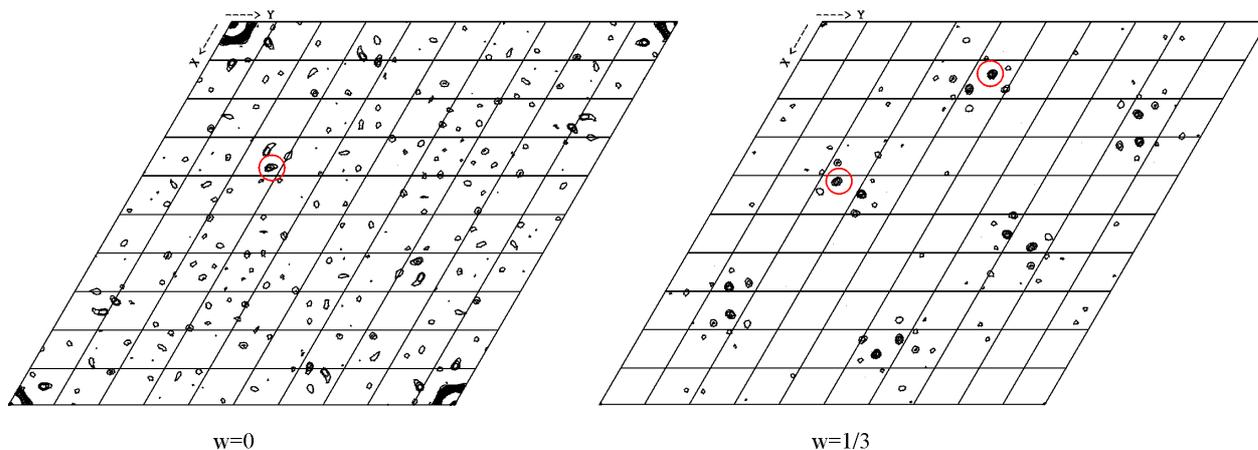
(c) K_2PtCl_4



(d) $\text{KAu}(\text{CN})_2$



(e) $\text{K}_2\text{Pt}(\text{SCN})_6$



(g) $(\text{CH}_3)_3\text{PbAc}$

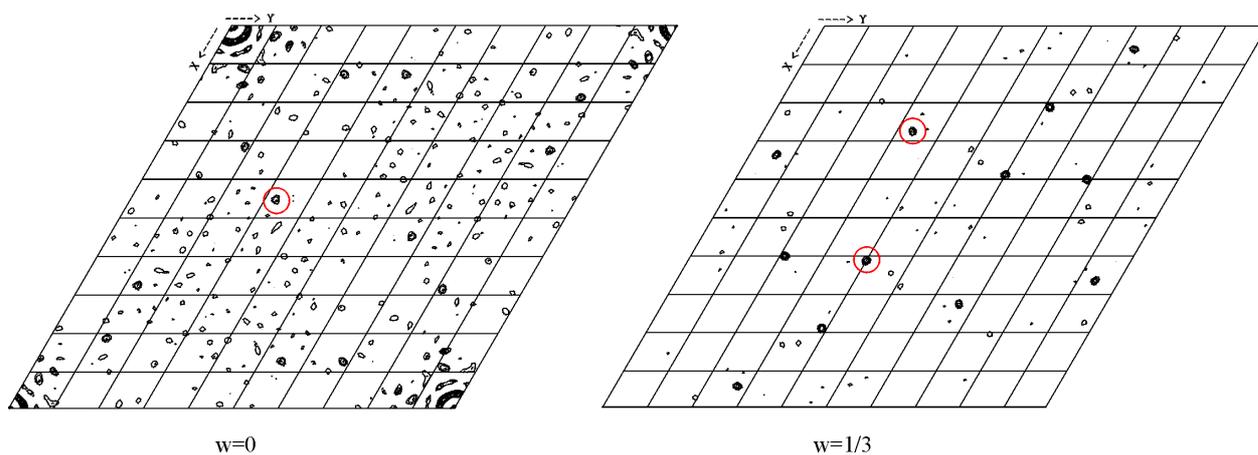


Abbildung 14: Harkerschnitte der Schweratomderivate für die Raumgruppe $P6_{2/4}$. Die Konturierung beginnt bei zwei σ_{rms} in ein σ_{rms} Schritten. Die Pattersonkarten wurden mit einer Auflösung zwischen 8 und 4 Å berechnet. Die relevanten Harkerpeaks sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet.

Tabelle 2: Schweratomlagen und berechnete Harkerpeaks der Schweratomverbindungen.

	PCMBS			HgCl ₂			K ₂ PtCl ₄		
Schweratomlage (x y z) ^a	0.61	0.81	0.00	0.98	0.26	0.46	0.98	0.27	0.75
1. Harkerpeak (u v w)	0.62	0.40	0.00	0.48	0.44	0.00	0.46	0.42	0.00
2. Harkerpeak (u v w)	0.42	0.01	0.33	0.54	0.30	0.33	0.56	0.31	0.33
3. Harkerpeak (u v w)	0.39	0.19	0.33	0.26	0.28	0.33	0.27	0.29	0.33

	KAu(CN) ₂			K ₂ Pt(SCN) ₆			(CH ₃) ₃ PbAc		
Schweratomlage (x y z) ^a	0.28	0.66	0.24	0.86	0.55	0.88	0.94	0.27	0.62
1. Harkerpeak (u v w)	0.56	0.32	0.00	0.38	0.28	0.00	0.46	0.34	0.00
2. Harkerpeak (u v w)	0.10	0.06	0.33	0.41	0.24	0.33	0.60	0.39	0.33
3. Harkerpeak (u v w)	0.62	0.28	0.33	0.14	0.45	0.33	0.27	0.33	0.33

^aDie Lagen der Schweratomverbindungen sind in fraktionellen Koordinaten angegeben.

Sämtliche Derivate mußten bei Raumtemperatur vermessen werden, da sie bei 100 K nur noch eine sehr geringe Isomorphie zu nativen Tieftemperaturdatensätzen hatten. Am Synchrotron in Hamburg gemessene hochaufgelöste Datensätze von nativem Protein und Derivaten konnten wegen ihrer geringen Isomorphie nur begrenzt verwendet werden.

Tabelle 3: Statistiken der Schweratomdatensammlung und Phasierung mit dem Datensatz Nativ-1 (Tabelle 1). Sämtliche Daten wurden auf den Instituts-eigenen Generatoren der AG Saenger bei 298 K gemessen.

	PCMBS	HgCl ₂	K ₂ PtCl ₄	KAu(CN) ₂	K ₂ Pt(SCN) ₆	(CH ₃) ₃ PbAc
Datensammlung						
Inkubationsdauer [Tage]	4	2	2	2	7	4
Konzentration [mM]	20	1	5	1	5	5
max. Auflösung [Å]	3.5	3.7	3.5	3.0	3.5	3.5
gesammelte Reflexe	57818	34439	53559	98961	44573	51148
unabhängige Reflexe	9293	9435	10607	17354	9568	7572
Vollständigkeit ^a [%]	80.4 (83.8)	92.1 (95.9)	88.6 (90.7)	92.8 (96.9)	80.2 (81.3)	62.6 (65.0)
R _{sym} ^{a, b} [%]	10.6 (22.6)	7.7 (13.4)	7.7 (16.0)	9.9 (46.2)	10.0 (23.0)	13.9 (33.1)
R _{iso} ^c [%]	17.1	16.2	13.3	14.0	11.5	20.0
Phasierung bis 3.0 Å						
Phasing power ^d	0.87 / 0.88	0.84 / 0.87	0.84 / 0.87	0.86 / 0.89	0.93 / 0.93	0.86 / 0.90

^aDie Werte in Klammern beziehen sich auf die äußerste Auflösungsschale.

^b $R_{\text{sym}} = \Sigma |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \Sigma \langle I \rangle$.

^c $R_{\text{iso}} = \Sigma |F_{\text{ph}}^2 - F_{\text{p}}^2| / \Sigma (F_{\text{ph}}^2 + F_{\text{p}}^2)$.

^dPhasing power = r.m.s. f / E_{iso} , Standardabweichung F / Fehler des lack of closure. Der erste Wert berechnet sich aus den zentrischen, der zweite aus den azentrischen Reflexen.

Die höchste Isomorphie und Phaseninformation wurde bei der Verwendung von nativen und Schweratomderivat-Datensätzen erhalten, die am Instituts-eigenen Diffraktometer gemessen worden waren (Tabelle 4). Die teilweise geringe Auflösung dieser Datensätze (Tabelle 3) wurde

durch die hohe Anzahl der Derivate und die unterschiedlichen Lagen der Schweratome ausgeglichen. Eine Analyse des *figure of merit* als Funktion der Auflösung zeigt, daß gute Phasen bis etwa 3.5 Å erhalten wurden.

Tabelle 4: „*figure of merit*“ als Funktion der Auflösung für alle Schweratomdaten in Bezug auf den Datensatz Nativ-1 (Tabelle 1).

Dmin ^a	Dmax ^a	azFOM ^{b, c}	zFOM ^{b, c}
29.51	7.68	0.79668	0.94324
7.68	5.52	0.72819	0.86761
5.52	4.54	0.60136	0.74456
4.54	3.94	0.42396	0.59452
3.94	3.53	0.30343	0.40132
3.53	3.23	0.11356	0.10995
3.23	2.99	0.09810	0.14168
2.99	2.80	0.00358	0.00433
		0.29454	0.51549

^aminimaler bzw. maximaler Auflösungsbereich
^bFOM der azentrischen bzw. zentrischen Reflexe; FOM,
^cFOM = Figure of merit. $FOM = \langle \cos(\Delta\alpha_h) \rangle$, wobei $\Delta\alpha_h$ der Fehler des Phasenwinkels für h ist.

3.2.5 Modellbau

Nach der Berechnung der Phasen mit SHARP (De La Fortelle & Bricogne, 1997) wurde die Elektronendichte mit FFT (CCP4, 1994) berechnet und mit SOLOMON (CCP4, 1994) verbessert. Beim Bau einer ersten groben Kette, dem Skelettmodell, half der regelmäßige Aufbau der Supersekundärstruktur des (β , α)₈-Fasses, das ein bekanntes, regelmäßiges Strukturmotiv darstellt. Einige Bereiche der Elektronendichte waren allerdings noch immer nicht eindeutig interpretierbar.

In der PDB existiert keine Struktur, deren Aminosäuresequenz eine signifikante Homologie zu der der Amylomaltase aus *T. aquaticus* hat. Tertiärstrukturen sind bekanntlich sehr viel besser konserviert als Aminosäuresequenzen. Speziell das (β , α)₈-Faß als Supersekundärstruktur unterliegt nur geringen strukturellen Änderungen. Bei der Suche nach verwandten Strukturen mit den bereits modellierten Kettenfragmenten mit dem Dali-Server (Holm & Sander, 1993) hatte Taka-

α -Amylase aus derselben Enzymfamilie wie die Amylomaltase die höchste strukturelle Homologie. Die anschließende Überlagerung mit den Ergebnissen des Dali-Servers zeigte, daß N- und C-Termini aufgrund der räumlichen Nähe (5 Å) der Aminosäuren Arg-5 und Arg-499 fälschlicherweise in dem derzeitigen Skelettmodell durch die langen Seitenketten dieser Reste verbunden worden waren. Desweiteren konnten die β -Stränge des Fasses durchnummeriert und alle übrigen unklaren Bereiche der Elektronendichte eindeutig interpretiert werden. Die erhaltene unverzweigte Skelettkette wurde erst durch eine Polyalaninkette und später durch die reale Aminosäurekette ersetzt. Die Übereinstimmung der Aminosäureseitenketten mit der Elektronendichte bestätigte das Skelettmodell im nachhinein, wobei anhand der Seitenketten zu kurz gebaute Schleifen bzw. Helices mit zu großer Ganghöhe erkannt und berichtigt wurden. 495 der 500 Aminosäuren konnten in die experimentelle Elektronendichte eingepaßt werden.

3.2.6 Kristallographische Verfeinerung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Strukturen der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* kristallographisch untersucht. Wie in den Methoden beschrieben (Kapitel 2.2.4), konnten von der Amylomaltase drei unterschiedliche Formen isoliert und zwei davon kristallisiert werden. Desweiteren konnte die Struktur der ersten Form der Amylomaltase in Komplex mit dem Inhibitor Acarbose, einem Maltotetraosederivat, erhalten werden.

3.2.6.1 Verfeinerung der Hauptkomponente der Chromatographischen Reinigung

Das auf experimentellen Phasen basierende Modell der Amylomaltase beruhte auf dem Datensatz Nativ-1. Dieser Datensatz mußte trotz seiner im Vergleich relativ geringen Auflösung von max. 2.8 Å (Tabelle 1) aus Gründen der Isomorphie zu den Schweratomderivat-Datensätzen verwendet werden. Um das erhaltene Strukturmodell an den hochaufgelösten Tieftemperatur-Datensatz (2.0 Å) anzugleichen, wurde in zwei Schritten vorgegangen.

Als erstes wurde das Modell an den am Synchrotron gemessenen Raumtemperatur-Datensatz (Nativ-2, Auflösung 2.6 Å) (Tabelle 1) mittels Starrer-Körper-Anpassung und folgender Moleküldynamik angeglichen (R/R_{frei} -Wert = 22.8/26.7).

Im zweiten Schritt wurde das erhaltene Modell wie im ersten Schritt auch mittels Starrer-Körper-Anpassung und folgender simulierter Aufheizung und Abkühlung des Enzyms an den

höchstaufgelösten Tieftemperatur-Datensatz (Nativ-3, Auflösung 2.0 Å) (Tabelle 1) angepaßt. Die Verwendung der höher aufgelösten Daten (2.6 Å auf 2.0 Å) ließ den R-Wert (R/R_{frei}-Wert = 28.9/31.0) ansteigen, da sich nun kleinere falsch interpretierte Bereiche des Proteinmodells und das noch fehlende Solvensmodell stärker bemerkbar machen.

Anschließend wurde das Modell in einem iterativen Verfahren, welches die Solvenssuche, die Korrektur der Enzymgeometrie, Moleküldynamik und die Verfeinerung der atomaren B-Faktoren einschließt, weiter verbessert. Die Struktur konvergierte bei einem R/R_{frei}-Wert von 19.6/22.6. Das endgültige Modell der Amylomaltase aus *T. aquaticus* bei 2.0 Å enthält alle 500 Aminosäuren und zusätzlich 739 Wassermoleküle. Die Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Verfeinerungsstatistik für die Struktur der nativen Amylomaltase.

Raumgruppe	P6 ₄
Zellkonstanten [Å]	a = b = 155.7, c = 64.2
Anzahl Proteine pro AU ^a	1
Wasseranteil im Kristall [%]	65
σ _{rms} Schranke	0
Auflösungsbereich [Å]	40 - 2.0
R / R _{frei} [%]	19.6 / 22.6
Reflexe in Arbeits-/Test-Datensatz	53416 / 2848
Anzahl der Atome / < B > [Å ²]	
Protein	4065 / 31.9
Wassermoleküle	739 / 48.9
Rmsd Bindungslängen [Å]	0.006
Rmsd Winkel [°]	1.22

^aAU, asymmetrische Einheit

3.2.6.2 Verfeinerung einer zweiten Form der Amylomaltase

Die zweite Form der Amylomaltase, die während der Reinigung im letzten chromatographischen Schritt erhalten wurde, konnte unter gleichen Bedingungen wie die erste Form kristallisiert werden. An der DESY Meßstation X11 in Hamburg konnte ein Datensatz bis 2.15 Å gemessen und wie in den Methoden (Kapitel 2.3.2.3) beschrieben prozessiert werden (Tabelle 1).

Um signifikante Unterschiede zwischen den beiden Strukturen zu erkennen, wurde die Struktur der ersten Fraktion der Amylomaltase-Reinigung mittels einmaliger Starrer-Körper-Anpassung, Moleküldynamik- und individueller atomarer B-Faktor-Verfeinerung an die kristallographischen Daten angepaßt (R/R_{frei} -Wert = 24.6/26.1). Die R-Werte spiegeln die Richtigkeit des Modells wider, so daß davon ausgegangen werden kann, daß zwischen den beiden Enzymformen keine großen Konformationsänderungen vorliegen. Beim Vergleich der Elektronendichten und Modelle am Grafikdisplay wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Dies steht in Übereinstimmung mit dem bereits in Kapitel 3.1.3 vermuteten Grund, einer Desaminierung von Amidseitenketten, für die unterschiedlichen Fraktionen der Amylomaltase. Die Carboxyl- und Amidgruppe unterscheiden sich lediglich in einem weiteren Proton am durch Sauerstoff ausgetauschten Stickstoff. Bei einer maximalen Auflösung von 2.0 Å bzw. 2.15 Å können allerdings noch keine Protonen lokalisiert werden, um diese Vermutung zu beweisen.

Wenn nicht weiter spezifiziert ist nachfolgend immer von der ersten Form der Amylomaltase die Rede.

3.2.6.3 Verfeinerung der Inhibitor-gebundenen Amylomaltase-Struktur

Um einen genaueren Einblick in den Reaktionsmechanismus, die Anbindung von Amylose und die Bildung zyklischer Produkte zu erhalten, wurden Kristalle der Amylomaltase mit verschiedenen Abkömmlingen von Maltooligosacchariden inkubiert. Verwendet wurden 3KB-CNP β -Maltopentaose, ein Maltopentaosederivat (Abbildung 15 a), Hoxa, ein Maltohexaosederivat (Abbildung 15 b) und Acarbose (Abbildung 16), ein Maltotetraosederivat. Für alle drei Kohlenhydratabkömmlinge konnte Terada *et al.* (mündliche Mitteilung) zeigen, daß die Aktivität der Amylomaltase herabgesetzt wird. Quantitative Untersuchungen wurden bisher aufgrund der komplexen Kinetik der Amylomaltase (Terada *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse) nicht durchgeführt.

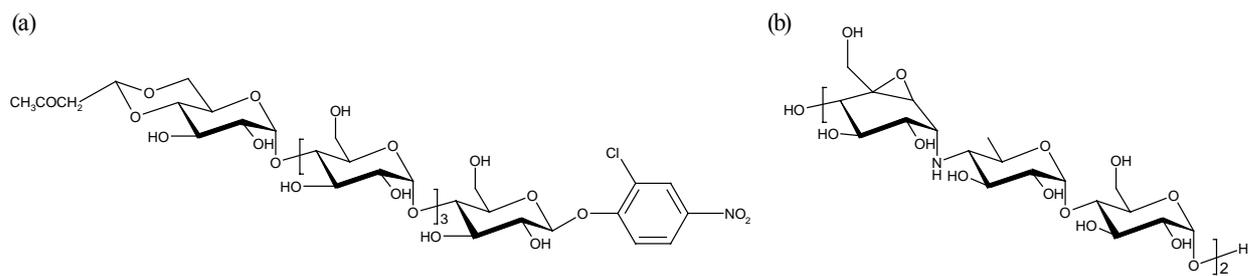


Abbildung 15: Molekulare Struktur von (a) 3KB-CNP- β -G5 und (b) Hoxa.

3KB-CNP- β -G5 (2-Chloro-4-nitrophenyl-4,6-O-3-ketobutyliden- β -maltopentaosid) wird in der Medizin für die Messung der menschlichen α -Amylase-Aktivität verwendet (Ishimaru *et al.*, 1992). Terada (mündl. Mitteilung) konnte zeigen, daß die Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* durch diesen Saccharidabkömmling inhibiert wird.

Hoxa wurde bei der Hoechst AG entwickelt und inhibiert mit seinen 4-Amino-6-deoxy- und Oxiran-pseudoglycosylischen Einheiten sowohl α -Amylasen als auch CGTasen (Parsiegla *et al.*, 1998).

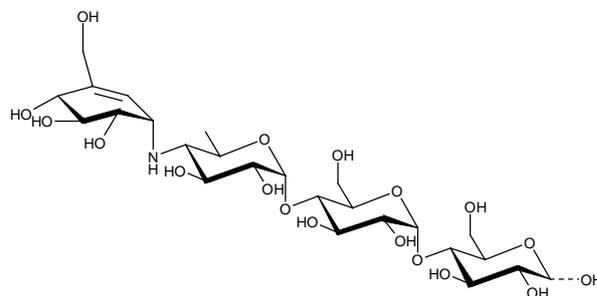


Abbildung 16: Molekulare Struktur der Acarbose.

Acarbose ist ein Naturprodukt, das schon mehrfach mit Familie-13-Enzymen komplexiert und kristallographisch untersucht wurde (Qian *et al.*, 1994; Strokopytov *et al.*, 1995; Gilles *et al.*, 1996; Strokopytov *et al.*, 1996; Brzozowski & Davies, 1997; Marek *et al.*, 1997; Fujimoto *et al.*, 1998; Mosi *et al.*, 1998; Wind *et al.*, 1998).

Für die Präparation der Amylomaltase-Komplexe mit den Inhibitoren wurde ein Kristall erst in Tieftemperaturpuffer überführt und equilibriert. Abschließend erfolgte die Inkubation in die jeweiligen Saccharidabkömmlinge enthaltenden Tieftemperaturpuffer. Nach unterschiedlichen Ver-

weildauern bei 4 °C und pH 9.0 wurden die Kristalle eingefroren und kristallographische Datensätze aufgenommen. Bei der Verfeinerung wurde die Struktur der nativen Amylomaltase als Startmodell verwendet und per Starrer-Körper-, Moleküldynamik- und individueller atomarer B-Faktor-Verfeinerung an die Beugungsdaten angepaßt. Anschließend wurde die Differenzelektronendichte berechnet und graphisch dargestellt, um entscheiden zu können, ob der Inhibitor gebunden hatte.

Tabelle 6: Verfeinerungsstatistik für den Komplex aus Amylomaltase mit Acarbose.

Raumgruppe	P6 ₄
Zellkonstanten [Å]	a = b = 154.0, c = 64.2
Anzahl Proteine pro AU ^a	1
Wasseranteil im Kristall [Vol %]	65
σ_{rms} Schranke	0
Auflösungsbereich [Å]	50 - 1.89
R / R _{free} [%]	19.2 / 21.9
Reflexe in Arbeits-/Testdatensatz	63979 / 2025
Anzahl der Atome / < B > [Å ²]	
Protein	4065 / 29.4
Wasser	603 / 45.7
Ethylenglykol	2 / 32.6
Acarbose	2 / 37 - 49 ^b
Rmsd Bindungslängen [Å]	0.014
Rmsd Winkel [°]	1.61
^a AU, asymmetrische Einheit	
^b Der erste B-Wert gibt den durchschnittlichen Temperaturfaktor der Acarbose in der aktiven Tasche an. Der zweite Wert gehört zur zweiten gebundenen Acarbose.	

Während mit Hoxa und 3KB-CNP- β -G5 keine Anbindung beobachtet werden konnte, wurde mit Acarbose ein Komplex aus zwei Inhibitormolekülen und der Amylomaltase erhalten. Beugungsexperimente am DESY in Hamburg (Meßstation X11) lieferten einen Datensatz bis 1.9 Å Auflösung (Tabelle 1). Die Struktur enthält alle 500 Aminosäuren der Amylomaltase, 603 Wassermoleküle, 2 Ethylenglykole und 2 Acarbose-Moleküle. Die Verfeinerung konvergierte bei $R/R_{\text{frei}} = 19.2/21.9$ (Tabelle 6).