

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kristallstruktur der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* mit röntgenkristallographischen Methoden bestimmt. Die Amylomaltase wurde exprimiert, gereinigt und kristallisiert. Die Strukturbestimmung basiert auf röntgenkristallographischen Daten bis 1.9 Å und gelang mit der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes.

Die Struktur weicht in ihrem Aufbau deutlich von allen anderen bekannten Strukturen der  $\alpha$ -Amylase-Familie ab. Für ein tieferes Verständnis der Substratbindung wurde die Amylomaltase im Komplex mit einem Maltotetraosederivat untersucht. Mit Hilfe des Inhibitorkomplexes konnten Rückschlüsse auf die Substratbindung und die Bildung von zyklischen Amylosen gezogen werden.

### 6.1 Die Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der Amylomaltase

Zur Darstellung der Amylomaltase wurde neben der Expression auch die Reinigung des Enzyms optimiert. In der Aufreinigung spaltete sich das in der SDS-PAGE-Analyse rein erscheinende Protein in drei Fraktionen auf. Die Fraktionen wurden daher einzeln behandelt und auf ihre Unterschiede untersucht. Es wurde nachgewiesen, daß sie sich geringfügig in ihrem isoelektrischen Punkt, aber nicht strukturell unterscheiden. Eine mögliche Erklärung wäre eine Desaminierung verschiedener Amidseitenketten.

Zur Lösung des kristallographischen Phasenproblems mittels multipler anomaler Dispersion wurde der biochemische Einbau von Selenomethionin in Proteine im Labor etabliert und hat seitdem bei verschiedenen anderen Projekten Anwendung gefunden.

### 6.2 Die kristallographischen Arbeiten

*Kristallisation und Datensammlung.* Ausgehend von ersten kleinen Kristallen aus einem Kristallisations-Screen konnte das Streuvermögen der Kristalle von 6 Å unter Optimierung der Kristallisationsbedingungen und Verwendung von Tieftemperaturmessungen und Synchrotronstrahlung auf 1.9 Å verbessert werden.

*Das kristallographische Phasenproblem* wurde experimentell durch die Präparation von sechs Schweratomderivaten mit jeweils unabhängigen Schweratomlagen gelöst. Die Phasierung bis 2.8 Å lieferte dabei ein „*figure of merit*“ von 0.49.

*Das Modell* der Amylomaltase wurde bei einer Auflösung von 2.0 Å der kristallographischen Daten verfeinert. Das endgültige Modell enthielt zusätzlich zu einem Amylomaltase-Monomer 739 Wasser und konvergierte bei einem  $R/R_{\text{frei}}$  von 19.6/22.6 %.

Zusätzlich zum freien Enzym konnte ein *Komplex* aus Amylomaltase mit zwei Acarbose-Molekülen bei einer Auflösung von 1.9 Å röntgenkristallographisch untersucht werden. Das Modell enthält alle 500 Aminosäuren, 603 Wasser, 2 Ethylenglykole und 2 Acarbose und wurde bis  $R/R_{\text{frei}} = 19.2/21.9$  verfeinert.

### 6.3 Die Struktur

Das monomere Enzym katalysiert den inter- und intramolekularen Transfer von  $\alpha$ -1,4-Glucanen. Bei der intramolekularen Reaktion entsteht Cycloamylose mit einer Ringgröße von mindestens 22 bis einigen hundert Glucosen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* erstmals die Raumstruktur eines Proteins dieser Enzym-Klasse bestimmt.

Die Strukturanalyse der Amylomaltase zeigt, daß hinsichtlich der Proteinfaltung bis auf das Grundgerüst, die  $(\beta, \alpha)_8$ -Faßstruktur, kaum strukturelle Ähnlichkeiten zu den anderen Strukturen der Familie-13-Enzyme vorhanden sind. Im Gegensatz zu verwandten Enzymen besteht die Amylomaltase aus einer einzigen Domäne, die für den Vergleich in die Unterdomänen A, B1, B2 und B3 unterteilt wurde. Die für die homologen Enzyme essentielle C-terminale Domäne C ist nicht vorhanden. Nahezu zwischen jedem Faßstrang liegen bei der Amylomaltase Insertionen vor. Bei den homologen Enzymen findet man im Prinzip nur eine größere Insertion zwischen dem dritten und vierten Faßstrang. Diese Insertion, die für die Katalyse essentielle Domäne B, besteht bei diesen Enzymen vornehmlich aus  $\beta$ -Strängen während bei der Amylomaltase die analoge Unterdomäne B2 etwa fünfmal größer ist und hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices besteht.

Trotz der Unterschiede zu verwandten Enzymen erfüllt die Amylomaltase alle Charakteristika der  $\alpha$ -Amylase-Familie: Sie enthält die vier homologen Regionen mit den drei konservierten

katalytisch relevanten Aminosäuren und reagiert mit  $\alpha$ -glycosidischen Bindungen entweder unter Hydrolyse oder Transglycosilierung der  $\alpha$ -Glucane.

Im Inhibitor-Komplex hat eine Acarbose im aktiven Zentrum in den Bindungstaschen +1 bis -3 gebunden. Innerhalb der Familie-13 sind neben den drei aktiven Aminosäuren (Asp-293, Glu-340 und Asp-395) noch vier weitere Aminosäuren (Tyr-59, Asp-213, Arg-291 und His-394) im aktiven Zentrum konserviert. Zusammen bilden sie die wahrscheinlich minimale Einheit für ein aktives Katalysezentrum, welches  $\alpha$ -1,4-glycosidische Bindungen unter Retention der Konfiguration am C1-Atom prozessieren kann.

## 6.4 Die Bildung zyklischer Amylose

Aufgrund des Inhibitor-Komplexes wurde ein Bindungspfad für Amylose vorgeschlagen, der zur Bildung von Cycloamylose führen kann. Über dem aktiven Zentrum der Amylomaltase liegt eine aus etwa 12 Aminosäuren (247-255) bestehende Schleife. Die Bedeutung dieser 250er-Schleife wird anhand der herausstechenden Konservierung unter Amylomaltasen und eines D-Enzyms deutlich. Wichtige Einflußgrößen für die Bildung der Cycloamylose wären neben der 250er-Schleife die variable 460er-Schleife in Kombination mit den Tyrosinen 54 und 101 aus der Unterdomäne B2, dem Analogon zur essentiellen Domäne B der  $\alpha$ -Amylasen und CGTasen. Die unterschiedliche Spezifität bezüglich der gebildeten minimalen Ringgröße der Cycloamylose ist eine mögliche Erklärung für die geringe Konservierung der zweiten Bindungstasche der Amylomaltase.

Die Ringgröße der Cycloamylose entlang des angenommenen Pfades unter Vernachlässigung der helikalen Struktur der Amylose ist mit mindestens 17 Glucoseeinheiten nahe dem experimentellen Wert von 22.

## 6.5 Ausblick

In der industriellen Anwendung haben die Cyclodextrine und deren Derivate sehr vielfältige Anwendungen gefunden. Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* ist die erste bekannte Struktur eines Enzyms, welches die Bildung von Cycloamylosen mit mehr als acht Glucoseeinheiten katalysiert.

lysieren kann. Falls es gelingt, diese größeren Ringe großtechnisch herzustellen, würden sie wahrscheinlich eine ähnlich mannigfaltige technologische Anwendung finden.

Ein mögliches Fernziel weiterführender Arbeiten ist die Präparation von Mutanten der Amylomaltase, die nicht wie bisher eine große Bandbreite, sondern nur spezifische Ringgrößen von Cycloamylosen herstellen. Mit dieser Motivation wurde in dieser Arbeit die Struktur des Enzyms untersucht, charakterisiert und eine Hypothese für die Ringbildung erarbeitet. Diese Hypothese kann nun mittels weiterer Untersuchungen wie Deletionen, Insertionen und ortsspezifischer Mutagenese der für die Reaktionsspezifität als wichtig angenommenen Proteinbereiche biochemisch wie kristallographisch überprüft und verfeinert werden.