

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterielle Stämme

E. coli Stamm MC1062 (Terada *et al.*, 1999)

E. coli Stamm DSM5912 (DSMZ GmbH)

E. coli Stamm B834(DE3) (Novabiochem)

2.1.2 Expressionsvektoren

pFQG8 (Gen *malQ* mit Lac Promoter; Terada *et al.*, 1999)

pT7-7 (Plasmid mit T7 Promoter; Tabor & Richardson, 1985)

PT7IP (Gen *malQ* mit T7 Promoter)

2.1.3 Lösungen und Puffer

Kristallisationspuffer:

100 mM Bicine pH 9.0 bzw. Hepes pH 7.6, 17 % (w/v) PEG 8000, 10 % (v/v) Ethylenglykol, 0 bzw. 100 mM NaCl

(Das Protein wurde bei verschiedenen pH Werten und Salzkonzentrationen kristallisiert.)

Schweratompuffer:

100 mM Tris-HCl pH 7.6, 18.5 % (w/v) PEG 8000, 10 % (v/v) Ethylenglykol

Tieftemperaturpuffer:

100 mM Bicine pH 9.0, 18.5 % (w/v) PEG 8000, 100 mM NaCl, 30 % (v/v) Ethylenglykol

sonstige Puffer:

TED-XYZ: 20 mM Tris-HCl pH 7.2, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA

(XYZ: Gibt die Konzentration von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in mM an.)

PED-XYZ: 10 mM Na, K-Phosphat pH 7.0 , 1mM DTT, 0.1 mM EDTA

(XYZ: Gibt die Konzentration von NaCl in mM an.)

sterile Stammlösungen

jeweils 1 M: Glucose, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , Na_3Citrat , NaCl, NaH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

jeweils 1 g/l: Biotin (in 0.1 M NaOH), CaCl_2 , FeSO_4 , Thiamin

jeweils 1 mg/l: Spurenelemente (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , MoO_4^{2-})

jeweils 0.33 M: L-Methionin (in 0.5 M HCl), L-Selenomethionin (in 0.5 M HCl)

Glucose-Assay-Lösungen:

Stammlösung: Glu-AR-II* aufgelöst in 5 ml (5 % (w/v)) Phenol, 10 mg 4-Aminoantipyrin, 120 ml (100mM) Tris-HCl pH 7.0.

Lösung: 2 ml Stammlösung mit 13 ml Wasser mischen.

2.1.4 Nährmedien für die Zellanzucht

LB-Medium: 10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl werden nach dem Autoklavieren mit Ampicillin (100 mg/l) versetzt.

NM-Medium: Mit den sterilen Stammlösungen wurden die folgenden Endkonzentrationen eingestellt: 7.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8.5 mM NaCl, 55 mM KH_2PO_4 , 100 mM K_2HPO_4 , 1 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose, 1 mg/ml CaCl_2 , 1 mg/ml FeSO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ Spurenelemente (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , MoO_4^{2-}), 10 mg/ml Thiamin, 10 mg/ml Biotin, 0.3 mM Methionin bzw. Selenomethionin und 100 mg/l Ampicillin (Budisa *et al.*, 1995)

Amp-Platten: 1.5 % (w/v) Agar in LB-Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen unter 60 °C wurde das Antibiotikum Ampicillin (100 mg/l) zugegeben und die Platten gegossen.

Minimalagarplatten: 15 g Agar in 300 ml Wasser wurden autoklaviert und mit den sterilen Stammlösungen die angegebene Endkonzentration für eine 500 ml Lösung pipettiert: 50 mM Glucose, 9.4 mM Na_3Citrat , 1mM MgSO_4 , 20 mM NH_4Cl , 87 mM K_2HPO_4 , 32 mM NaH_2PO_4 und mit sterilem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Nachdem die Lösung unter 60 °C abgekühlt war, wurde Thiamin (10 mg/l), Biotin (10 mg/l) und Ampicillin (100 mg/l) hinzugegeben. (Budisa *et al.*, 1995).

*Glu-AR-II ist ein Gemisch aus Glucose-Epimerase, Glucose-Oxidase und einer Peroxidase, das in Pulverform bei der Firma Wako Chemicals, Japan bestellt wurde.

2.1.5 Chemikalien und Proteine

Marker für SDS-PAGE (*low molecular weight marker*; LMW-Marker) (Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa), α -Lactalbumin (14.4 kDa)) stammte von Amersham Pharmacia Biotech.

Der Marker für die isoelektrische Fokussierung (IEF-Marker) und die IEF 3-9 PhastGele wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Schweden bezogen.

Acarbose wurde freundlicherweise von der Bayer AG, Deutschland, Hoxa von der Hoechst AG, Deutschland zur Verfügung gestellt.

Sonstige Chemikalien und Puffersubstanzen wurden von Merck, Biomol, Sigma, Serva oder Fluka bezogen und hatten mindestens Analysenqualität.

2.2 Biochemische Methoden

E. coli Zellen des Stammes MC1062 mit dem Plasmid pFQG8, welches das Gen *malQ* aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* enthält, wurde von Dr. T. Takaha, Ezaki Glico Co., Japan, zur Verfügung gestellt.

2.2.1 Umklonierung des *malQ*-Gens in Methionin-auxotrophe Stämme

Das Gen *malQ* wurde in einen Methionin-auxotrophen *E. coli* Stamm (DSM5912) und einen Methionin-auxotrophen und die T7 RNA-Polymerase enthaltenden *E. coli* Stamm (B834(DE3)) kloniert.

Für die Klonierung der Amylomaltase in DSM5912 wurde das Plasmid pFQG8 aus dem *E. coli* Stamm MC1062 durch präparative Plasmidisolierung (Sambrook *et al.*, 1989) gewonnen, in den Methionin-auxotrophen *E. coli* Stamm DSM5912 transformiert (Sambrook *et al.*, 1989) und auf Methionin enthaltenden Minimalagarplatten ausgestrichen. Zur Charakterisierung wurden von dieser Platte einzelne Kolonien auf zwei Minimalagarplatten, von denen eine Methionin enthielt und eine nicht, verteilt. Von einer Kolonie, die nur auf der Methionin enthaltenden Platte gewachsen war, wurde eine Glycerinkultur (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt und bei -80° C gelagert.

Für den zweiten Methionin-auxotrophen Stamm wurde das Gen *malQ* mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NdeI aus dem Plasmid herausgeschnitten (Abbildung 5) und isoliert (Sambrook *et al.*, 1989).

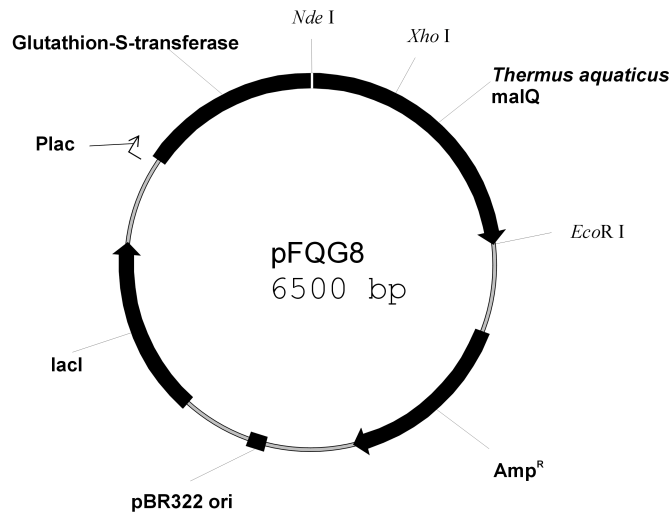


Abbildung 5: Relevante Bereiche des Plasmides pFQG8. Die Restriktionsstellen liegen bei 0 (*Nde* I), 400 (*Xho* I) und 1500 (*EcoR* I) Basenpaaren. Amp^R bezeichnet das Gen für die Ampicillinresistenz, *lacI* codiert den *lac*-Repressor und *Plac* enthält das *lac*-Operon.

Anschließend wurde es in das Plasmid pT7-7 (Tabor & Richardson, 1985), welches den Promoter der T7 RNA-Polymerase enthält, inseriert und nachfolgend in den Methionin-auxotrophen T7 RNA-Polymerase enthaltenden Stamm B834(DE3) transformiert und auf Amp-Platten selektiert (Sambrook *et al.*, 1989). Die Charakterisierung der Kolonien erfolgte sowohl durch Miniexpression (Sambrook *et al.*, 1989) als auch durch Verdau des isolierten Plasmids (Sambrook *et al.*, 1989) mit jeweils zwei der Restriktionsenzyme NdeI, EcoRI und XhoI. Die dabei entstandenen Bruchstücke wurden mit Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Größe untersucht und entsprachen den theoretisch berechneten Längen.

2.2.2 Expressionsoptimierung

Die Expression des *malQ*-Gens wurde einzeln für alle drei *E. coli*-Stämme optimiert. Die Vorgehensweise war jeweils identisch. Für die Anzucht der Methionin-auxotrophen Stämme wurden mit Methionin (0.3 mM) versetzte Minimalagarplatten (Hädener *et al.*, 1993, Budisa *et al.*, 1995) und Methionin enthaltendes New Minimal Medium (NM-Medium) (Budisa *et al.*, 1995) verwendet. Wenn nicht besonders erwähnt, wurden sonst Agarplatten und LB-Medium für die

Bakterienaufzucht eingesetzt. 50 ml Hauptkultur wurden mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37° C und 200 UpM inkubiert. Bei optischen Dichten (Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm, OD₆₀₀) von 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 und 1.2 wurden jeweils dreimal 3 ml abgenommen und mit IPTG verschiedener Konzentration (Endkonzentration 10, 100, 1000 µM) induziert. Nach 2, 4, 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden aus den 15 Ansätzen jeweils 0.5 ml Probe entnommen, zentrifugiert (14000 UpM, 5 min, 1378 Rotor, Heraeus), das Zellpellet in 10 µl PED Puffer resuspendiert, auf 70° C für 15 min erhitzt, erneut zentrifugiert (14000 UpM, 5 min, 1378 Rotor, Heraeus), mit 1 µl 10x SDS-PAGE Buffer versetzt und mit Hilfe eines 10 %-igen Proteingels (Laemmli, 1970) auf den Expressionsanteil der Amylomaltase untersucht.

2.2.3 Fermentation

Die verschiedenen *E. coli* Stämme mit dem Gen *malQ* wurden bei -80° C in 30 %-iger Glycerinlösung aufbewahrt. Zur Anzucht wurden Zellen auf Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Mit einer Kolonie wurden dann 50 ml steriles LB-Medium angeimpft und bei 37° C und 180 UpM über Nacht geschüttelt. Für die Anzucht der Hauptkultur wurden 1.2 l LB-Medium in einem 2-Liter-Schüttelkolben vorgelegt und mit 1.2 ml (1:1000) der Übernachtskultur angeimpft. Zur Kontrolle des Zellwachstums wurde die Absorption von 1 ml Aliquots der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm halbstündlich gemessen. Bei einer Extinktion von OD₆₀₀ = 0.8 (etwa vier Stunden nach dem Animpfen), wurde die Expression der Amylomaltase durch Zugabe von IPTG (1 mM) induziert. Nach fünf Stunden wurden die Zellen in einem GS3 Rotor (Sorvall) bei 7500 UpM 10 min zentrifugiert und gewogen. Aus 1 l Medium wurden durchschnittlich 6 g Zellen erhalten (Naßgewicht). Nach Resuspension in 50 ml PED Puffer wurden die Zellen über Nacht bei 4° C aufbewahrt.

2.2.4 Zellaufschluß und Proteinreinigung

Sämtliche nachfolgend beschriebene Schritte wurden bei 4° C durchgeführt. Zum Zellaufschluß wurde die Suspension zweimal mit einer Zellpresse (French Press, Aminco) bei einer Druckdifferenz von 6 MPa behandelt. Nach anschließender Abzentrifugation (20000 UpM, 30 min, SS34 Rotor, Sorvall) der Zellrückstände wurde der Überstand für 15 min auf 70° C erhitzt, so daß thermolabile Proteine ausfielen und durch erneute Zentrifugation (20000 UpM, 30 min, SS34 Rotor, Sorvall) abgetrennt werden konnten.

Die beiden weiteren Reinigungsschritte beruhen auf chromatographischen Techniken, die an einer FPLC Anlage (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt wurden. Der Verlauf der Chromatographie wurde anhand der Absorption bei 280 nm und der Leitfähigkeit verfolgt. Die Zusammensetzung der gesammelten Fraktionen wurde mittels denaturierender Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) festgestellt.

Der verbliebene Überstand wurde mit Zugabe von PED-4000 Puffer auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 1 M eingestellt, 1 h gerührt, filtriert und auf eine mit PED-500 Puffer äquilibrierte hydrophobe Interaktionssäule geladen (100 ml Säulenmaterial von ToyoPearl M650, XK 16/70 Säulenkörper von Amersham Pharmacia Biotech, Flußrate 4 ml/min). Nach dem Waschen (ein Säulenvolumen) der Säule mit PED-500 Puffer wurde die Amylomaltase mit einem Gradienten von 500 mM bis 0 mM Ammoniumsulfat eluiert (2.5 Säulenvolumen, Gradient, gemischt aus PED-0 und PED-500 Puffer) und einer anschließenden Stufe (1.5 Säulenvolumen, PED-0 Puffer) eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Bestandteile überprüft. Amylomaltase enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und gegen TED Puffer über Nacht dialysiert.

Für den zweiten chromatographischen Reinigungsschritt wurde die Proteinlösung auf einen starken Anionenaustauscher (Amersham Pharmacia Biotech, MonoQ HR10/10, 8 ml Säulenvolumen, Flußrate 1 ml/min) geladen. Die Amylomaltase wurde nach dem Waschen mit TED-20 Puffer durch einen linearen Gradienten von TED-20 auf TED-300 Puffer (4 Säulenvolumen) eluiert. Die vereinigten Fraktionen wurden über Nacht gegen TED-100 Puffer dialysiert, in Centripreps (Amicon) auf 10 mg/ml aufkonzentriert und bei 6 °C gelagert.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Bradford-Methode (Bradford, 1976) verwendet. Hierbei wird die Absorption der Proteinlösung bei 600 nm nach Zugabe von Bradford-Reagenz bestimmt. Anhand einer mit Rinder-Albumin erstellten Eichkurve wurde die Konzentration ermittelt.

2.2.6 Bestimmung der Glucanotransferase-Aktivität

Die Aktivität der Amylomaltase wurde nach einer Methode von Terada *et al.*, 1999 bestimmt, wobei im ersten Schritt Maltotriose zu Glucose und Maltopentaose disproportioniert wird. Die Menge der gebildeten Glucose wurde mit der Glucose-Oxidase-Methode (Miwa *et al.*, 1972) gemessen. Hierbei wird die α -D-Glucose in β -D-Glucose epimerisiert. In einem zweiten Schritt wird die β -D-Glucose zu Glukonat oxidiert, wobei sich Wasserstoffperoxid bildet, dessen Menge mittels einer Farbreaktion spektroskopisch bestimmt wird.

60 μ l Enzym (0.01 mg/ml) wird mit 60 μ l Substratlösung (20 % (w/v) Maltotriose) gemischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Das Enzym wird sodann für 20 min bei 95 °C inaktiviert. Nach Zugabe von 900 μ l Glucose-Assay-Lösung wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert und die Absorption bei 505 nm gemessen.

2.2.7 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Für die Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde das PhastSystem in Kombination mit PhastGelen (IEF 3-9) von Amersham Pharmacia Biotech benutzt. Das mitgelieferte Protokoll für die Silberfärbung der nativen Gele wurde für den Nachweis der Proteine verwendet.

2.3 Kristallographische Methoden

2.3.1 Kristallisation

Zur Kristallisation der Amylomaltase wurde die jeweilige Proteinstammlösung zentrifugiert (14000 UpM, 5 min, 1378 Rotor, Heraeus) und filtriert (0.2 μ m Durchmesser). Für die Kristallisationsexperimente wurde die Dampfdiffusionsmethode (Ducruix & Giegé, 1992) verwendet. Die Experimente wurden in Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen (Limbro, ICN Flow, Meckenheim) durchgeführt. 1.0 ml einer sogenannten Reservoirlösung wurden in der Vertiefung vorgelegt, 2 μ l der zu kristallisierenden Probe und 2 μ l Reservoirlösung auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert, das Deckglas umgedreht und auf den gefetteten Rand der Vertiefung gelegt, so daß ein geschlossenes System entstand. Die Schalen wurden bei 18° C aufbewahrt und nach dem Ansetzen täglich, später in größeren Abständen unter einem Binokularmikroskop (Olympus SZ60) kontrolliert.

2.3.2 Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten

Sämtliche Kristalle wurden mit der Rotationsmethode (Arndt & Wonacott, 1977) entweder in Quarzglaskapillaren (Firma W. Müller, Berlin) bei Raumtemperatur oder in Schlaufen (Hampton Research) unter Stickstoffstrom bei 100 K vermessen und die Diffraktionsdaten an Imageplate-Systemen (Firma MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Hochaufgelöste Daten wurden am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg an den Meßstationen X11 und BW7a des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) gemessen. Als Strahlungsquelle in Berlin diente ein Röntgenerators mit rotierender Kupferanode (ENRAF-Nonius FR571, Delft).

2.3.2.1 Vorbereitung der Kristalle zum Messen bei Raumtemperatur

Für die Datensammlung bei Raumtemperatur wurde ein Kristall mit Mutterlauge in eine Quarzglaskapillare (Wandstärke 0.01 mm, Durchmesser je nach Kristallgröße 0.3 bis 0.7 mm, Firma W. Müller, Berlin) gesaugt und mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette von Mutterlauge befreit. Um zu verhindern, daß der Kristall austrocknet, wurde an einem Ende der Kapillare Mutterlauge oder Reservoirlösung gegeben, die Kapillare mit Hartwachs (Harvard, Glaswachs, Berlin) auf beiden Seiten versiegelt und auf einem Goniometerkopf befestigt.

2.3.2.2 Vorbereitung der Kristalle zum Messen bei 100 K

Für die Datensammlung bei tiefen Temperaturen (100 K) wurde ein Kristall mit Hilfe einer Schlaufe (Firma Hampton Research, Kalifornien, USA) in eine Lösung überführt, die der Reservoirlösung entsprach, wobei die Konzentration von PEG 8000 um 10 % erhöht wurde, um die geringere Proteinkonzentration zu kompensieren. Danach wurde die Ethylenglykolkonzentration in Schritten von 5 % (v/v) auf 30 % (v/v) erhöht. Der Kristall wurde nach jeder Konzentrationsänderung mindestens 10 min in der Lösung belassen und zuletzt ca. 30 min im Tieftemperaturpuffer inkubiert. Anschließend wurde der Kristall ebenfalls mit Hilfe einer Schlaufe entweder im Stickstoffstrom oder für den Transport in flüssigem Propan schockgefroren (Rodgers, 1994).

2.3.2.3 Datensammlung

Vor der Sammlung eines Datensatzes wurde eine Oszillationsaufnahme durchgeführt und mit DENZO in Verbindung mit dem Graphikprogramm XDISPLAYF (Otwinowski, 1993) indiziert

und prozessiert. Mit den Programmen PREDICT oder STRATEGY wurde unter Vorgabe der angestrebten Vollständigkeit der Datensammlung der optimale totale Rotationswinkel und Startwinkel bestimmt. Das Winkelinkrement und der Abstand zwischen Detektor und Kristall wurden ebenfalls mit Hilfe des am Anfang aufgenommenen Beugungsbildes unter Berücksichtigung der Zellparameter, der Kristallmosaizität, der Strahleigenschaften und der zu messenden Auflösung gewählt (Dauter, 1999). In SCALEPACK (Otwinowski, 1993) wurden die einzeln integrierten Beugungsbilder aufeinander skaliert, die partiellen Reflexe aufsummiert und die Kristallparameter wie Gitterkonstanten und Mosaizität verfeinert. Dabei wurden die Gitterkonstanten und die Mosaizität einheitlich für den gesamten Datensatz berechnet und nicht unabhängig für jedes Bild. Aus den Intensitäten und ihren Standardabweichungen wurden dann mit dem Programm TRUNCATE Strukturfaktoramplituden mit ihren Standard-Fehlergrenzen berechnet.

2.3.3 Phasenbestimmung mittels MIR

2.3.3.1 Darstellung der Schweratomderivate

Das Phasenproblem bei der Röntgenstrukturanalyse wurde mit Hilfe des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR) gelöst. Dazu ist es notwendig, zum nativen Kristall isomorphe Schweratomderivate herzustellen, d. h., daß sich die Kristallparameter und die molekulare Struktur des Enzyms im Vergleich zum nativen Datensatz nicht ändert. Zur Darstellung der Derivate wurden die Kristalle in Schweratompuffer, der das jeweilige Schweratomderivat enthielt, umgesetzt und bei 18 °C inkubiert. Die Kristalle wurden nach unterschiedlichen Zeiträumen wie beschrieben bei Raumtemperatur vermessen und prozessiert.

2.3.3.2 Bestimmung der Schweratomlagen

Mit dem Programm SCALEIT (CCP4, 1994) wurden die Schweratomdatensätze auf einen nativen Datensatz skaliert. Bei diesem Schritt wurde auch kontrolliert, ob die aufeinander skalierten Datensätze dieselbe Aufstellung haben. Für hexagonale Kristalle der Punktsymmetriegruppe 6 existieren zwei unterschiedliche Aufstellungen mit denselben Gitterkonstanten. Die Skalierung zweier Datensätze mit unterschiedlichen Aufstellungen führt zu sehr großen Differen-

zen zwischen den Strukturfaktoramplituden in den einzelnen Auflösungsschalen ($R_{\text{iso}}^* \approx 50\%$), die sich deutlich von den isomorphen Differenzen zwischen nativem und derivatisiertem Protein bei gleicher Aufstellung unterscheiden ($R_{\text{iso}}^* \approx 5-20\%$). Die Schweratomlagen der einzelnen Derivate wurden mit dem Programm RSPS (CCP4, 1994) aus isomorphen Differenz-Patterson-Dichten bestimmt. In der Raumgruppe $P6_{2/4}$ existieren für jede Schweratomlage drei Peaks in den Harker-Schnitten $w = 0$ und $w = 1/3$.

Zur Bestimmung von schwächer besetzten Schweratomlagen wurden Kreuz-Differenz-Fourier-Synthesen mit Phasen, die mit Hilfe der Schweratommodelle und Daten anderer Derivate gewonnen wurden, berechnet.

2.3.3.3 Berechnung der Phasen

Mit dem Programm SHARP (De La Fortelle & Bricogne, 1997) wurden die Lagen und Temperaturfaktoren der Schweratome verfeinert und die Phasen berechnet. Die Verfeinerung bis zur Konvergenz der Besetzungs- und B-Faktoren der Derivate erfolgte abwechselnd in Kombination mit den Schweratomkoordinaten.

2.3.4 Berechnung der Elektronendichte und angewandte Dichtemodifikationen

Elektronendichten wurden mit dem Programm FFT (CCP4, 1994) aus den nativen Strukturfaktoramplituden und den aus dem multiplen isomorphen Ersatz erhaltenen Phasenwinkeln berechnet. Das Programm SOLOMON (CCP4, 1994) wurde eingesetzt, um mit der Dichtemodifikation (*solvent flattening*) in einem iterativen Prozeß die Phasen zu verbessern. Die maximale Auflösung der Schweratomdaten ist häufig geringer als die der nativen Daten. Ein weiteres Problem ist die Abnahme der Isomorphie mit zunehmender Auflösung. Das genannte Programm erlaubt eine Phasenerweiterung und ermöglicht es, alle Daten trotz geringer Isomorphie bis zur maximalen Auflösung verwenden zu können.

$$*R_{\text{iso}} = \Sigma |F_{\text{PH}}^2 - F_{\text{P}}^2| / \Sigma (F_{\text{PH}}^2 + F_{\text{P}}^2).$$

2.3.5 Interpretation der Elektronendichte und Verfeinerung des Modells

2.3.5.1 Modellbau

Zum Modellbau wurde das Programm O (Jones *et al.*, 1991) verwendet, welches gleichzeitig Elektronendichte, Protein-umhüllende Masken und Modellkoordinaten darstellen kann. Die Interpretation der Elektronendichte erfolgte in vier Schritten:

1. Berechnung einer Maske. Amylomaltase kristallisiert als Monomer in der asymmetrischen Einheit. Um während der Interpretation der Elektronendichte in den Bereichen der Kristallkontakte nicht in das nächste, kristallographisch identische Monomer zu „rutschen“, erzeugt man eine Maske mit dem Programm MAMA (Kleywegt & Jones 1993) um das Enzym und schneidet die Elektronendichte, die außerhalb der Maske liegt, ab.
2. Erzeugung eines Grundgerüsts innerhalb der Elektronendichte. Mit den „bones“-Befehlen der O Software wurde der experimentellen Dichte ein sogenanntes „bones“-Modell (Atomskelett) angepaßt. Der Vorteil der Skelettstruktur liegt in der einfachen Editierung der Koordinaten und Atomverbindungen. Im ersten Schritt sucht die Software dabei nach Dichtepicks mit einer vorgegebenen Höhe ($1.35 \sigma_{\text{rms}}$) und platziert im Zentrum eines jeden Dichtemaximums ein Skelettatom. Sind die Abstände der einzelnen Skelettkoordinaten kürzer als 1.6 Å, werden diese automatisch verbunden. Dieses Grundgerüst wird daraufhin manuell solange verändert, bis eine einzelne ununterbrochene, unverzweigte Kette durch die Elektronendichte innerhalb der Maske vorliegt. Bei der Anwendung dieser Prozedur wurde die Supersekundärstruktur des (β , α)₈-Fasses in der Elektronendichte erkennbar und erlaubte in diesen Bereichen die Unterscheidung zwischen möglichen bzw. falschen Verzweigungen. Die Interpretation von in der Dichte schwer erkennbaren Regionen konnte durch eine Überlagerung des vorläufigen Skelettmodells mit Taka- α -Amylase (Matsuura, *et al.*, 1984) mittels des Dali-Servers (Holm & Sander, 1993) erreicht werden. So wurde eine einzige durchgehende Kette erhalten. Zur Benutzung des Dali-Servers wurde aus der vorhandenen Skelettstruktur eine Polyalaninkette berechnet (Schritt 3).
3. Bau einer Polyalaninkette anhand des Skelettes. Das Ersetzen des „bones“-Atomskelett-Modells durch ein Polyalaninmodell erfordert die Festlegung der Richtung der Kette. Dies kann mit Hilfe der „Tannenbaum“-Struktur von α -Helices erfolgen. Die Struktur einer α -

Helix in Verbindung mit ihren Seitenketten erinnert, wenn man senkrecht auf die vertikal ausgerichtete Helixachse blickt, an einen Tannenbaum, wenn der C-Terminus dessen Spitze bildet, d. h. die Seitenketten weisen vorwiegend in Richtung des N-Terminus. Es wurde ein gut definierter helikaler Bereich in der Elektronendichte gesucht und so am Grafikdisplay orientiert, daß der „Tannenbaum“ und damit die Richtung der Polypeptidkette erkennbar wurde. Sekundärstrukturelemente wurden sodann mit Vorlagen der O Software für α -Helices und β -Strängen in die Dichte eingepaßt und mit dem „*baton_build*“ Befehl entlang des Skelettmodells verbunden. Die korrekte Stereochemie des Polyalaninmodells wurde mit dem „*refine*“ Befehl erzeugt.

4. Austausch der Polyalaninkette mit der Aminosäuresequenz der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*. Die Polyalaninkette wurde am Grafikdisplay Aminosäure für Aminosäure gegen die reale Aminosäurekette ausgetauscht („*mutate_replace*“).

2.3.5.2 Verfeinerung der Struktur

Für die kristallographische Verfeinerung mit CNS Version 0.4 (Brünger *et al.*, 1998) wurden die vom Autor angegebenen Protokolle verwendet. Zur Berechnung eines freien R-Wertes wurden ca. 2000 Reflexe als Testreflexe mit dem Protokoll „*make_cv*“ markiert. Im ersten Schritt der kristallographischen Prozessierung wurde das Modell mit einer Starre-Körper-Anpassung (Protokoll „*rigid*“) mit anschließender simulierter Aufheizung und Abkühlung des Enzyms („*anneal*“) an die Daten angepaßt.

In einem iterativen Verfahren wurden Koordinatenverfeinerung („*minimize*“) und konventionelle individuelle B-Faktorverfeinerung („*bindividual*“) mit Beschränkungen der Stereochemie bis zur Konvergenz des freien R-Wertes durchgeführt. Der optimale Gewichtungsfaktor des kristallographischen Terms in Relation zu den stereochemischen Termen wurde in Testverfeinerungsläufen bestimmt. Der freie R-Faktor diente als Gütekriterien für den Fortgang der Verfeinerung und neben Elektronendichte und anderen Kriterien (s. Kapitel 2.3.6) als Gütekriterium für die Qualität des Modells.

Für das Solvensmodell wurden in die Maxima der Differenzelektronendichte nahe der Oberfläche (max. 4 Å) des Proteinmodells Wassermoleküle eingefügt („*water_pick*“) und anhand der Abstände zu benachbarten Atomen manuell am Grafikdisplay auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.3.6 Darstellung von Komplexen der Amylomaltase mit Oligosaccharid-Abkömmlingen

Native Kristalle wurden bei 4 °C wie in Kapitel 2.3.2.2 beschrieben in Tieftemperaturpuffer überführt. Nach der Äquilibrierung wurden die Kristalle in einen 100 mM Inhibitor enthaltenden Tieftemperaturpuffer überführt und nach unterschiedlichen Verweildauern (0.5 h, 2 h und 4 h) 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 ein Substrat gebunden hatte.

2.3.7 Bau und Verfeinerung eines Komplexes der Amylomaltase mit Acarbose

Für die Strukturlösung mit CNS Version 0.9a (Brünger *et al.*, 1998) wurde die native Amylomaltase-Struktur per Starrer-Körper-Anpassung mit anschließender Moleküldynamik an die kristallographischen Daten angepaßt. Alle weiteren Verfeinerungen wurden wie vorher beschrieben durchgeführt, wobei zuerst das Modell des Proteins optimiert und danach die Acarbose in die Restelektronendichte eingepaßt wurde. Anschließend erfolgte wie bei der nativen Struktur das Einpassen von Wassermolekülen in die Differenzelektronendichte. Die Qualität der Elektronendichte reichte aus, um anfänglich modellierte Wassermoleküle im Verlauf der Verfeinerung als Ethylenglycol-Moleküle zu identifizieren.

2.3.8 Koordinatenanalyse und Koordinatenhinterlegung in der Protein-Datenbank

Die Atomkoordinaten wurden mit den Programmen CNS (Brünger *et al.*, 1998), O (Jones *et al.*, 1991), PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und WHATCHECK (Vriend, 1990) analysiert. Als Kriterien zur Evaluierung der Qualität der Proteinstruktur dienten die verschiedenen Indikatoren nach Kleywegt (2000).

Für die Strukturhinterlegung der nativen (1CWY) und Inhibitor-gebundenen Form (1ESW) der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* wurde das Hilfsprogramm ADIT der PDB (Bernstein *et al.*, 1977) und das Skript „*xtal_pdbsubmission*“ aus CNS verwendet.