

4 Strukturanalyse

4.1 Tertiärstruktur und Hauptkettenverlauf

4.1.1 Das $(\beta, \alpha)_8$ -Faß, eine Supersekundärstruktur

Die Amylomaltase besteht nur aus einer Domäne, deren Grundgerüst ein $(\beta, \alpha)_8$ -Faß ist. Diese Supersekundärstruktur wurde erstmals in der Triosephosphat-Isomerase (TIM) (Banner *et al.*, 1975) beobachtet und wird daher auch oft als TIM-Faß bezeichnet. Diese Bezeichnung kommt von einem Faß-ähnlichen Aufbau der Supersekundärstruktur, die aus acht α -Helices und acht β -Strängen besteht, die abwechselnd in der Sequenz aneinandergereiht sind (Abbildung 17), weshalb auch die Bezeichnung $(\beta, \alpha)_8$ -Faß üblich ist.

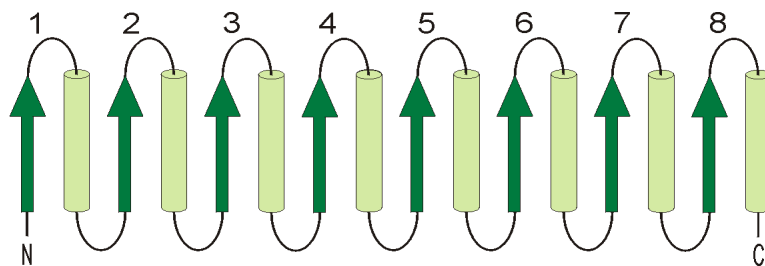


Abbildung 17: Abfolge der Sekundärstrukturelemente eines $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses. α -Helices sind durch Zylinder in hellgrün, β -Stränge durch Pfeile in dunkelgrün wiedergegeben.

Die Innenwand des Fasses wird von den acht parallelen, verdrehten β -Strängen aufgebaut, wobei die „Wand“ mit den für ein β -Faltblatt typischen Wasserstoffbrücken zwischen Strang 1 und Strang 8 geschlossen wird (Abbildung 18). Eine solche Anordnung von Helices und β -Strängen besteht aus mindestens 200 Aminosäuren und gehört zu den größten bekannten Domänen. Diese Domäne, die außergewöhnlich regelmäßig aufgebaut ist, kommt in vielen unterschiedlichen Enzymen vor. Das aktive Zentrum liegt bei allen bekannten Strukturen auf der C-terminalen Seite der β -Stränge.

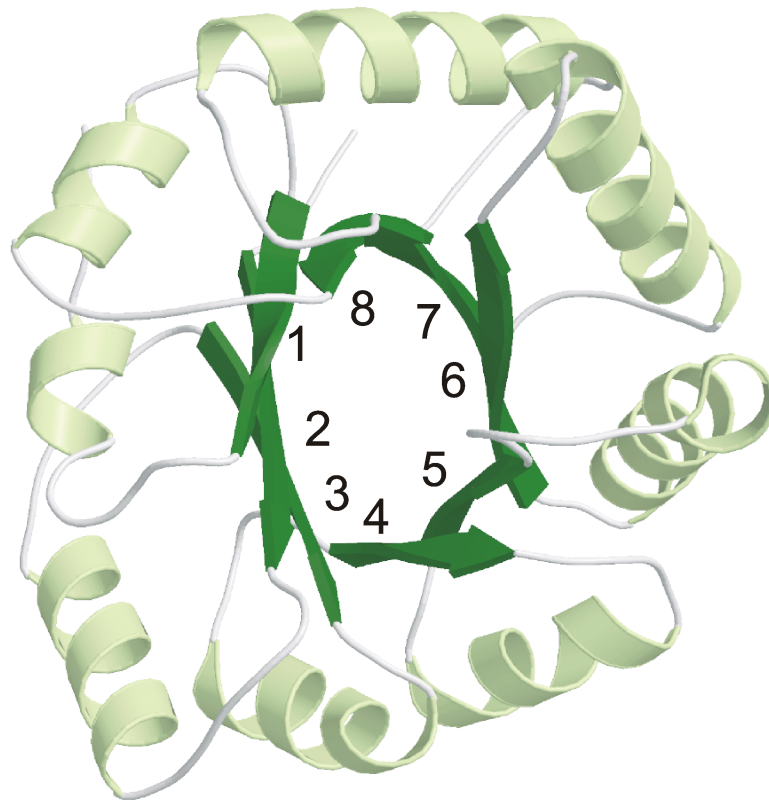


Abbildung 18: Anordnung der acht α -Helices und acht β -Stränge zum $(\beta, \alpha)_8$ -Faß. Die Abfolge der β -Stränge gemäß der Aminosäuresequenz sind angegeben. Die Farbhelligkeiten sind analog zu Abbildung 17. Die C-terminale Seite des Fasses befindet sich oberhalb der Papierebene. Die Struktur basiert auf dem TIM-Faß (Banner *et al.*, 1975), wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit zusätzliche Sekundärstrukturelemente nicht dargestellt wurden.

4.1.2 Domänenstruktur der Amylomaltase

Im Falle der Amylomaltase ist die Faßstruktur durch mehrere Einschübe unterbrochen (Abbildung 19). Nur zwischen dem fünften und sechsten sowie sechsten und siebten β -Strang des Fasses befinden sich keine zusätzlichen Sekundärstrukturelemente. Um die Strukturcharakteristika genauer beschreiben und mit verwandten Enzymen vergleichen zu können, wurden die Unterbrechungen in der Abfolge der Faßstruktur zu Unterdomänen zusammengefaßt. Andere Autoren haben die Strukturen verwandter Enzyme in Domänen A, B, etc. eingeteilt. Die Domäne A entspricht dabei dem hier als Unterdomäne A bezeichneten $(\beta, \alpha)_8$ -Faß. Die Unterdomäne B1 wird durch die Erweiterungen zwischen dem dritten und vierten (β_8 und β_{11}) sowie dem vierten und fünften (β_{13} und β_{14}) Strang des Fasses gebildet. Ein sehr großer Einschub zwischen dem zweiten und dritten (β_3 und β_5) Faßstrang bildet die Unterdomäne B2. Die restlichen Insertionen

in das Grundgerüst zwischen dem ersten und zweiten ($\beta 1$ und $\beta 3$), dem siebten und achten ($\beta 13$ und $\beta 14$) sowie nach dem achten ($\beta 14$) Strang sind in Unterdomäne B3 zusammengefaßt.

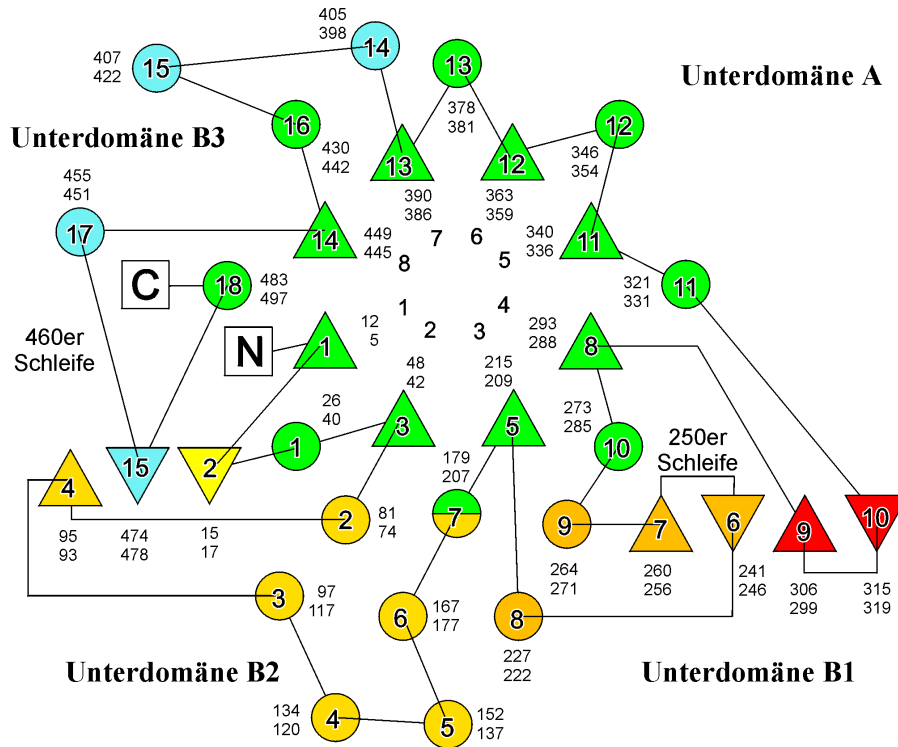


Abbildung 19: Topographische Darstellung der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*. β -Stränge sind als Dreiecke dargestellt. Dreiecke mit der Spitze nach oben zeigen mit dem N-Terminus in Richtung des Betrachters. α -Helices werden durch Kreise repräsentiert. Die erste und letzte Aminosäure eines Sekundärstrukturelements sind jeweils angegeben, wobei die oberen Nummern den Rest oberhalb der Papierebene angeben. Die Zahlen (1-8) innerhalb des Fasses geben die Reihenfolge der acht β -Stränge des (β , α)₈-Fasses an. Das (β , α)₈-Faß ist in grün (Unterdomäne A) und Insertionen zwischen dem ersten und fünften Faßstrang (Unterdomänen B2 und B1) sind in einem Gradienten von gelb nach rot eingefärbt. Alle weiteren Insertionen mit Sekundärstrukturelementen sind türkis unterlegt (Unterdomäne B3).

4.1.3 Aufbau und Form der Unterdomänen

Das aktive Zentrum liegt analog zu allen anderen bekannten Faßstrukturen auf der C-terminalen Seite des Fasses. Es wird gebildet und umgeben von den Insertionen, die in nahezu kontinuierlicher Abfolge rund um den Faßboden lokalisiert sind (Abbildung 20). Die Unterdomäne B1 besteht aus einem stark verdrehten viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt ($\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 9$ und $\beta 10$), das jeweils aus zwei Faltblättern aufgebaut ist. Desweiteren gehören noch zwei α -Helices ($\alpha 8$ und $\alpha 9$) zu dieser Domäne. Helix $\alpha 8$ sowie die Schleife zwischen dieser Helix und Strang $\beta 6$ wechselwirken mit Unterdomäne B2, die hauptsächlich aus α -Helices aufgebaut wird. Die

meisten dieser Helices sind um das N-terminale Ende der langen Helix $\alpha 7$ angeordnet, die zum Teil zum Grundgerüst gehört. Helix $\alpha 5$ und die Schleife zwischen Helix $\alpha 5$ und $\alpha 6$ wechselwirken mit der benachbarten Unterdomäne B1. Die Verbindung zwischen Unterdomäne B2 und den drei α -Helices von Unterdomäne B3 wird durch ein kurzes dreisträngiges β -Faltblatt ($\beta 2$, $\beta 4$ und $\beta 15$) hergestellt. Die β -Stränge stammen aus Insertionen zwischen dem ersten ($\beta 1$) und zweiten ($\beta 3$), dem zweiten ($\beta 3$) und dritten ($\beta 5$) und nach dem achten ($\beta 14$) Faß-Strang.

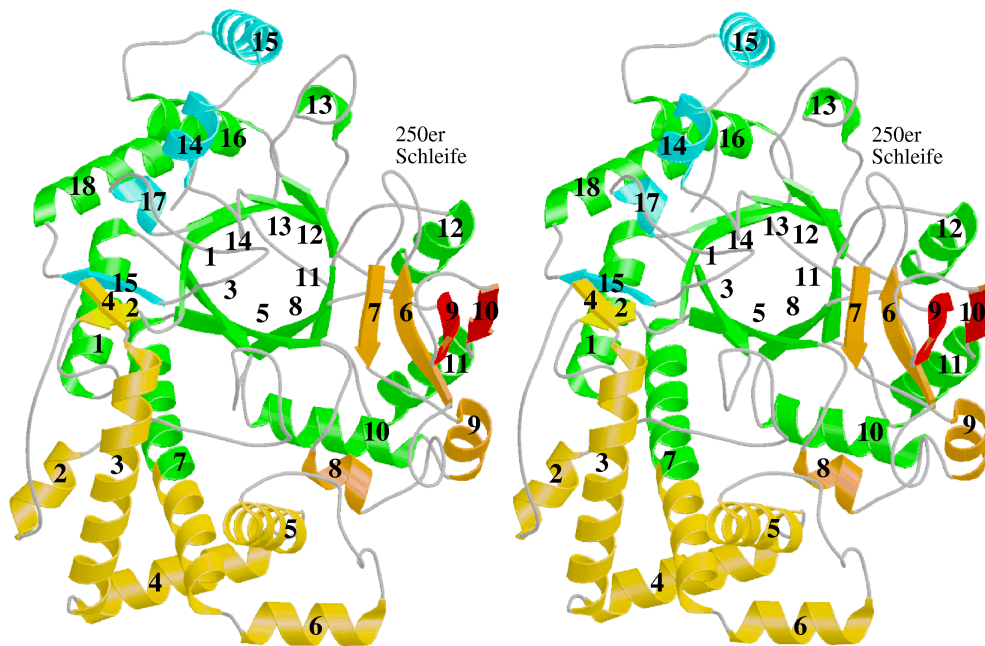


Abbildung 20: Die Faltung der Amylomaltase (Stereobild). α -Helices sind mit gedrehten Bändern, β -Stränge mit flachen Pfeilen gekennzeichnet. Die Farben haben die gleiche Kodierung wie in Abbildung 19. Die Programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und RASTER3D (Meritt & Murphy, 1994) wurden für die Erstellung der Abbildung verwendet.

4.2 Amylomaltase in Komplex mit Acarbose

4.2.1 Struktur der Acarbose

Für ein tieferes Verständnis des Reaktionsmechanismus und der Substratbindung der Amylomaltase wurden Ko-Kristallisationsexperimente mit verschiedenen Oligosacchariden durchgeführt, um die gebildeten Enzym-Substrat-Komplexe anschließend kristallographisch zu analysieren.

Es konnte nur ein Amylomaltase-Acarbose-Komplex erhalten werden. Bei den anderen beiden Inhibitoren konnte keine Elektronendichte beobachtet werden. Acarbose ist ein Maltotetraose-derivat (Abbildung 21), das aus *Actinoplanes* isoliert werden kann. Als Substratanalogon ist Acarbose mit seinem Valienamin-Motiv ein potenter reversibler Inhibitor für viele Enzyme der Familie-13 wie zum Beispiel der α -Amylase aus Schweinemagen ($K_i = 10 \mu\text{M}$) (Wilcox & Whitaker, 1984) aber auch für Enzyme der Familie-15 (Glucoamylasen ($K_i = 0.1 \mu\text{M}$) (Svensson & Sierks, 1992)). Die Amylomaltase reagiert mit Acarbose nicht nach der Michaelis-Menten-Kinetik, so daß eine Bindungskonstante K_i nicht angegeben werden kann (Terada *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). In der Medizin wird Acarbose als Medikament verwendet, um bei Diabetikern den Glucosespiegel im Blut zu regulieren (Yee & Fong, 1996, Baliga & Fonseca, 1997; Scheen, 1997). Das Pseudotetrasaccharid ist aus zwei Glucosen und zwei Glucose-ähnlichen Einheiten aufgebaut. Die Glucosen sind α -1,4-verknüpft, d.h. der Sauerstoff am anomeren Kohlenstoff C1 hat eine axiale Konfiguration und die Amylosekette wird durch eine Kondensation der Hydroxylgruppen an C1 und C4 aufgebaut (vgl. Abbildung 2). Acarbose unterscheidet sich in vier Punkten von der Maltotetraose (Abbildung 21). An der Einheit B der Kette ist die Hydroxylgruppe am C6-Kohlenstoff deletiert. Die α -1,4-O-glycosidische Verknüpfung der Einheiten A und B erfolgt über ein Stickstoffatom. Bei der Einheit A ist der O5 Sauerstoff durch einen Kohlenstoff (C7) ersetzt und die Einfachbindung zwischen C5 und C7 ist durch eine Doppelbindung substituiert.

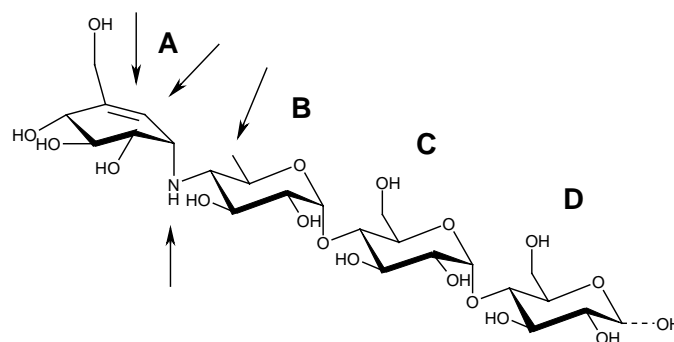


Abbildung 21: Unterschiede in der Struktur der Acarbose zu Maltotetraose. Die Abwandlungen im Vergleich zu Maltotetraose sind am nicht reduzierenden Ende des Pseudotetrasaccharides lokalisiert und mit Pfeilen markiert.

4.2.2 Bindungsstellen

Nach der Verfeinerung der Proteinstruktur konnten zwei größere Bereiche der Elektronendichte eindeutig als Acarbose interpretiert werden. Eine Acarbose hat im aktiven Zentrum gebunden und eine weitere ca. 14 Å davon entfernt. Nach der abgeschlossenen kristallographischen Verfeinerung wurde noch ein weiterer, größerer zusammenhängender Teil Restelektronendichte beobachtet. Diese Elektronendichte wurde als ein Glucosemolekül interpretiert, welches möglicherweise Teil einer dritten gebundenen Acarbose ist (Abbildung 22).

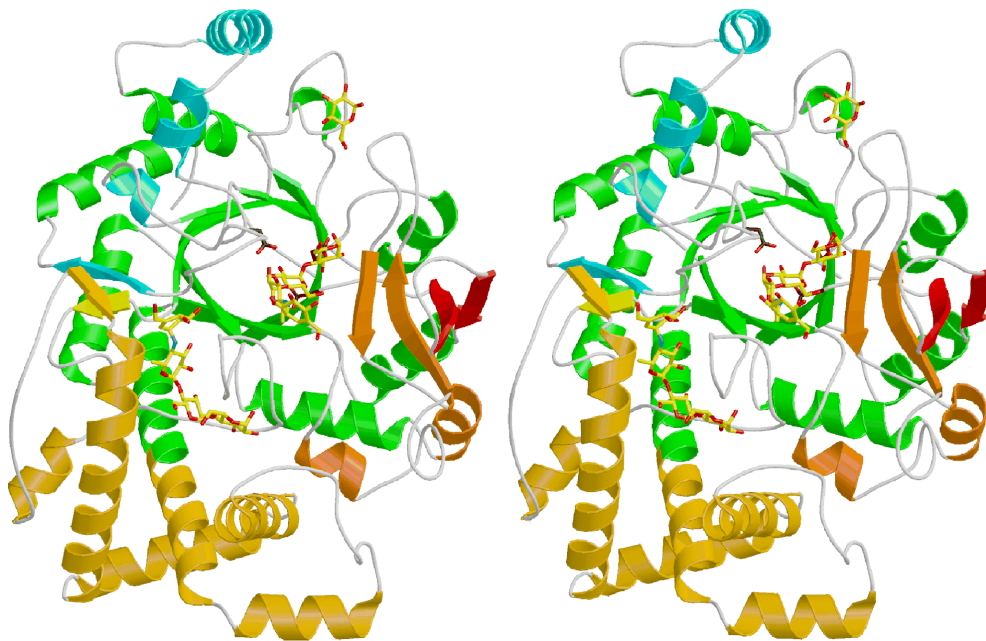


Abbildung 22: Die Faltung der Amylomaltase im Komplex mit Acarbose (Stereobild). α -Helices sind mit gedrehten Bändern, β -Stränge mit platten Pfeilen gekennzeichnet. Das Enzym ist analog zu Abbildung 19 koloriert. Die katalytisch aktiven Seitenketten (Asp-293, Glu-340, Asp-395) sind ebenfalls dargestellt. Kohlenstoffatome des Inhibitors sind gelb, die des Enzyms schwarz eingefärbt. Sauerstoffatome sind rot und Stickstoffatome sind türkis gefärbt.

4.2.2.1 Acarbose gebunden im aktiven Zentrum

Die Restelektronendichte im aktiven Zentrum konnte eindeutig als ein Acarbose-Molekül erkannt werden. Anhand der drei O6-Atome an den Glucoseeinheiten A, C und D konnte auch der Bindungsmodus eindeutig identifiziert werden (Abbildung 23). Die Einheiten B, C und D der Acarbose sind in den Bindungstaschen -3, -2, -1 und +1 gebunden. Die Bindungstaschen wurden nach der Nomenklatur von Davies et al., 1997 numeriert, d. h. die Taschen um die zu brechende Bindung erhalten die Werte +1 und -1 mit positivem Vorzeichen in Richtung des reduzierenden

Endes der Amylosekette. Alle weiter entfernten Substratbindungstaschen werden mit entsprechendem Vorzeichen durchnummeriert (Abbildung 24). Elektronendichte war zwar für alle Hydroxymethylgruppen der Einheiten A, C und D vorhanden, für die Glucoseeinheiten C und D gab die Elektronendichte aber mehrere Konformation für den Torsionswinkel C4-C5-C6-O6 (vgl. Abbildung 2) wider. In Abbildung 23 wird nur die Konformation mit der höchsten Besetzung (> 50 % bzw. > 40 % (geschätzt)) dargestellt und auch nur diese wird im weiteren diskutiert.

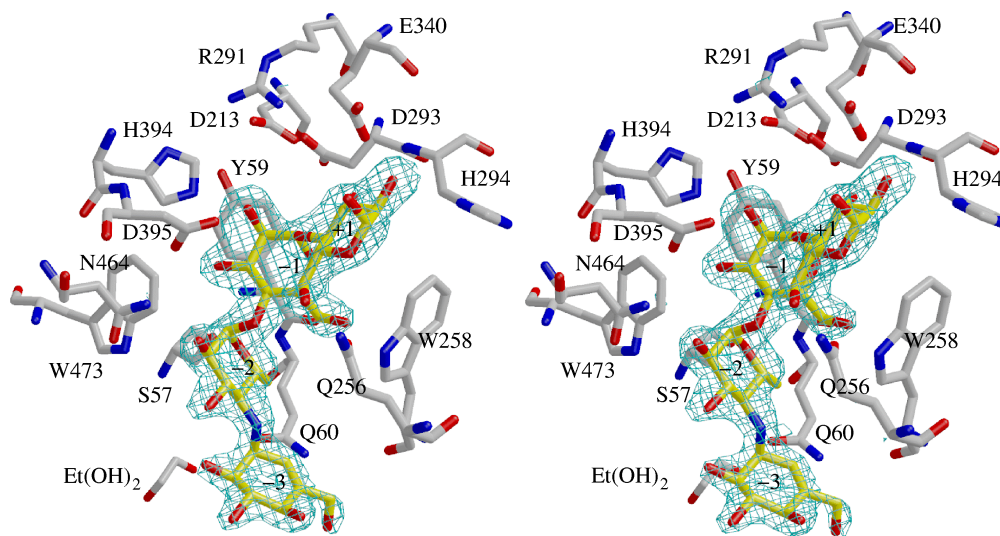


Abbildung 23: $|F_o - F_c|$ omit Elektronendichte der im aktiven Zentrum gebundenen Acarbose (Stereobild). Die Dichte wurde bei $4.0 \sigma_{\text{rms}}$ konturiert. Kohlenstoffatome des Inhibitors sind gelb, die des Enzyms grau eingefärbt. Sauerstoffatome sind in rot und Stickstoffatome sind in blau dargestellt.

Teil A der Acarbose wechselwirkt nur über ein Wassermolekül (Wat-389) mit dem Enzym (Arg-247), weshalb in diesem Bereich eine Bindungstasche -3 zu definieren problematisch ist. Der Einfachheit halber wurde jedoch diese Beschreibung beibehalten. Die Untereinheiten B-D bilden etliche Bindungen zu Wassermolekülen in der aktiven Tasche aus. Die Glucose in der Bindungstasche -2 wird einerseits durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Ser-57 und Asn-464 und andererseits durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Gln-60 und Trp-473 gebunden. His-394 und Asp-395 befinden sich in Wasserstoffbrückenbindungsabstand zur Einheit C der Acarbose, die desweiteren durch hydrophobe Stapelwechselwirkung mit Tyr-59 fixiert wird. Das O5-Sauerstoffatom dieser Hexose ist über eine Wasserstoffbrücke mit einem Ethylenglykol-Molekül verknüpft, welches an das aktive Zentrum gebunden hat. Die Anbindung des Glykols ist aufgrund der hohen Konzentration (30 %) im Tieftemperaturpuffer nicht verwunderlich; ein weiteres Ethandiol hat an der Oberfläche des Enzyms weit entfernt vom aktiven Zentrum gebunden.

zu D (Bindungstasche +1 und -1) so stark verdreht, daß sich keine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen diesen Glucosen ausbilden kann.

Tabelle 7: Torsionswinkel der glykosidischen Bindungen und Abstände der O2-O3'-Sauerstoffatome der im aktiven Zentrum gebundenen Acarbose.

	φ^a (°)	ψ^b (°)	D ^c (Å)
A-B	137.0	-99.5	3.03
B-C	90.4	-171.1	3.66
C-D	55.0	-160	4.63
Maltose ^d	116.1	-118.0	2.77

^aTorsionswinkel O5-C1-O4'-C4'
^bTorsionswinkel C1-O4'-C4'-C5'
^cD, Abstand O2-O3' (engl. distance)
^dKristallstruktur der Maltose (Takusagawa & Jacobson, 1978)

4.2.2.2 Eine zweite Bindungsstelle für Acarbose in der Nähe des aktiven Zentrums

Ein zweites Acarbose-Molekül bindet in einer Furche in der Nähe des aktiven Zentrums. Der Abstand des anomeren Zentrums dieses Moleküls zum O4 des nicht-reduzierenden Endes der Acarbose im aktiven Zentrum beträgt ca. 14 Å.

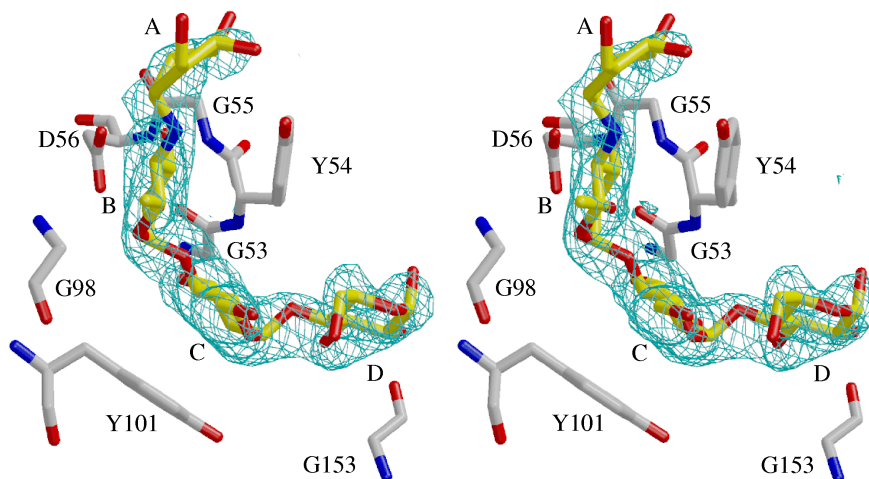


Abbildung 25: $|F_o - F_c|$ omit Elektronendichte der Acarbose gebunden in der zweiten Bindungsstelle (Stereobild). Die Dichte wurde bei $3.5 \sigma_{rms}$ konturiert. Die Kolorierung ist analog zur Abbildung 23: Kohlenstoffatome des Inhibitors sind gelb, die des Enzyms grau gefärbt. Sauerstoff- sind rot und Stickstoffatome blau dargestellt.

Die Sequenz um das zentrale Tyr-54 enthält mehrere Glycine und Proline (48-PLGPTGYGDSP-58); die unterstrichenen Proline sind konserviert. In der Faltung der Amylomaltase formt diese Aminosäureabfolge eine β -Schleife (Haarnadelschleife) an dessen Spitze das Tyr-54 steht. Mittels dieser β -Schleife kehrt die Polypeptidkette abrupt ihre Richtung um, indem die CO-Gruppe der Peptidbindung des Restes Gly-53 (n) mit der peptidischen NH-Gruppe des Restes Asp-56 ($n + 3$) eine Wasserstoffbrücke (2.90 Å) ausbildet.

Die Interpretation der Elektronendichte für das zweite Acarbose-Molekül war ebenso eindeutig wie für das erste Molekül im aktiven Zentrum. Der Bindungsmodus konnte anhand der Hydroxymethylgruppen der Glucoseeinheiten A und B unzweifelhaft bestimmt werden (Abbildung 25). Da die Elektronendichte der Glucose A nur schwach ausgeprägt ist und die exakte Konformation daher nicht bestimmt werden konnte, sind in Abbildung 26 keine Wechselwirkungen für diesen Teil des Inhibitors eingezeichnet. Als mögliche Wechselwirkungen sind O γ von Ser-470 zu O3 und Tyr-54 zu O4 dieser Glucose zu nennen. Der restliche Teil der Acarbose wird, abgesehen von Kontakten mit den Seitenketten von Tyr-54, Asp-56 und Tyr-101, nur über Interaktionen mit Hauptkettenatomen verschiedener Glycine (Gly-53, Gly-55, Gly-98 und Gly-153) gebunden.

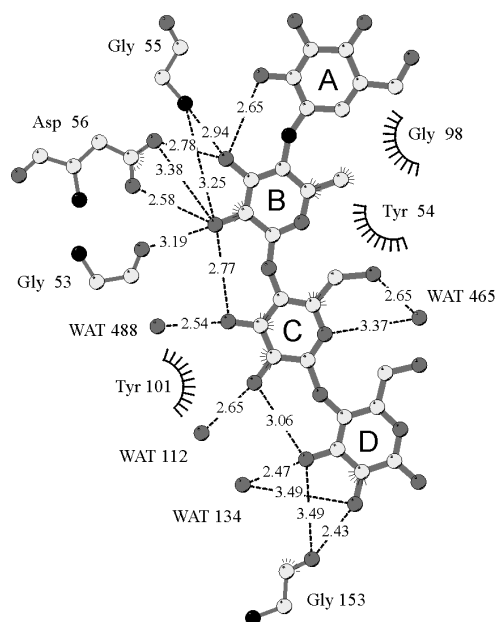


Abbildung 26: Schema der Wechselwirkungen der Acarbose mit der zweiten Bindungsstelle in der Nähe des aktiven Zentrums. Die Graustufen sind analog zu Abbildung 24 gewählt.

Die Glucose B wird durch eine hydrophobe Wechselwirkung des Gly-98 und durch mehrere

Wasserstoffbrückenbindungen der Hauptkettenatome der Glycine in den Positionen 53 und 55 sowie der Seitenkette des Asp-56 gebunden. Eine weitere Wasserstoffbrücke des Hauptketten-sauerstoffs des Gly-153 hilft bei der Fixierung der Hexose in Einheit D. Die Acarbose wechselwirkt hauptsächlich durch die Glucosegruppen B und C mit der Amylomaltase. Die Torsionswinkel ϕ und ψ zwischen diesen beiden Einheiten weichen im Vergleich zu den anderen Torsionswinkeln dieser Acarbose signifikant ab (Tabelle 8), sind aber mit denen für Maltose vergleichbar. Dieses Acarbose-Molekül liegt in einer günstigen Konformation mit niedriger Energie vor, da sich alle O2-O3' Wasserstoffbrücken ausbilden können (Abbildung 26).

Tabelle 8: Torsionswinkel der glykosidischen Bindungen und Abstände der O2-O3' Atome der Acarbose gebunden in der Nähe des aktiven Zentrums.

	ϕ^a (°)	ψ^b (°)	d^c (Å)
A-B	118.9	-131.4	2.65
B-C	130.4	-167.2	2.72
C-D	97.4	-122.4	3.06
Maltose ^d	116.1	-118.0	2.77

^aTorsionswinkel O5-C1-O4'-C4'
^bTorsionswinkel C1-O4'-C4'-C5'
^cD, Abstand O2-O3' (engl. distance)
^dKristallstruktur der Maltose (Takusagawa & Jacobson, 1978)

Die wichtigsten Wechselwirkungen für die Bindung der Pseudomaltotetraose sind die hydrophoben Stapelungen der Untereinheit C mit Tyr-54 und Tyr-101, bei der die Acarbose quasi sandwichartig zwischen den beiden aromatischen Seitenketten fixiert und um das Tyr-54 gewunden wird.

4.2.2.3 Eine dritte Bindungstasche

Nach der kristallographischen Verfeinerung des Enzyms und der beiden Acarbose-Moleküle war noch immer ein größerer nicht interpretierter Teil Elektronendichte in der Nähe der Reste Asp-369, Asp-370 und Asn-374 vorhanden. Allerdings konnte keine der während der Reinigung oder Kristallisation verwendeten Substanzen der Restelektronendichte eindeutig zugeordnet werden. Am ehesten konnte die Dichte noch als eine Glucose gedeutet werden (Abbildung 27); in der kristallographischen Verfeinerung wurde die Restelektronendichte uninterpretiert belassen. Möglicherweise hat hier ein weiteres Acarbose-Molekül gebunden, bei dem die restlichen drei

Glucoseeinheiten nicht fest orientiert, sondern frei beweglich und daher in der Elektronendichte nicht sichtbar sind.

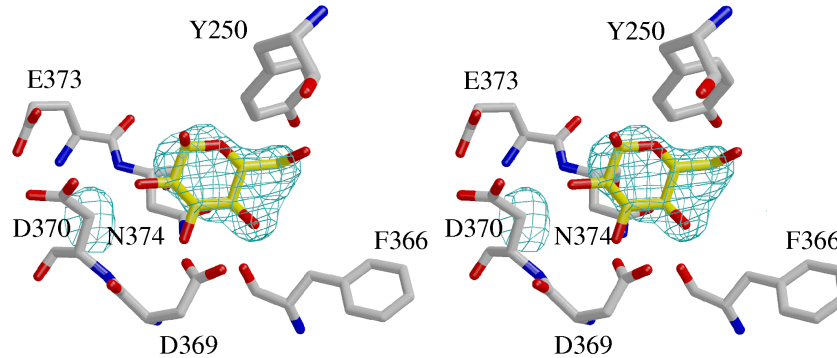


Abbildung 27: $|F_o - F_c|$ Restelektronendichte in der Nähe des aktiven Zentrums (Stereobild). Die Elektronendichte wurde bei $3.0 \sigma_{\text{rms}}$ konturiert. Kohlenstoffatome der Glucose sind gelb, die des Enzyms grau gefärbt. Sauerstoffatome sind in rot und Stickstoffatome sind in blau dargestellt. Die Glucose ist nicht Teil des kristallographisch verfeinerten Modells.

Mögliche Wechselwirkungen einer dort gebundenen Glucosegruppe könnten mit den im Abstand von 2.0-3.5 Å befindlichen Seitenketten Tyr-250, Asp-369, Asp-370 und Asn-374 erfolgen. Benachbarte Bindungstaschen könnten durch Phe-366, Asp-370, Glu-373 und Phe-376 gebildet werden (Abbildung 27). Bis auf Tyr-250 sind alle diese Aminosäuren Teil des (β , α)₈-Fasses (Unterdomäne A).

4.3 Kristallkontakte

Die Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* kristallisiert in der hexagonalen Raumgruppe P6₄. Die asymmetrische Einheit enthält ein Molekül des Enzyms. Wie man anhand Abbildung 28 und Tabelle 9 sehen kann, ist die Umgebung der gebundenen Acarbose-Moleküle und der Glucose (Tyr-54, Tyr-101, 250er-Schleife, 460er-Schleife) nicht an Kristallwechselwirkungen beteiligt.

Die Unterdomänen B1-B3 umgeben nahezu vollständig das (β , α)₈-Faß der Amylomaltase, weshalb sie die meisten intermolekularen Kontakte ausbilden. Ein ausgeprägter Kristallkontakt ist die Wechselwirkung der Helices α 1 (Arg-27, Arg, 30, Arg-34, Glu-38) und α 2 (Arg-75) aus den Unterdomänen A und B2 mit den Helices α 4 (Glu-125, Ala-129, Glu-132) und α 6 (Arg-172, Lys-175) der Unterdomäne B2 des benachbarten Moleküls. Helix α 6 (Arg-172, Ser-176) hat noch eine weitere Wasserstoffbrücke zur Helix α 18 (Arg-491, Glu-485; Unterdomäne A). Die

Unterdomäne B3 ist ebenfalls wesentlich an der Ausbildung von intermolekularen Kristallkontakten beteiligt. $\alpha 15$ (Arg-416, Asp-420, Thr-424, Arg-426, Glu-430) wechselwirkt mit einem Teil des β -Faltblattes ($\beta 9, \beta 10$) der Unterdomäne B1 (Glu-303, Ala-306, Ser-307, Arg-315).

Tabelle 9: Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen.

AS ^a	Atom	AS ^a	Atom	D ^b [Å]	AS ^a	Atom	AS ^a	Atom	D ^b [Å]			
Arg-27	NE	Glu-132	OE1	3.57	Lys-175	NZ	Glu-38	OE1	3.76			
	NH1	Glu-125	OE1	3.68	Ser-176	OG	Glu-485	OE1	3.59			
			OE2	3.06	Arg-239	NH1	Glu-430	OE1	3.02			
NH2	Glu-125	OE2	2.53	OE2			3.05					
Arg-30	NE	Glu-132	O	3.41	NH2	Thr-424	O	3.04				
			Ala-129	N			3.74	Glu-430	OE2	2.79		
			OE2	2.67			Pro-240	O	Arg-426	NH2	2.88	
	OE1	3.38	OE2	Arg-416	NH1	2.63						
	NH2	Glu-132	OE2	3.61	Ala-306	O	Arg-426	NH1	3.68			
OE1	2.78	Ser-307	N	Thr-424				OG1	3.68			
Arg-34	NH1	Glu-132	OE2	2.97	Arg-315	NE	Arg-416	NH1	3.72			
Glu-38	OE1	Arg-172	NE	2.24	NH2	Arg-416	NE	3.46				
			NH2	2.73			NH1	3.76				
Arg-75	OE2	Arg-172	NZ	3.76	Arg-416	NE	Asp-420	OD1	3.19			
			NH2	3.29			Arg-315	NH2	3.46			
			OE1	2.97			NH1	Arg-315	NE	3.72		
Glu-125	OE1	Arg-27	NH1	3.68	NH2	3.76						
Ala-129	OE1	Arg-27	NH1	2.97	Asp-420	OD1	Arg-315	NH2	3.19			
			NH1	2.97				Thr-424	OG1	Ser-307	N	3.68
			NH1	3.06				O	Arg-239	NH2	3.04	
			NH2	2.53								Arg-426
			NH2	3.41				NH2	2.78	NH2	Pro-240	O
NH2	2.78	Glu-430	OE1	Arg-239	NH1	3.02						
Glu-132	OE2	Arg-30	NE	2.67	Glu-485	OE1	Ser-176	OG	3.59			
			NH2	3.61				OE2	Ser-176	OG	2.58	
			NH2	2.94				Arg-491	NE	Arg-172	NH1	3.54
NH1	2.97	NH1	Arg-172	NH1	3.65							
Arg-172	NH1	Arg-491	NE	2.24	Glu-430	OE2	Arg-239	NH2	2.79			
			NH1	3.54				OE1	3.02			
			NH1	3.65				OE2	3.05			
Arg-172	NH2	Glu-38	OE1	2.73	Arg-426	NH1	Arg-239	NH1	3.02			
			OE2	3.29				NH2	2.79			
			OE2	3.29				NH2	2.79			

^aAS, Aminosäure

^bD, Abstand (engl. distance)

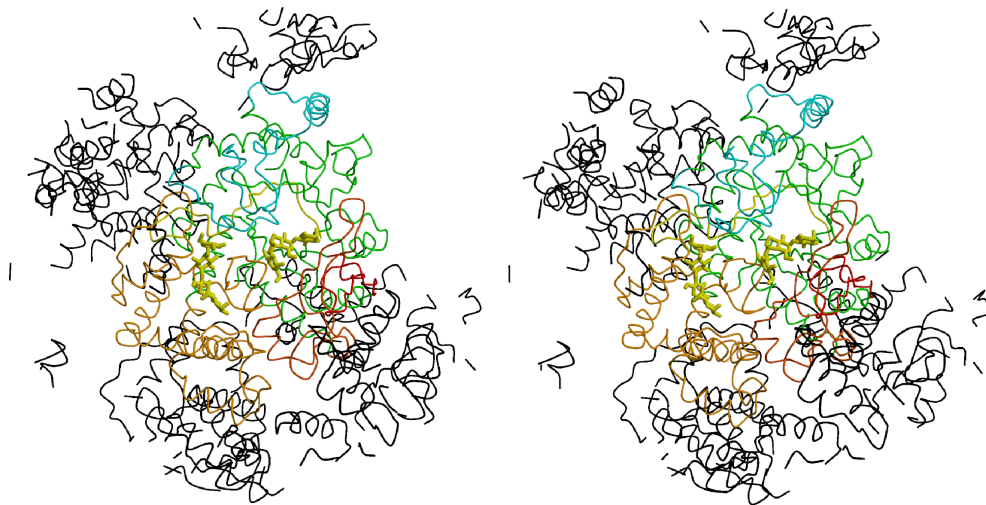


Abbildung 28: Stereobild der Kristallkontakte. Die C_{α} -Atome der zentralen Amylomaltase ist wie in Abbildung 19 eingefärbt, die C_{α} -Atome aller kristallographisch verwandten Amylomaltase-Moleküle sind in schwarz dargestellt. Die beiden an die zentrale Amylomaltase gebundenen Acarbosemoleküle sind in gelb wiedergegeben.

4.4 Thermostabilität und Temperaturfaktoren

Die untersuchte Amylomaltase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und hat ihre höchste Aktivität bei 75-80° C. Bei diesen hohen Temperaturen ist das Enzym über Stunden stabil ohne seine Aktivität zu verlieren (Terada *et al.*, 1999). Enzyme eines nicht thermophilen Organismus denaturieren in der Regel bei 50-60° C. Die Faltung des Proteins wird durch die thermische Bewegung aufgebrochen, hydrophobe Teile werden dem Lösungsmittel (Wasser) zugänglich gemacht. Somit wird die Löslichkeit des Proteins herabgesetzt und es fällt als Niederschlag aus.

Noch sind keine genauen Regeln für die hohe thermische Stabilität von Proteinen gefunden worden. Allgemeine Prinzipien für die thermische Stabilisierung konnten allerdings mittels Vergleich homologer Enzyme aus psychro-, meso-, thermo- und hyperthermophilen Organismen abgeleitet werden (Jaenicke & Böhm, 1997):

1. Erhöhung der Packungsdichte des hydrophoben Proteininneren mittels Verkleinerung der Freiräume zwischen den Proteinresten.
2. Ausbildung von Disulfidbrücken über zwei Cysteinreste.
3. Zunahme der elektrostatischen Wechselwirkung (Salzbrücken und Ionennetzwerk).
4. Verbessertes Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen.

5. Verstärkte Ausbildung von α -Helices und β -Faltblättern.
6. Verkleinerung von Schleifen zwischen den Sekundärstrukturelementen.
7. Stabilisierung der α -Helices mittels α -helikalem Verkappen.
8. Tendenz zur Ausbildung höherer Oligomere.

Die hier beschriebene Struktur der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* ist die erste Strukturbestimmung einer Amylomaltase, weshalb ein Vergleich zu thermisch weniger stabilen Amylomaltasen nicht durchgeführt werden kann. Ganz allgemein kann das Auffalten einer Struktur durch kovalente Verknüpfung zweier Proteinbereiche mit Disulfidbrücken erschwert werden oder durch die Hydrophilie bzw. Hydrophobizität einzelner Aminosäuren.

Hydrophobe Seitenketten befinden sich in aller Regel im Inneren des Enzyms, hydrophile an der Oberfläche. Je hydrophober das Innere eines Proteins ist, desto energetisch ungünstiger ist das Auffalten des Proteins und desto stabiler ist es bei höheren Temperaturen. Bei der $(\beta, \alpha)_8$ -Faßstruktur wird der Kern der Struktur durch das β -Faltblatt gebildet. In Übereinstimmung mit anderen $(\beta, \alpha)_8$ -Faßstrukturen werden auch bei der Amylomaltase die β -Stränge hauptsächlich durch hydrophobe Aminosäuren aufgebaut. Desweiteren treten in der Aminosäuresequenz der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* die starren, hydrophoben, aromatischen Seitenketten sehr viel häufiger auf als durchschnittlich. Tryptophan tritt dreimal (4.2 % *versus* 1.4 %) und Phenylalanin rund zweimal (6.2 % *versus* 3.9 %) häufiger auf als sonst beobachtet (Dawson *et al.*, 1986).

In der Aminosäuresequenz der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* befindet sich lediglich ein Cystein (Cys-308), welches in der Schleife zwischen dem β -Faltblatt aus $\beta 9$ und $\beta 10$ (Unterdomäne B1), an der Enzymoberfläche lokalisiert ist, so daß sich keine intramolekularen Cystin-Brücken ausbilden können.

Anhand der Elektronendichte konnten sowohl für die native als auch für die Inhibitor-gebundene Amylomaltasestruktur alle 500 Aminosäuren modelliert werden. Selbst bei hochaufgelösten Strukturen ist es nicht ungewöhnlich, daß bestimmte Bereiche im Enzym keine feste Konformation haben, sondern auch noch im Kristall flexibel sind. In solchen Bereichen steigen die atomaren Temperaturfaktoren für Hauptkettenatome stark an bzw. sind bei einer Konturierung der Elektronendichte bei einem σ_{rms} Wert von 1.0 nicht klar definiert. Leider sind die verfeinerten

B-Werte abhängig von der gewählten Verfeinerungsmethode und dem verwendeten Programm. Außerdem wird der absolute Mittelwert des Temperaturfaktors auch durch die Kristallordnung und die Auflösung der Struktur beeinflusst, so daß eine absolute Klassifizierung über die Höhe der B-Faktoren und damit über die allgemeine Flexibilität der Amylomaltase nicht getroffen werden kann.

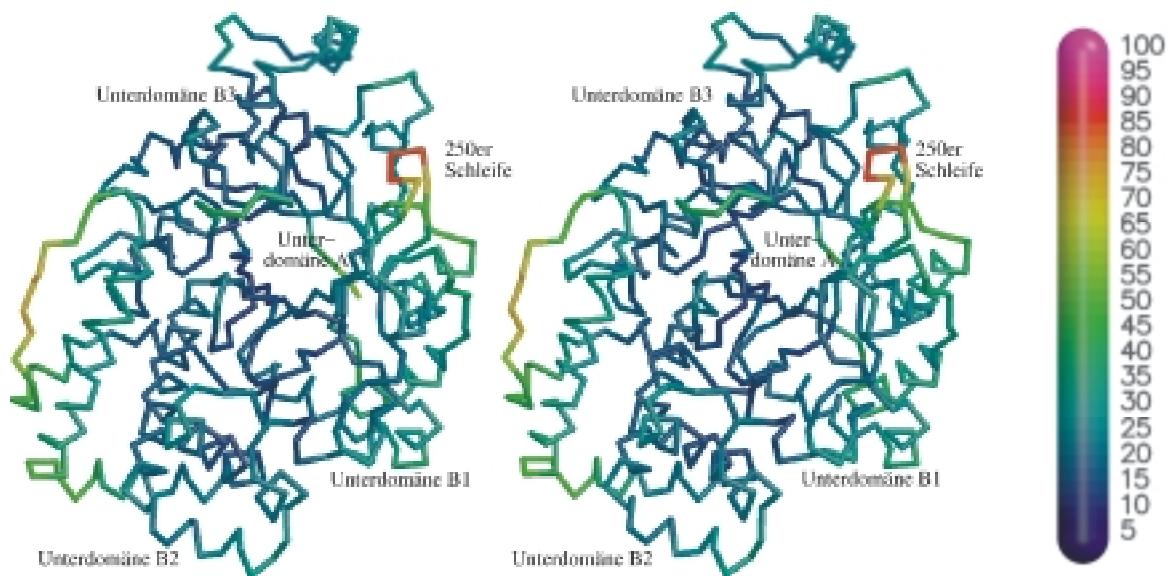


Abbildung 29: Temperaturverlauf der Hauptkettenatome der nativen Amylomaltase-Struktur. Die Hauptkettenatome sind nach ihren B-Faktorwerten gemäß der angegebenen Skala koloriert.

Relativ hohe atomare Temperaturfaktoren werden in den Solvens-exponierten Bereichen der 250er-Schleife und der Verbindung zwischen $\alpha 2$ und $\beta 4$ beobachtet (Abbildung 29), wobei die höchsten Temperaturfaktoren an der Spitze der 250er-Schleife sind und hier ein Bruch in der Elektronendichte für die Hauptkettenatome vorliegt (Abbildung 42). Die Schleife zwischen $\alpha 2$ und $\beta 4$ ist mit 20 Aminosäuren relativ lang. Die Betrachtung der Faltung zeigt aber, daß die Verbindung zwischen den beiden Sekundärstrukturelementen auf die minimale Länge verkürzt ist. Bei einem Sequenzalignment mit anderen Amylomaltasen und eines D-Enzyms ist dieser Sequenzbereich bei allen verglichenen Enzymen länger als bei der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* (Abbildung 32). Für diesen Bereich gilt daher höchstwahrscheinlich Regel 6.

Die 250er-Schleife hat die absolut höchsten B-Faktoren, allerdings nur über eine Länge von

maximal sieben Aminosäuren. Bemerkenswert ist, daß dieser Bereich im Sequenzalignment die höchste Konservierung zeigt, weshalb hier höchstwahrscheinlich die Flexibilität notwendig für die Funktion des Enzyms ist und diese daher zur Erhöhung der Thermostabilität nicht minimiert werden kann.

Die hohe thermische Stabilität des Enzyms aus *Thermus aquaticus* ist wahrscheinlich der Hydrophobizität im Inneren des Fasses und den nur kurzen Bereichen mit hoher Flexibilität zuzuschreiben.