

5 Diskussion und Schlußfolgerungen

5.1 Vergleich der nativen und Inhibitor-gebundenen Struktur

Im Vergleich der nativen zur Acarbose-gebundenen Struktur ist keine signifikante Konformationsänderung zu beobachten (Abbildung 30). Beide Strukturen überlagern mit einer Standardabweichung der C_{α} -Atome von 0.33 Å.

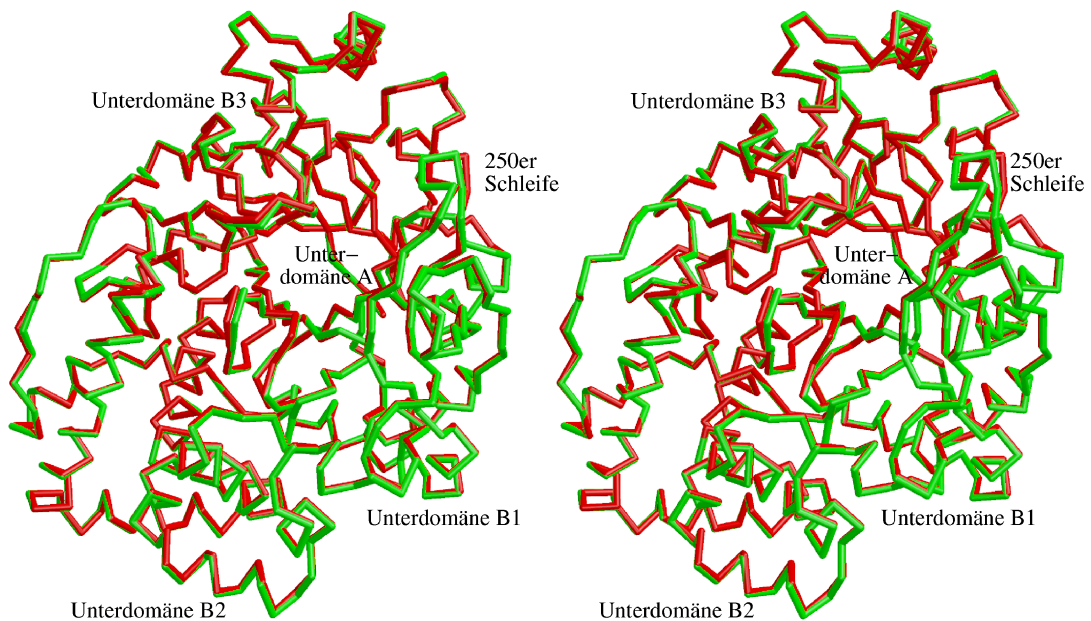


Abbildung 30: Überlagerung der C_{α} -Atome der freien und Acarbose-gebundenen Amylomaltase (Stereobild). In grün ist die freie und in rot die Inhibitor-gebundene Struktur gezeigt.

Beim Vergleich der beiden aktiven Zentren der Amylomaltase-Strukturen fällt auf, daß von den drei katalytisch relevanten Resten (D293, E340, D395) lediglich Asp-293 eine unterschiedliche Konformation in den beiden Strukturen einnimmt. Asp-293 baut in der Acarbose-gebundenen Struktur mit den Aminosäuren Asp-213 und Arg-291, die ebenfalls eine unterschiedliche Konformation aufweisen, ein Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk auf (Abbildung 31).

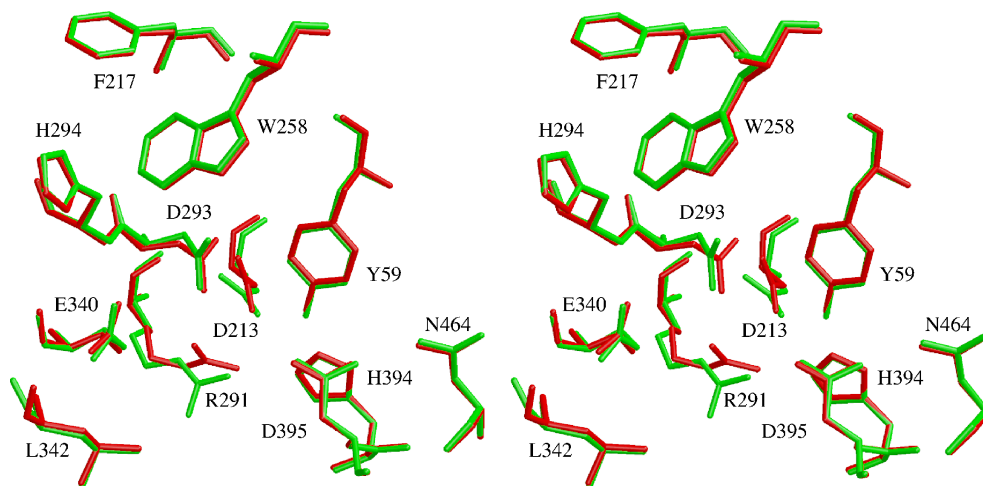


Abbildung 31: Überlagerung der aktiven Zentren der nativen und Acarbose-gebundenen Amylomaltase (Stereobild). Für die Überlagerung wurden bis auf Asp-213, Arg-291 und Asp-293 alle gezeigt Seitenketten verwendet. In grün ist die native und in rot die Inhibitor-gebundene Struktur gezeigt.

5.2 Sequenzalignment verschiedener Amylomaltasen und eines D-Enzyms

In den letzten Jahren wurde das Gen *malQ*, welches die Amylomaltase in Bakterien kodiert, in verschiedenen Organismen gefunden: *Aquifex aeolicus* (Deckert *et al.*, 1998), *Chlamydia pneumoniae* (Kalman *et al.*, 1999), *Chlamydia psittaci* (Hsia *et al.*, 1997), *Chlamydia trachomatis* (Stephens *et al.*, 1998), *Clostridium butyricum* (Goda *et al.*, 1997), *Escherichia coli* (Pugsley & Dubreuil, 1988), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), *Streptococcus pneumoniae* (Lacks *et al.*, 1982), *Synechocystis sp.* (Kaneko *et al.*, 1996), *Thermococcus litoralis* (Jeon *et al.*, 1997), *Thermogota maritima* (Liebl *et al.*, 1992), *Thermotoga neapolitana* (Berezina, *et al.*, 1999). Desweiteren ist noch ein pflanzliches Enzym, das Disproportionierungsenzym (D-Enzym), bekannt, welches der Amylomaltase sehr ähnlich ist und in Kartoffel (Takaha *et al.*, 1993) und Gerste (Yoshio *et al.*, 1986) gefunden wurde.

Um die wichtigen Bereiche der unterschiedlichen Unterdomänen zu charakterisieren, wurde die Sequenz der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* mit verwandten Amylomaltasen und dem D-Enzym aus der Kartoffel verglichen (Abbildung 32). Die für die α -Amylase-Familie

charakteristischen vier konservierten Regionen wurden für alle Enzyme gefunden, wodurch das Alignment bestätigt wird. Die Sequenzhomologien sind in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Sequenzhomologien in Prozent für verschiedene Amylomaltasen und ein D-Enzym aus der Kartoffel. Die Sequenzhomologien sind in Prozent angegeben und beruhen auf dem Alignment von Abbildung 32.

	<i>E. coli</i>	<i>Synechocystis sp.</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. pneumoniae</i>	D-Enzym
<i>T. aquaticus</i>	19	48	42	21	41
<i>E. coli</i>		17	18	20	17
<i>Synechocystis sp.</i>			44	20	41
<i>C. butyricum</i>				21	41
<i>C. pneumoniae</i>					17

Insertionen bzw. Deletionen (Indels) in der Aminosäuresequenz, die innerhalb von Sekundärstrukturelementen liegen, werden weniger toleriert als andere. Daher befinden sich speziell längere Indels im allgemeinen zwischen α -Helices und β -Strängen. Dies zeigt sich auch im Alignment der Amylomaltasen und des D-Enzyms. Lediglich kleinere Indels sind innerhalb der Sekundärstrukturelemente zu finden. Die größeren Variationen befinden sich sämtlich zwischen Faltungselementen ($\alpha 2$ - $\beta 4$, $\alpha 14$ - $\alpha 15$, $\alpha 17$ - $\beta 15$). Interessant ist dabei, daß sich die langen Indels nur innerhalb der Unterdomänen B2 und B3 befinden und keine neuen Einschübe in der Faßstruktur wie z. B. zwischen dem fünften und sechsten Faßstrang ($\beta 11$ und $\beta 12$) bilden. Das Alignment weist zwischen dem dritten und siebten Faßstrang ($\beta 6$ - $\alpha 14$) nur eine geringe Variation in der Sequenzlänge auf. Deshalb kann man annehmen, daß dieser Bereich für den Reaktionsmechanismus eine entscheidende Bedeutung hat, während die übrigen Regionen vielleicht eher für die gebildete minimale Ringgröße bzw. für die Anpassung an die jeweilige Umgebung verantwortlich sind. Auffallend ist die hohe Konservierung zwischen Gly-244 und Pro-260; acht von 17 Aminosäuren (~50 %) sind invariant. In dieser Sequenz befindet sich die 250er-Schleife, die oberhalb des aktiven Zentrums liegt und aufgrund der ungewöhnlich hohen Konservierung ein essentielles Element der Amylomaltasen sein muß.

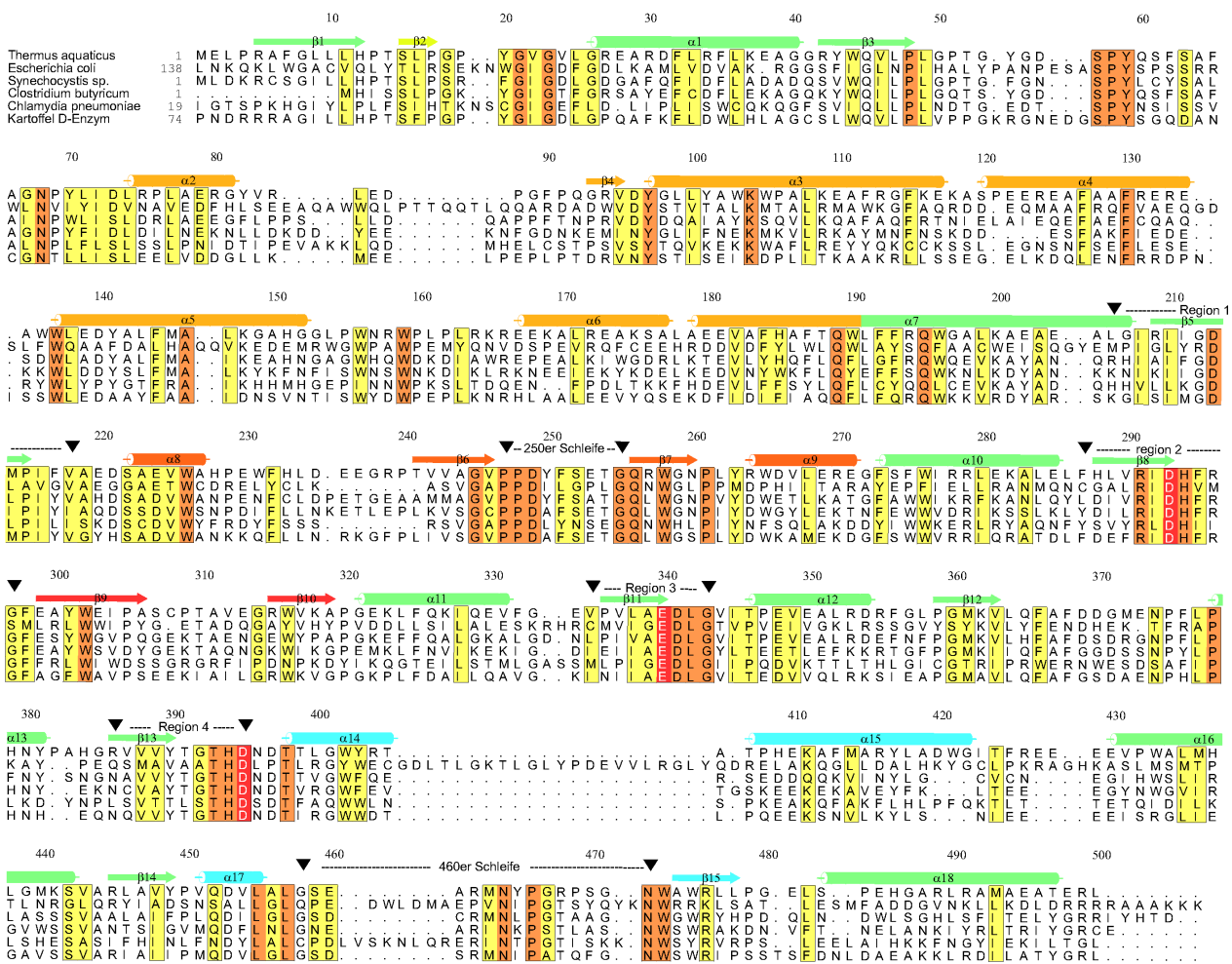


Abbildung 32: Sequenzalignment (Programm CLUSTAL W 1.74 (Thompson *et al.*, 1994) für verschiedene Amylomaltasen und ein D-Enzym aus der Kartoffel. Die Numerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*. Die Sekundärstrukturelemente der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* sind eingezeichnet und wie in Abbildung 19 entsprechend der Unterdomänen eingefärbt. Homologe Reste sind gelb, konservierte orange und die katalytisch aktiven Aminosäuren sind rot koloriert. Die vier konservierten Regionen der Familie-13-Enzyme sowie die 250er und 460er-Schleifen sind mit schwarzen Dreiecken gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm ALSCRIPT (Barton, 1993) erzeugt.

5.3 Vergleich der Struktur der Amylomaltase mit verwandten Strukturen aus der α -Amylase-Familie

5.3.1 Vergleich mit Strukturen in der Protein-Daten-Bank

Die Struktur der Amylomaltase wurde mit dem Algorithmus des Dali-Servers (Holm & Sander,

1993) mit Strukturen in der Protein-Datenbank verglichen. Die ersten neun der Amylomaltase-ähnlichen Enzyme haben einen Z-Wert* > 13.5. Es handelt sich dabei ausnahmslos um Vertreter der α -Amylase-Familie (Tabelle 11). Die darauffolgenden Enzyme β -Glucuronidase und Tryptophan-Synthase gehören einer anderen Proteinfamilie an und haben daher auch eine signifikant kleinere Homologie (Z-Wert < 10). Die noch immer relativ hohe strukturelle Ähnlichkeit ist auf das (β , α)₈-Fäß zurückzuführen, das in allen Strukturen vorkommt.

Tabelle 11: Strukturell verwandte Enzyme zur Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*.

Enzyme ^a	Organismus	AS ^b	alignbare AS ^b	Rmsd ^c	Sequenz- identität [%]	Z-Wert ^d
α -Amylase II (1bvz)	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> R-47	585	298	2.9	13	20.6
Taka- α -Amylase (7taa)	<i>Aspergillus oryzae</i>	476	288	3.4	10	19.5
Isoamylase (1bf2)	<i>Pseudomonas amyloclavata</i>	750	319	3.4	11	17.1
oligo-1,6-Glucosidase (1uok)	<i>Bacillus cereus</i>	558	315	3.2	12	16.3
Maltotetrahydrolase (1jdc)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	418	268	3.4	11	16.0
CGTase (1cxl)	<i>Bacillus circulans</i>	686	283	3.4	10	15.8
α -Amylase (1bli)	<i>Bacillus licheniformis</i>	481	273	3.4	12	15.7
α -Amylase (1bag)	<i>Bacillus subtilis</i>	425	275	3.2	17	14.8
α -Amylase (1smd)	homo sapiens	496	276	3.5	12	13.5

^aIn Klammern ist der PDB-Code für die Struktur angegeben.

^bAminosäuren; Länge der Polypeptid-Kette

^cStandardabweichung der C α -Atome der überlagerten Aminosäuren.

^dHomologiewert. Die Höhe des Z-Wertes gibt die strukturelle Ähnlichkeit in Standardabweichungen über dem Erwartungswert an (Holm & Sander, 1993).

Innerhalb der α -Amylase-Familie sind α -Amylase II aus *Thermoactinomyces vulgaris* und Taka- α -Amylase die ähnlichsten Enzyme, gefolgt von Isoamylase, oligo-1,6-Glucosidase, α -1,4-

*Die Höhe des Z-Wertes gibt die strukturelle Ähnlichkeit in Standardabweichungen über dem Erwartungswert (Holm & Sander, 1993).

Maltotetrahydrolase und CGTase. Alle Enzyme haben vergleichbare Z-Werte (15.8-20.6), Sequenzidentitäten (10-13 %) und Standardabweichungen (2.9-3.4 Å) für 270-320 superpositionierbare Aminosäuren bei einer Gesamtlänge vom 420-750 Aminosäuren. Die Überlagerungen wurde in allen Fällen anhand der richtigen Zuordnung der Faßstrukturen überprüft.

5.3.2 Strukturelles Alignment ausgewählter Enzyme der Familie-13

Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*, CGTase aus *Bacillus circulans* Stamm 8 (Parsiegla *et al.*, 1998), Maltotetrahydrolase (exo- α -Amylase) aus *Pseudomonas stutzeri* (Yoshioka *et al.*, 1997), α -Amylase aus Schweinemagen (Machius *et al.*, 1996) und Taka- α -amylase aus *Aspergillus oryzae* (Brzozowski & Davies 1997) gehören alle der Familie-13 an und prozessieren α -1,4-Glucane unter Retention der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom C1.

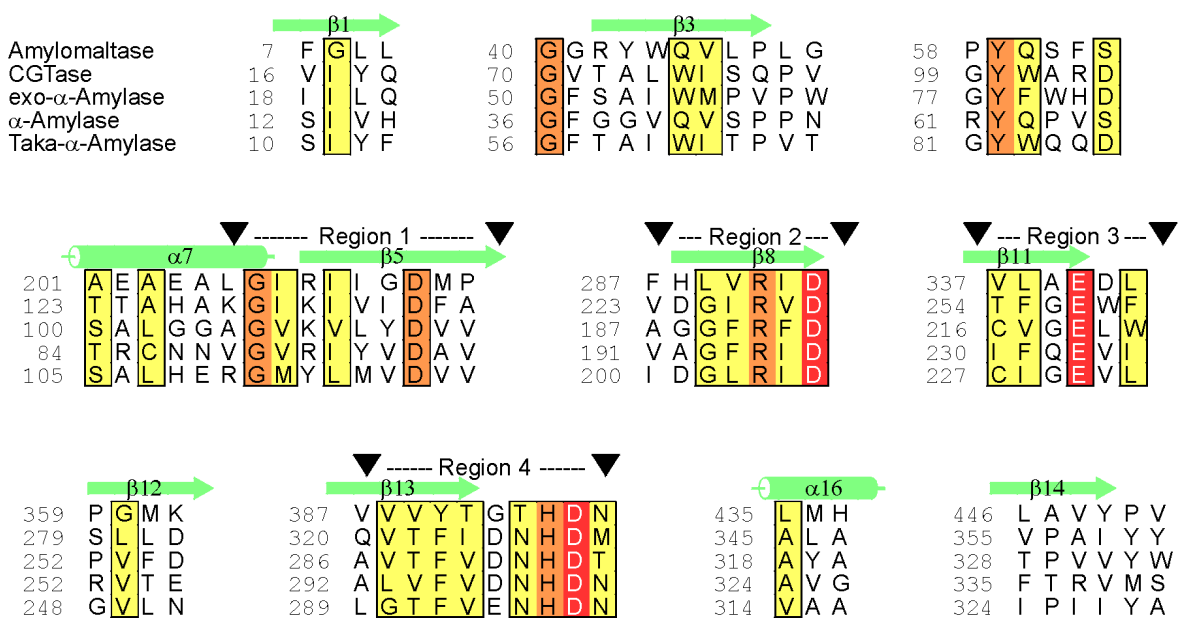


Abbildung 33: Strukturelles Alignment verschiedener Enzyme der α -Amylase-Familie (Programm MAPS (Gerstein & Levitt (1996)). Als Kriterium mußten mindestens drei Reste mit einem jeweiligen maximalen Abstand von 3.8 Å in ihrer Lage übereinstimmen. Die Numerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz des jeweils ersten Restes. Die Sekundärstrukturelemente der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* sind eingezeichnet und wie in Abbildung 19 entsprechend der Unterdomanen eingefärbt. Homologe Reste sind gelb, konservierte orange und die katalytisch aktiven Aminosäuren sind rot koloriert. Die vier konservierten Regionen der Familie-13-Enzyme sind mit schwarzen Dreiecken gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm ALSCRIPT (Barton, 1993) erzeugt.

Das strukturelle Alignment dieser verwandten Enzyme zeigt, daß unter den vorgegeben Kriterien lediglich Sekundärstrukturelemente des (β , α)₈-Fasses überlagert werden können (Abbildung 33).

Vom β -Faltblatt sind alle acht β -Stränge erhalten, von den Helices lediglich die zweite und siebente. Zusätzlich ist eine Schleifenformation über sechs Aminosäuren (58-63), die die konservierte Aminosäure Tyr-59 enthält, in allen Strukturen zu beobachten. Aus Primärstrukturalignments kennt man bereits vier konservierte Regionen, die die aktiven Aminosäuren (Asp-293, Glu-340 und Asp-395) enthalten. Neben den drei enzymatisch aktiven sind noch sechs weitere Aminosäuren konserviert. Zwei davon sind Glycine (Gly-40 und Gly-207), die vermutlich eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von β -Schleifen spielen. Gly-207 liegt zwischen den Sekundärstrukturelementen $\alpha 7$ und $\beta 5$ und Gly-40 am Anfang des β -Stranges $\beta 3$. Die anderen konservierten Aminosäuren Tyr-59, Asp-213, Arg-291 und His-394 sind alle an dem Aufbau der aktiven Tasche beteiligt. Bei Komplexen mit Maltooligosaccharidderivaten der α -Amylase, CGTase und Maltotetrahydrolase sind diese vier Aminosäuren beim Aufbau der für die Katalyse besonders wichtigen Substratbindungstaschen -1 und $+1$ beteiligt. Vermutlich sind diese sieben Aminosäuren die minimale Ausstattung für ein Reaktionszentrum, das eine α -1,4-Glycosyltransferreaktion unter Retention des anomeren Kohlenstoffs C1 ermöglicht.

5.3.3 Vergleich der Amylomaltase mit einer CGTase und α -Amylase

Um die Charakteristika der Struktur der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* zu bestimmen und so Rückschlüsse auf wichtige Faktoren für die Produktspezifität zu erhalten, wurde das Enzym mit verwandten, ebenfalls aus der α -Amylase-Familie stammenden Enzymen verglichen.

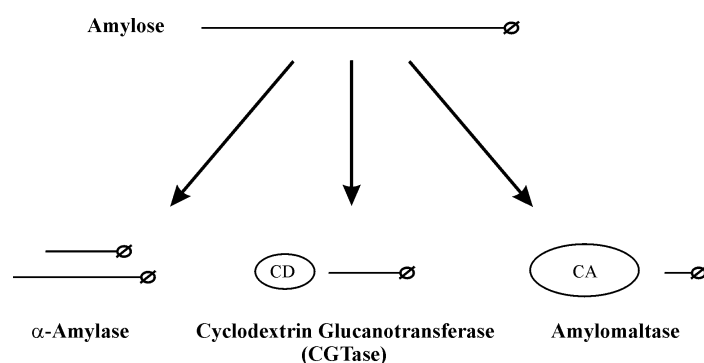


Abbildung 34: Produktspezifität der α -Amylase, CGTase und Amylomaltase. Linien oder ovale Kreise entsprechen einer α -1,4-verknüpften Glucosekette. Die Länge einer Linie entspricht der Größe der Ketten bzw. Ringe. Ø gibt das reduzierende Ende der Kette wider.

Die Amylomaltase wurde zum einen mit einer α -Amylase, einem Enzym welches Amylose nur hydrolytisch spalten kann, und zum anderen mit einer Cyclodextrin-Glucanotransferase (CGTase), einem Enzym, welches wie die Amylomaltase ebenfalls Amylose zyklisieren kann, verglichen. Wobei CGTasen lediglich am Anfang der Reaktion größere Ringe synthetisieren, die im weiteren Verlauf weiter verkleinert werden (Terada *et al.*, 1997), bis nur noch Ringe mit einer Größe zwischen sechs und acht Glucosen vorliegen (Abbildung 34).

5.3.3.1 Vergleich der aktiven Zentren

Die katalytisch aktiven Seitenketten. Die Überlagerung der aktiven Zentren der α -Amylase, CGTase und Amylomaltase zeigt einige wichtige Unterschiede im Aufbau der Substratbindungs-tasche auf (Abbildung 35). Die drei katalytischen Seitenketten Asp-293, Glu-340 und Asp-395 sind sowohl in der Elektronendichte der freien als auch der Inhibitor-gebundenen Struktur klar definiert.

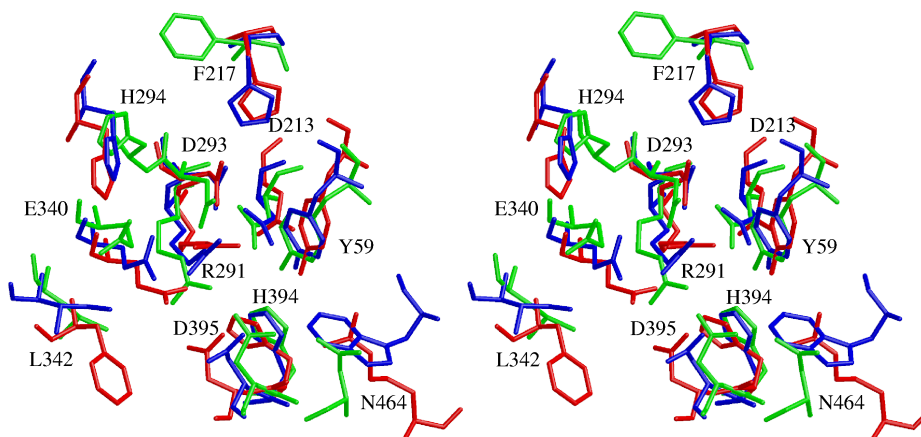


Abbildung 35: Überlagerung der aktiven Zentren der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*, einer CGTase aus *Bacillus circulans* Stamm 8 (Schmidt *et al.*, 1998) und einer α -Amylase aus Schweinemagen (Machius *et al.*, 1996). Die drei nativen Strukturen wurden anhand ihres $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses überlagert. Die α -Amylase ist blau, die CGTase rot und die Amylomaltase grün eingefärbt. Die Beschriftungen beziehen sich auf die Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*.

Die unterschiedlichen Konformationen dieser Seitenketten in der Amylomaltase im Vergleich zu den Strukturen der CGTase und α -Amylase sind möglicherweise auf den hohen pH Wert (9.0) der Kristallisation zurückzuführen. In der Literatur wurde der Reaktionsmechnismus einer CGTase unter Bildung eines kovalenten Intermediates beschrieben (Abbildung 3) (Uitdehaag *et al.*, 1999). Dabei protoniert Glu-340 das glycosidische Sauerstoffatom der zu brechenden

Bindung und bildet einen planaren oxo-Carbenium-ähnlichen Übergangszustand aus. Als Nukleophil greift die Carboxylatseitenkette des Asp-293 das C1-Atom der Glucose in der Bindungstasche –1 an und bildet das kovalente Intermediat. Die dritte aktive Aminosäure unterstützt bei der Bildung des Michaelis Komplexes die Verdrillung der Glucose in der Bindungstasche -1 hin zum Übergangszustand, wodurch die Aktivierungsenergie des ersten Schrittes der Reaktion herabgesetzt wird.

Die in der Familie-13 konservierten Aminosäuren. Die Aminosäuren Tyr-59, Asp-213, Arg-291 und His-394 sind in all diesen Enzymen konserviert und üben ähnliche Funktionen aus. Die Glucose in der Bindungstasche –1 wird einerseits durch Tyr-59 mittels einer hydrophoben Stapelung mit dem Hexosering und andererseits durch His-394 und Arg-291 mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit O2 orientiert. Asp-213 ist Teil eines flexiblen Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes, welches während der Katalyse unterschiedliche Wechselwirkungen mit den jeweiligen Reaktionsstufen eingeht (Uitdehaag et al., 1999). In einigen α -Amylase- und CGTase-Strukturen ist Asp-213 an ein Calciumion gebunden. Weder in der nativen noch in der Inhibitor-gebundenen Struktur der Amylomaltase konnte ein gebundenes Metallatom gefunden werden. Allerdings wurde weder die Reinigung noch die Kristallisation mit bivalenten Ionen durchgeführt, so daß es fraglich bleibt, ob Metallionen nicht vielleicht während der Präparation des Proteins bzw. der Kristalle ausgewaschen wurden. Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen sprechen jedoch gegen eine Abhängigkeit der Aktivität der Amylomaltase von divalenten Metallionen (Takaha *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Asp-213 liegt innerhalb der konservierten Region 1 (Abbildung 33). In der Literatur wurde dieser Teil aufgrund geringer Homologie falsch zugeordnet (Janeček, 1997; Takaha & Smith, 1999). Ob auch Tyr-59 bei anderen Mitgliedern der Familie-13-Enzyme strikt konserviert ist, läßt sich aufgrund der sehr geringen Homologie in diesem Bereich nicht klar sagen. Da in dem strukturellen Alignment aber sogar ein Teil der Schleifenstruktur konserviert ist (Abbildung 33), kann man davon ausgehen, daß die korrekte Orientierung des Tyr-59 eine wesentliche Rolle für die Aktivität spielt und es daher auch in anderen Enzymen der Familie-13 konserviert sein sollte.

Die bei den Amylomaltasen und D-Enzymen konservierten Aminosäuren. Ein Primärsequenzalignment verschiedener in der Literatur beschriebener Amylomaltasen und eines pflanzlichen D-Enzyms zeigt, daß neben den sieben bereits beschriebenen Aminosäuren noch vier weitere

Aminosäuren (Trp-258, His-294, Leu-342 und Asn-464), die zum Aufbau des aktiven Zentrums beitragen, konserviert sind (Abbildung 32).

Für Trp-258 zeigt sich beim Vergleich der aktiven Zentren keine entsprechende Aminosäure in den anderen Proteinen. In der Acarbose-gebundenen Struktur wechselwirkt die Seitenkette des Trp-258 mit der Glucose in der Bindungstasche +1 (Abbildung 23). Möglicherweise übernimmt diese große aromatische hydrophobe Seitenkette eine ähnliche Rolle wie das Tyr-195 in CGTase. In der β -CD-gebundenen Struktur der CGTase wickelt sich das Stärkemolekül um diese Seitenkette (Abbildung 40). Aus biochemischen und kristallographischen Studien ist bekannt, daß diese Seitenkette die Ringbildung und Ringgröße beeinflusst (Nakamura et al., 1994; Sin et al., 1994; Penninga et al., 1995). Die aromatischen Reste Tyr-258 der Amylomaltase und Tyr-195 der CGTase gehören beide zu der Insertion zwischen dem dritten und vierten Faßstrang. Die Seitenketten zeigen zwar in verschiedene Richtungen, die C_{α} -Atome liegen aber relativ dicht beieinander (1.13 Å). Die Hauptketten vor und nach diesen Resten verlaufen allerdings in völlig andere Richtungen, weshalb diese Region nicht im strukturellen Alignment erscheint.

Die Seitenkette des His-294 bildet in der Acarbose-gebundenen Struktur zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der Glucose in der Bindungstasche +1 aus. Dieses Histidin ist innerhalb der Amylomaltasen und dem pflanzlichen D-Enzym hochkonserviert (Abbildung 33). Bei den anderen Vertretern der α -Amylase-Familie ist dieser Rest jedoch in keinem Fall konserviert. Aber in den Komplexen der CGTasen und α -Amylasen mit Maltooligosacchariden bildet ein anderer Histinrest (His-233 bei der CGTase aus *Bacillus circulans*) analog zum His-294 Wasserstoffbrückenbindungen zu der gleichen Glucose aus. Die Überlagerung der aktiven Zentren zeigt (Abbildung 35), daß die Histidinseitenkette identische Wasserstoffbrücken ausbilden kann und daher wahrscheinlich strukturell homolog ist und bei der Katalyse die gleiche Aufgabe übernimmt.

Leu-342 ist in allen Amylomaltasen und dem pflanzlichen D-Enzym konserviert. Es wechselwirkt zwar nicht direkt mit der Acarbose, befindet sich aber in unmittelbarer Nähe zur Bindungsstelle +1. An dieser Stelle befinden sich die ebenfalls hydrophoben Reste Phe-259 in der CGTase und Ile-235 in der α -Amylase. Diese Reste sind vielleicht wichtig für die Reaktionsspezifität (Hydrolyse *versus* Transglycosylierung). Durch eine Erhöhung der Hydrophobizität in

der Angriffstrajektorie für ein Wassermolekül kann die Reaktionsspezifität einer α -Amylase von Hydrolyse in Richtung Transglycosylierung verschoben werden (Matsui et al., 1991; Nakamura et al., 1994; Kuriki et al., 1996).

Die strukturellen Gegenstücke für Asn-464 sind Arg-375 in der CGTase und Trp-58 in der α -Amylase. Analog zu Arg-375 (CGTase) bildet Asn-464 eine Wasserstoffbrückenbindung zum O2 der Glucose in der Bindungstasche -2. Bei der Amylase liegt keine direkte Wechselwirkung mit dem Substrat vor.

Phe-217 der Amylomaltase aus Region 1 ist im Gegensatz zum His-140 bei der CGTase bzw. α -Amylase (His-101) innerhalb der Amylomaltasen und dem D-Enzym nicht konserviert. In einem Substratkomplex der CGTase wechselwirkt das Histidin mit dem O6 der Hexose in der Bindungstasche -1. Im Komplex mit einem kovalent gebundenen Inhibitor geht diese Bindung allerdings verloren (Uitdehaag *et al.*, 1999). Das Phenylalanin der Amylomaltase kann aufgrund seiner Seitenkettenkonformation nicht mit dem Substrat wechselwirken. Dieser Teil der Region 1 scheint für die Amylomaltasen und das D-Enzym keine essentielle Rolle zu spielen, da auch das für CGTase und α -Amylase konservierte His-149 (CGTase) deletiert ist.

Die Überlagerung der aktiven Zentren zeigt, daß innerhalb der bekannten Strukturen der analog zur Amylomaltase reagierenden Enzyme neben den drei katalytisch aktiven Aminosäuren noch vier weitere konserviert sind. Diese sieben Aminosäuren bilden wahrscheinlich das minimal nötige aktive Zentrum, um die Reaktionen mit α -1,4-verknüpfter Amylose unter Retention der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom zu katalysieren. Aus den Unterschieden der Enzyme können Rückschlüsse auf die Faktoren erhalten werden, die für das Gleichgewicht zwischen Hydrolyse *versus* Transglycosylierung, inter- *versus* intramolekularen Glycosyltransfer und die erhaltene Ringgröße im Falle der Zyklisierung verantwortlich sind.

5.3.3.2 Topographischer Vergleich

α -Amylase und CGTase. Die höchste Homologie innerhalb der Familie-13-Enzyme (Janeček, 1997) haben die α -Amylasen und CGTasen. Dementsprechend haben beide Enzyme drei sehr ähnliche Domänen A, B und C (Abbildung 36). Domäne A bildet das Grundgerüst, das $(\beta, \alpha)_8$ -Faß. Die Domäne B besteht hauptsächlich aus β -Strängen, die zwischen dem dritten und vierten

Faßstrang lokalisiert sind. Beim Vergleich der verschiedenen Domänen B ist ein Alignment oft nicht möglich, da sie sehr stark in ihrer Länge und Sequenz variieren.

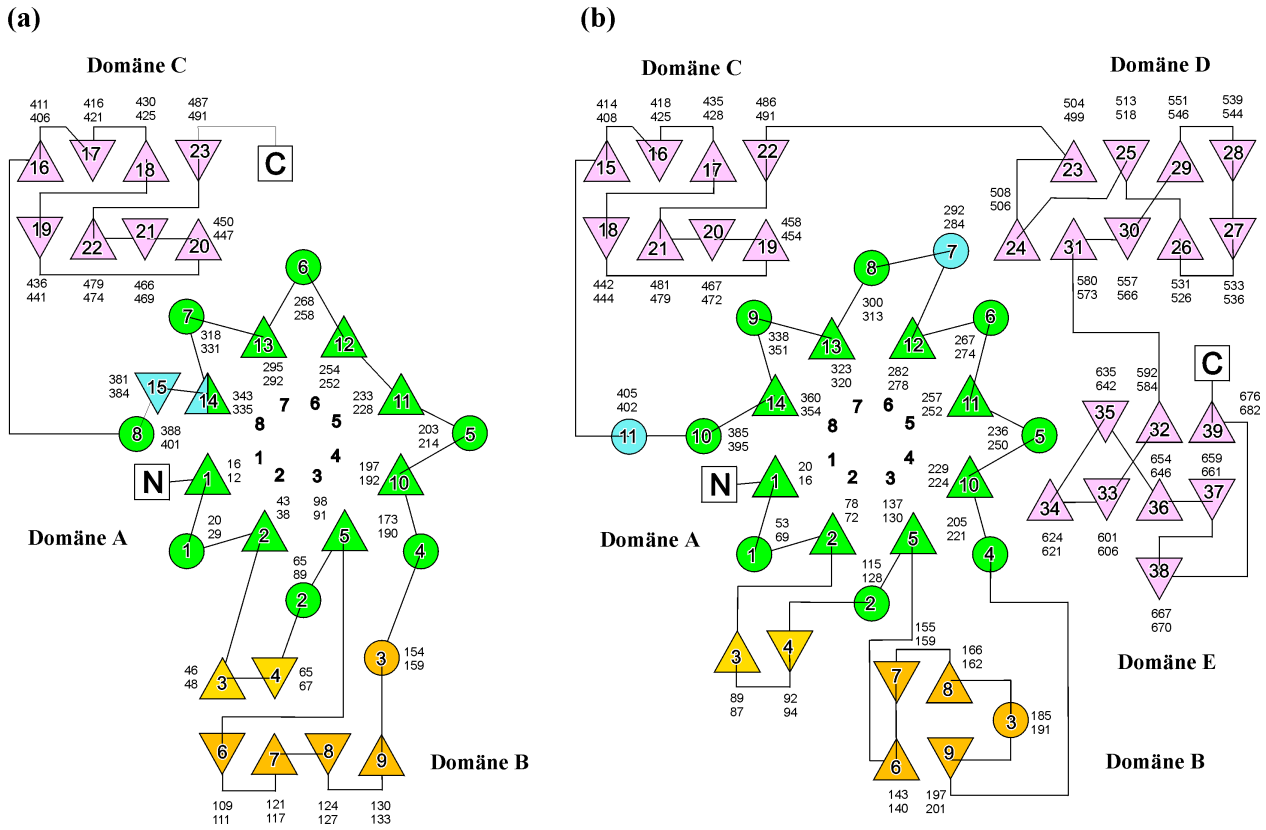


Abbildung 36: Topographie-Diagramm der α-Amylase aus Schweinemagen (a) (Machius *et al.*, 1996) und CGTase aus *Bacillus circulans* Stamm 8 (b) (Klein & Schulz, 1992). Die Farben und Elemente werden wie in Abbildung 19 benutzt. β-Stränge werden mit Dreiecken dargestellt. Dreiecke mit der Spitze nach oben zeigen mit dem N-Terminus in Richtung des Betrachters. α-Helices werden durch Kreise repräsentiert. Die erste und letzte Aminosäure im Sekundärstrukturelement 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 Grundgerüst, das (β, α)₈-Faß, ist grün (Unterdomäne A) und Insertionen zwischen dem ersten und fünften Faßstrang (Domäne B) sind in einem Gradienten von gelb nach rot eingefärbt. Alle weiteren Insertionen mit Sekundärstrukturelementen sind türkis, C-terminale Domänen sind lila unterlegt.

Ebenso wie die Domäne B ist auch die Domäne C essentiell für die katalytische Wirkung des Enzyms (Holm *et al.*, 1990, Vihinen *et al.*, 1994). Sie besteht aus zwei zusammengelagerten antiparallelen β-Faltblättern. In CGTasen gibt es noch zwei weitere C-terminale Domänen (Domäne D und E), die ebenfalls aus antiparallelen β-Faltblättern aufgebaut sind. Die Funktion dieser Domänen ist noch nicht geklärt (Jespersen *et al.*, 1991). Domäne D soll für die Bindung von Kohlenhydraten wichtig sein und Domäne E für den Abbau von Stärke-Granulaten (Svensson *et al.*, 1989; Villette *et al.*, 1992). N-terminale Domänen wurden in Isoamylase (Katsuya *et al.*,

1998) und in α -Amylase II aus *T. vulgaris* (Kamitori *et al.*, 1999) gefunden. Beide Domänen bestehen aus einem antiparallelen β -Faltblatt, sind jedoch völlig unterschiedlich aufgebaut.

Insgesamt sind sich α -Amylase und CGTase in ihrer Topographie sehr ähnlich und repräsentieren sehr gut die Topographie der α -Amylase-Familie. Diese Strukturen lassen sich in drei Domänen unterteilen. Domäne A bildet das Grundgerüst, während die Domänen B und C notwendig für die enzymatische Aktivität sind. Die Domänen B und C sind hauptsächlich aus β -Faltblättern aufgebaut.

CGTase und Amylomaltase. Im Gegensatz zu α -Amylase und CGTase ist die Amylomaltase das wohl am weitesten entfernt verwandte Enzym der α -Amylase-Familie (Janeček, 1997). Bis auf die $(\beta, \alpha)_8$ -Faßstruktur (Domäne bzw. Unterdomäne A) teilt die Amylomaltase mit den anderen Vertretern der α -Amylase-Familie keine Domänen oder Unterdomänen, die sich direkt überlagern ließen (Abbildung 39). Der auffallendste Unterschied ist, daß die Amylomaltase keine C-terminalen Domänen besitzt. Die Amylomaltase ist somit die einzige bekannte Struktur eines Enzyms aus der Familie-13 ohne dieses Motiv (Abbildung 37).

Im Unterschied zu allen anderen Strukturen weist die Amylomaltase deutlich mehr Insertionen innerhalb der Faßstruktur auf (Abbildung 37). Bei den anderen Vertretern ist die einzige größere Insertion zwischen dem dritten und vierten Faßstrang (Domäne B) lokalisiert. In der Amylomaltase spaltet sich die Domäne B in drei Unterdomänen B1, B2 und B3 auf. Der Einschub zwischen dem dritten und vierten Faßstrang in der Amylomaltase bildet den größten Teil der Unterdomäne B1, der sich aber nicht mit anderen Domänen B überlagern läßt (Abbildung 39). Die zweite Insertion (β_9 und β_{10}), die zu der Unterdomäne B1 gehört, wurde bisher in keinem Enzym beobachtet.

Die Unterdomäne B2 ist ebenfalls einzigartig unter den bekannten Strukturen der Familie-13-Enzyme. Zwar sind kleine Insertionen zwischen dem zweiten und dritten Faßstrang bei der α -Amylase aus Schweinemagen (Quian *et al.*, 1993) (~20 Aminosäuren) und der CGTase aus *Bacillus circulans* (Klein & Schulz, 1991) (~30 Aminosäuren) (Abbildung 36) zu beobachten, diese sind aber weitaus kleiner als bei der Amylomaltase (~150 Aminosäuren) und enthalten keine α -Helices (Abbildung 37). Analog zur der Amylomaltase-Struktur wechselwirken diese

Insertionen mit Domäne B bzw. Unterdomäne B1. In einer Superposition mit Isoamylase (Katsuya et al., 1998) überlagert die Unterdomäne B2 nur teilweise mit einer zusätzlichen N-terminalen Domäne (nicht gezeigt).

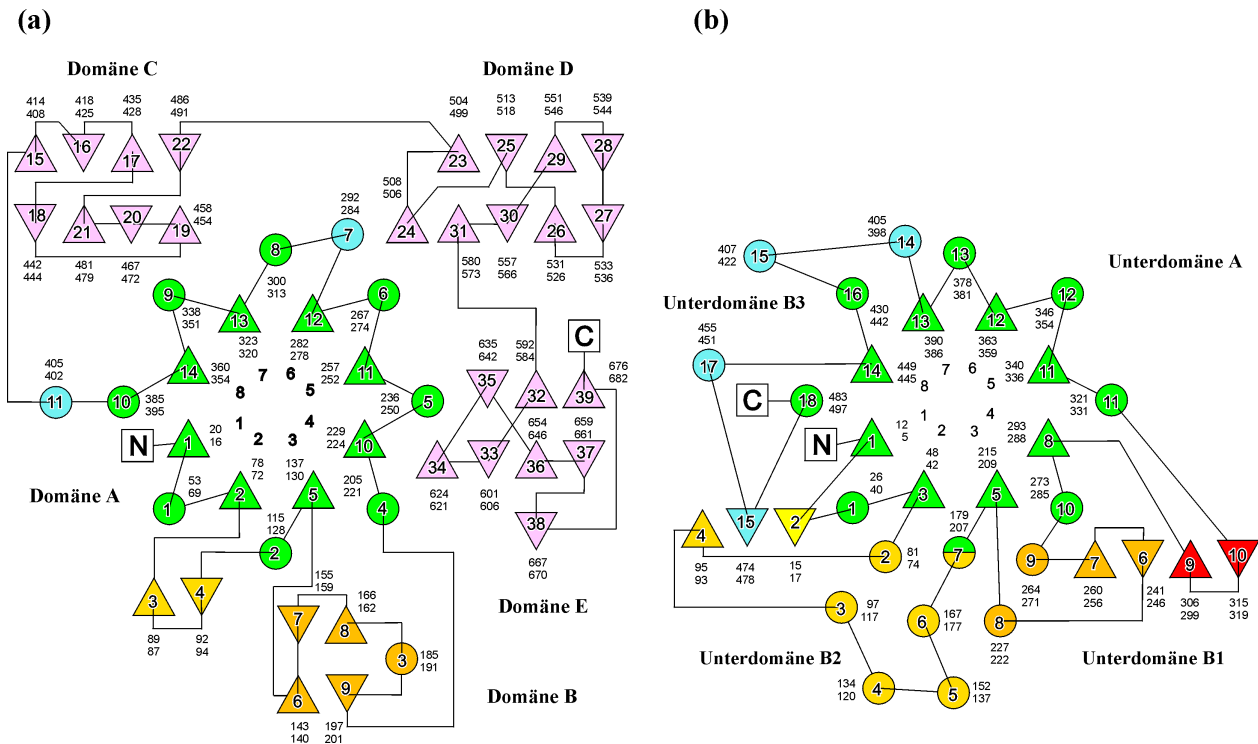


Abbildung 37: Topographie-Diagramm der CGTase aus *Bacillus circulans* Stamm 8 (a) (Klein & Schulz, 1992) und der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* (b). Die Farben und Elemente entsprechen Abbildung 36. Das Grundgerüst, das $(\beta, \alpha)_8$ -Faß ist grün (Unterdomäne A) und Insertionen zwischen dem ersten und fünften Faßstrang (Domäne B bzw. Unterdomänen B2 und B1) sind in einem Gradienten von gelb nach rot eingefärbt. Alle weiteren Insertionen mit Sekundärstrukturelementen sind in türkis (Unterdomäne B3) unterlegt. C-terminale Domänen sind lila eingefärbt.

Die Topographie der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* differiert in vielen Punkten zu allen bekannten Strukturen der α -Amylase-Familie. Die Amylomaltase enthält keine C-terminalen Domänen, die für die CGTasen und α -Amylasen essentiell sind. Die ebenfalls essentielle Domäne B ist stark vergrößert und enthält im Gegensatz zu den anderen Vertretern dieser Enzyme fast nur α -Helices. Die Funktion der Unterdomäne B2 ist folglich einmalig für die Amylomaltase. Desweiteren existieren etliche weitere Insertionen innerhalb der Faßstruktur der Amylomaltase. Die Größe der Enzyme ist nicht signifikant unterschiedlich. Möglicherweise übernehmen die vielen Insertionen in der Faßstruktur der Amylomaltase die Funktion der deletierten, für die anderen Enzyme essentiellen, C-terminalen Domäne C.

5.3.3.3 Überlagerung der Strukturen

α-Amylase und CGTase. Aufgrund der hohen Homologie zwischen α -Amylase und CGTase ist die Tertiärstruktur der drei gemeinsamen Domänen sehr ähnlich (Abbildung 38). Keine der Domänen ist signifikant größer oder anders gefaltet. Die beiden zusätzlichen Domänen D und E der CGTase überlagern mit keiner Region der α -Amylase. Sie erfüllen in der CGTase höchstwahrscheinlich zusätzliche Funktionen (Janeček, 1997).

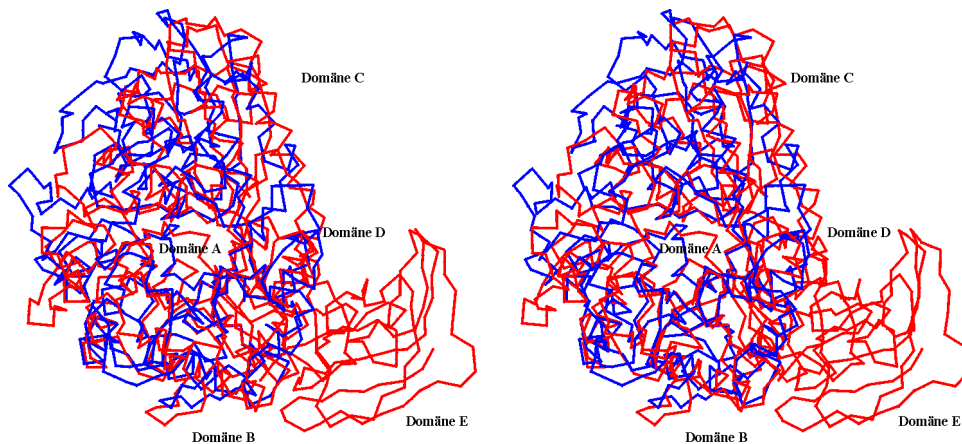


Abbildung 38: Überlagerung der C_{α} -Kette einer α -Amylase aus Schweinemagen mit einer CGTase aus *Bacillus circulans* (Stereobild). Die α -Amylase ist blau, die CGTase rot gefärbt. Die Domänen der CGTase sind angegeben.

CGTase und Amylomaltase. Schon der Topographievergleich zeigte, daß sich die Struktur der Amylomaltase grundlegend von der anderer Enzyme der Familie-13-Enzyme unterscheidet. Die Superposition der Tertiärstruktur einer CGTase und der Amylomaltase unterstreicht dies (Abbildung 39). Obwohl die CGTase und die Amylomaltase sich in der katalysierten Reaktion sehr ähneln (Abbildung 34), überlagern deren Strukturelemente bis auf das $(\beta, \alpha)_8$ -Faß (Unterdomäne bzw. Domäne A) überhaupt nicht. Die Überlagerung bestätigt weiter, daß die Domäne B bzw. Unterdomäne B2, wie aus der Topographie zu erwarten, überhaupt nicht miteinander übereinstimmen. Die Unterdomäne B2 der Amylomaltase ist sehr viel größer als die Domäne B der CGTase.

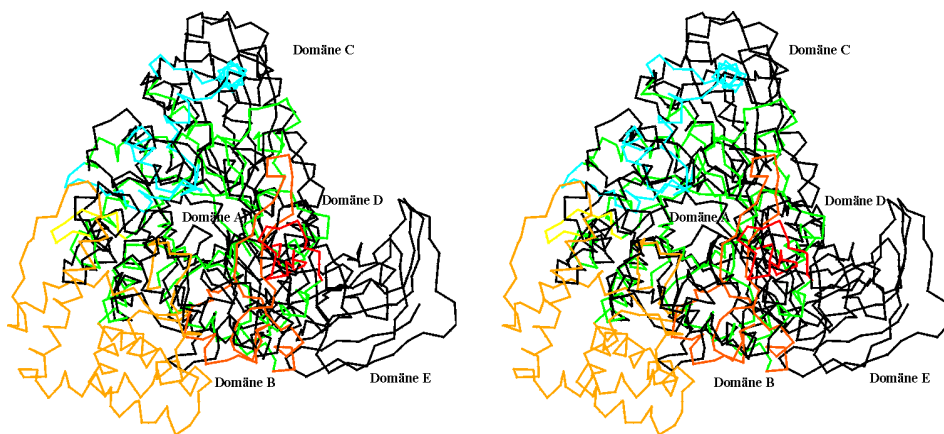


Abbildung 39: Überlagerung der C_{α} -Kette der Amylomaltase mit der CGTase aus *Bacillus circulans* (Stereobild). Die Amylomaltase ist analog zu Abbildung 6 und die CGTase ist schwarz gefärbt. Die Domänen der CGTase sind angegeben.

5.3.3.4 Molekulare Oberfläche und die Bedeutung der 250er-Schleife

Um weitere topographische Unterschiede, die für die Reaktionsspezifität und die minimale Ringgröße verantwortlich sind, herauszuarbeiten, wurde die Oberfläche der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* mit der einer α -Amylase aus Schweinemagen im Komplex mit einem linearen Maltooligosaccharid-Abkömmling (Machius et al., 1996) und mit einer CGTase aus *Bacillus circulans* im Komplex mit einem β -CD-Derivat (Schmidt et al., 1998) verglichen.

α -Amylase und CGTase. Die molekulare Oberfläche der α -Amylase zeigt, daß das aktive Zentrum eine relativ offene Spalte bildet, die von Aminosäuren der Domänen A und B gebildet wird (Abbildung 40 a). Bei der CGTase wird das aktive Zentrum ebenfalls teilweise von Domäne B gebildet. Oberhalb des Reaktionszentrums befindet sich hier allerdings die aromatische Aminosäure Tyr-195 (Abbildung 40b). Bei einem Sequenzalignment mit verschiedenen CGTasen tritt lediglich eine Variation zwischen Phenylalanin und Tyrosin auf (Penninga et al., 1995). Das Tyrosin steht nahezu senkrecht zu der Ebene, die durch den Cyclodextrin-Liganden gebildet wird, und wechselwirkt mit dessen hydrophoben Hohlraum. Mittels Mutationen dieses Restes konnte biochemisch und kristallographisch gezeigt werden, daß die Größe der Seitenkette die gebildete Ringgröße beeinflusst (Nakamura et al., 1994; Penninga et al., 1995). Das Tyrosin bzw. Phenylalanin liegt in Domäne B und ist bei α -Amylasen gegen ein Glycin, Serin oder Valin ersetzt (Penninga et al., 1995).

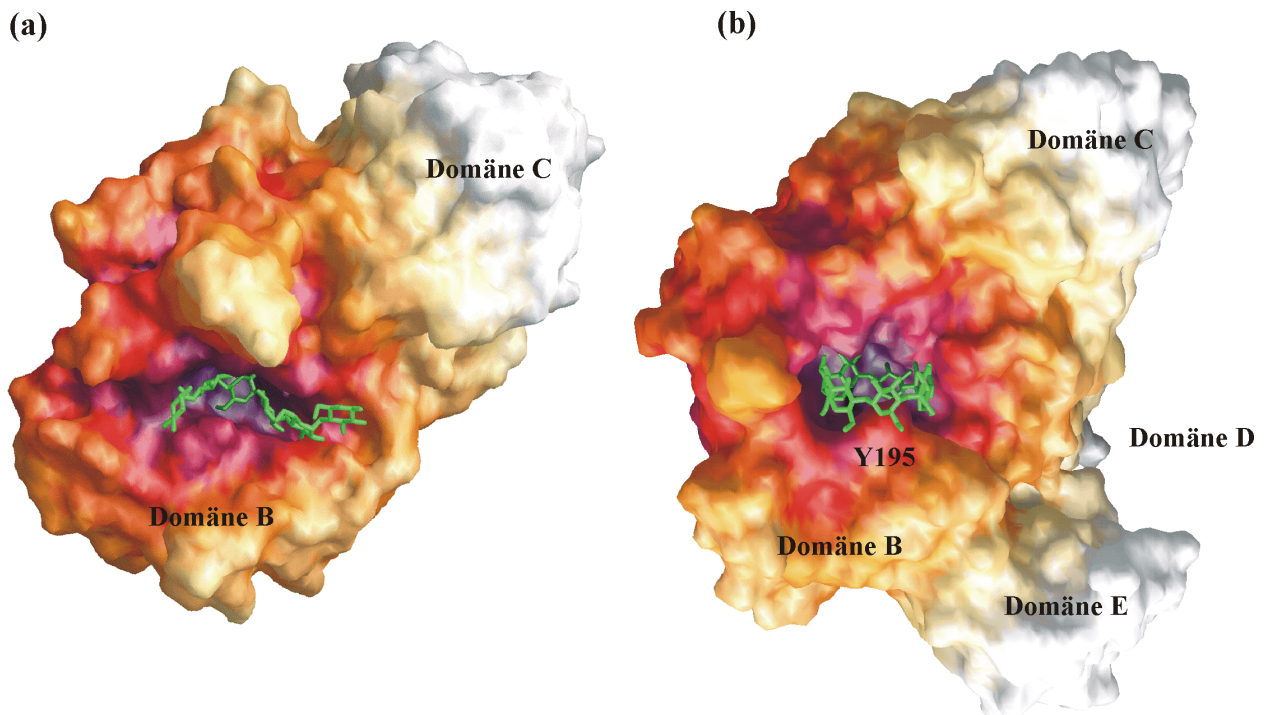


Abbildung 40: Molekulare Oberflächen der (a) α -Amylase Isoenzym II aus Schweinemagen in Komplex mit einer Maltose (Machius *et al.*, 1996) und (b) einer CGTase aus *Bacillus circulans* Stamm 8 im Komplex mit einem β -Cyclodextrin. Die Oberfläche ist nach dem Abstand zum Massezentrum eingefärbt; mit steigender Entfernung verändert sich die Farbe von dunkelrot über orange nach weiß. Die jeweiligen Domänen sind eingezeichnet und die Substrate sind in grün dargestellt.

Amylomaltase. Anhand der molekularen Oberfläche wird deutlich, daß die aktive Tasche bei der Amylomaltase nicht nur durch eine einzelne Aminosäure, sondern durch eine Schleife (250er-Schleife) verdeckt ist (Abbildung 41). Sie wird zwischen dem antiparallelen Faltblatt aus $\beta 6$ und $\beta 7$ der Unterdomäne B1 aus ca. 12 Aminosäuren (247-255) gebildet und ragt über das aktive Zentrum in Richtung der Unterdomäne B3 in den Solvensbereich hinein. Die 180° Wendung der Polypeptidkette wird mittels der typischen Wasserstoffbrückenbindungen einer β -Schleifenkonformation geformt. Dabei bilden die Hauptkettenatome O und N (2.88 \AA) sowie N und O (2.78 \AA) der Aminosäuren Asp-249 und Ser-252 jeweils Wasserstoffbrückenbindungen miteinander aus. An der Spitze der Schleife befinden sich zwei hydrophobe Seitenketten, ein Tyrosin (Tyr-250) und ein Phenylalanin (Phe-251). Die gesamte Schleife hat atomare B-Faktoren zwischen 60 und 70 \AA^2 und sind damit weitaus höher als der Durchschnittswert für das gesamte Enzym (31.9 \AA^2). Die entsprechende Elektronendichte ist daher auch nur schwach ausgeprägt (Abbildung 42). Dies deutet eine Flexibilität in der Konformation der Schleife an. Weder die

Konformation noch die Flexibilität der 250er-Schleife werden durch die Komplexbildung mit Acarbose beeinflusst, da die Acarbose nicht mit dieser Schleife wechselwirkt.

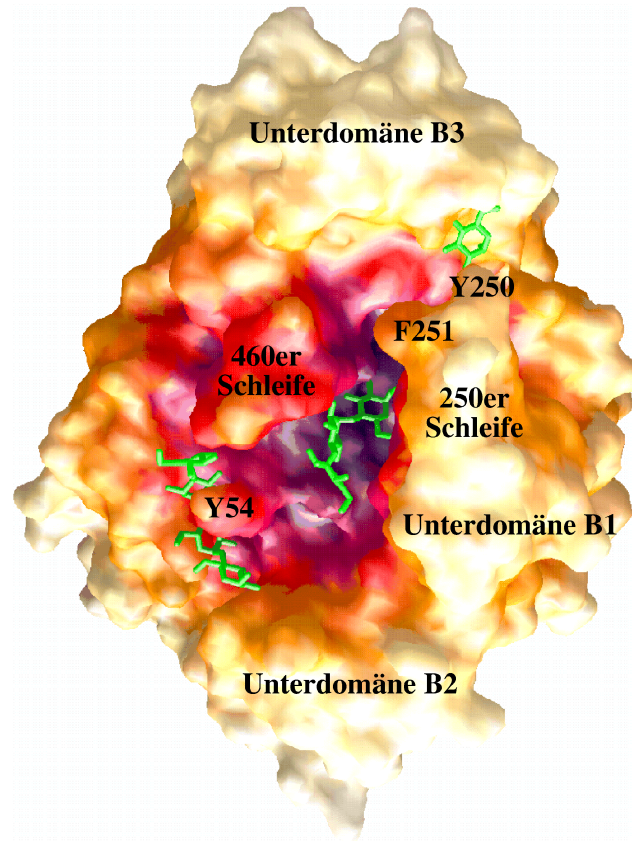


Abbildung 41: Molekulare Oberfläche der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* im Komplex mit Acarbose. Die Oberfläche ist nach dem Abstand zum Massezentrum eingefärbt; mit steigender Entfernung verändert sich die Farbe von dunkelrot über orange nach weiß. Die zwei Acarbose-Inhibitoren und die Glucosebindungsstelle sind in grün dargestellt.

Es wird angenommen, daß sich die Konformation der 250er Schleife erst bei der Anbindung längerer Substrate im Bereich der Bindungstaschen mit positivem Vorzeichen (vgl. Kapitel 4.2.2.1) ändert, so daß die beiden aromatischen Reste an der Spitze der Schleife in Wechselwirkung treten und sich dann ihre Flexibilität verringert. Vermutlich ist ihre Flexibilität für die Bindung des Substrates und die Dissoziation des Produktes entscheidend.

Anhand der Schleife läßt sich erklären, daß kleinere Ringe wie Cyclodextrine allein aus rein sterischen Gründen nicht gebildet werden können. Die Amylosekette müßte sich um die 250er-Schleife winden, wobei der gebildete Ring eine Größe von mindestens 18 Glucoseeinheiten haben würde.

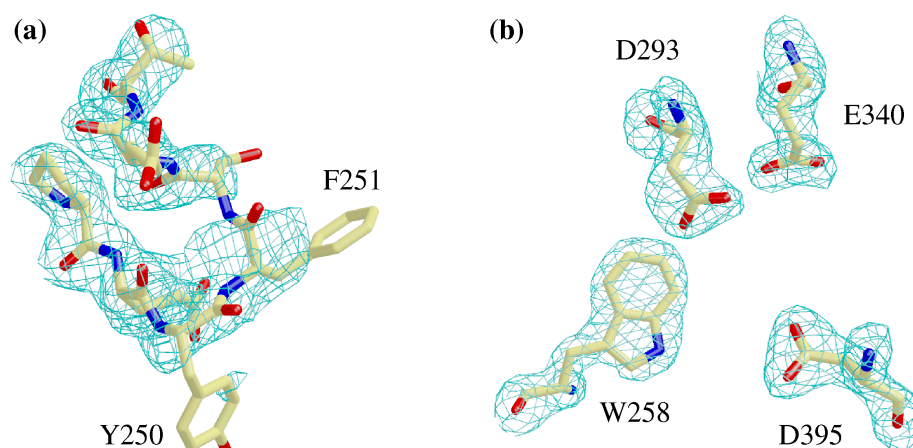


Abbildung 42: Vergleich der Omit-Elektronendichten (a) der 250er-Schleife konturiert bei $4.5 \sigma_{\text{rms}}$ und (b) ausgewählter Seitenketten des aktiven Zentrums konturiert bei $5.5 \sigma_{\text{rms}}$. Trotz der geringeren Konturierung in (a) im Vergleich zu (b) ist die Elektronendichte der Hauptkette unterbrochen sowie die Dichte der Seitenketten Tyr-250 und Phe-251 nicht zu beobachten.

Die 250er-Schleife scheint für die Reaktionsspezifität der Amylomaltase und des D-Enzyms notwendig zu sein, da fast 50 % (8 von 17) der Aminosäuren in diesem Bereich (244-260) konserviert sind (Abbildung 32). Es wird vermutet, daß die konservierten Glycine (Gly-245 und Gly-255) und Proline (Pro-247, Pro-248 und Pro-261) eine entscheidende Rolle für die Form und Lage der Schleife spielen. Bei den Solvens-exponierten aromatischen Aminosäuren Tyr-250 und Phe-251 an der Spitze der Schleife ist interessanterweise nur deren hydrophober Charakter konserviert und möglicherweise für die Funktionalität der Schleife notwendig. Die konservierten Seitenketten Gln-256 und Trp-258 zeigen in Richtung des aktiven Zentrums und nehmen an der Substratbindung teil (Abbildung 24). Asp-249 ist ebenfalls konserviert und könnte bei der Bindung längerer Substrate eine wichtige Funktion haben. Trp-302 der Unterdomäne B1 ist ebenfalls konserviert und mittels hydrophober Stapelwechselwirkung am Aufbau der 250er-Schleife beteiligt.

5.4 Diskussion der Inhibitor-gebundenen Struktur

5.4.1 Bindungsmodus der Acarbose im aktiven Zentrum

Sämtliche Aminosäuren, die mit der Acarbose in Wechselwirkung treten, sind bis auf Gln-60 innerhalb der Amylomaltasen und des D-Enzyms aus der Kartoffel konserviert (Abbildung 24, Abbildung 32). Die Acarbose belegt die Bindungstaschen -3 bis +1 der Amylomaltase. Dies steht

in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jones & Whelan (1969) für das D-Enzym aus der Kartoffel. Hier wurde mittels radioaktiv markierten Maltooligosacchariden gezeigt, daß es für Maltotetraose nur einen Bindungsmodus (-3 bis +1) beim D-Enzym gibt. Bei Acarbose als einem Maltotetraosederivat liegt daher die zu spaltende Bindung zwischen den Einheiten C und D. Bei diesem Bindungsmodus liegt das inhibitorische Motiv der Acarbose zwischen den Taschen -3 und -2, während sich im aktiven Zentrum eine „natürliche“ O-glycosidische Bindung befindet, die das Enzym unter nativen Bedingungen spalten sollte. Die beobachteten Elektronendichten für die beiden Acarbose-Moleküle zeigen aber keinerlei Veränderungen in der molekularen Struktur der Acarbosen auf (vgl. Kapitel 4.2.2). Eine weitere Besonderheit ist, daß die katalytisch aktiven Aminosäuren Asp-293 und Glu-340 in der Inhibitor-gebundenen und teils auch in der freien Form (Glu-340) der Amylomaltase eine Konformation einnehmen, die nicht der in homologen Enzymen beobachteten, katalytisch aktiven Anordnung entspricht.

Die höchste Aktivität des Enzyms liegt bei 75-80 °C bei einem pH von 5.5-6.0 vor, d.h. unter den gewählten Bedingungen (pH 9.0, 4 °C) ist die Aktivität der Amylomaltase drastisch reduziert (Terada *et al.*, 1999). Es ist anzunehmen, daß bei pH 9.0 die katalytisch aktive Aminosäure Glu-340, die in der Katalyse die Funktion eines Protonendonors hat, deprotoniert ist und sich daher ein anderes Wasserstoffbrückenmuster ausbildet, als für den angenommenen Reaktionsmechanismus (Abbildung 3) notwendig ist. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, daß die Carboxylgruppe des Glu-340 in der Acarbose-gebundenen Amylomaltase-Struktur nur Wasserstoffbrücken zu Wasserstoffdonoren ausbildet. O1 wechselwirkt mit dem Hauptkettenstickstoff von His-294 (2.70 Å). O2 wird von den Hauptkettenstickstoffatomen von Asp-341 (3.36 Å) und Leu-342 (2.76 Å) und von einem Wassermolekül (Wat-299; 3.09 Å) gebunden.

Eine weitere Erklärung dafür, daß die Acarbose unter den gegebenen Bedingungen nicht umgesetzt wird, ist, daß der Tieftemperaturpuffer lediglich Acarbose als mögliches Akzeptormolekül für die Reaktion enthält. Acarbose müßte mit seiner Einheit A als Akzeptor fungieren. Allerdings differiert diese Einheit in 3 Punkten zu Glucose (Abbildung 21), so daß sich unter den experimentellen Bedingungen kein natürliches Akzeptormolekül in dem Puffer befindet. Möglicherweise ist eine Änderung im pH und/oder die Anbindung eines natürlichen Akzeptormolekül notwendig für die Ausbildung der katalytischen Konformationen der Seitenketten.

In allen anderen bekannten Strukturen der CGTasen (Strokopytov *et al.*, 1995; Strokopytov *et al.*, 1996; Wind *et al.*, 1997; Mosi *et al.*, 1998) und α -Amylasen (Qian *et al.*, 1994; Gilles *et al.*, 1996; Brzozowski & Davies, 1997; Fujimoto *et al.*, 1998), die nach dem gleichen Mechanismus reagieren und sieben konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum besitzen, wurde bei Komplexen mit Acarbose dieselbe stets prozessiert, so daß in der resultierenden Elektronendichte nie ein natives Acarbose-Molekül vorgefunden wurde. Das inhibitorische Valienamin-Motiv (Abbildung 21) wurde dabei stets zwischen den Bindungstaschen -1 und +1 beobachtet. Die Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* im Komplex mit Acarbose ist somit die erste Struktur eines die α -1,4-Bindung unter Retention der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff umsetzen- den Enzyme, bei der die Acarbose nicht umgesetzt wurde. Allerdings wurde auch nur in den α -Amylase Strukturen von Qian *et al.* (1994) und Brzozowski & Davies (1997) kein weiteres Maltooligosaccharid als Akzeptormolekül hinzugegeben. Die Inkubationsdauer und Temperatur waren stets länger bzw. höher. Möglicherweise würde die Amylomaltase Acarbose unter anderen Bedingungen ebenfalls prozessieren.

5.4.2 Die zweite Bindungsstelle für Acarbose

Amylose nimmt aufgrund intramolekularer Wasserstoffbrücken eine helikale Struktur ein. Bekannt sind A- und B-Amylose, die aus einer doppelsträngigen Helix bestehen, und V-Amylose, die eine einzelsträngige Helix ausbildet. A- und B-Amylose sind sich sehr ähnlich, sie unterscheiden sich nur in ihrem Packungsverhalten und Wasseranteil; die A-Form kommt hauptsächlich in Getreide, die B-Form in Knollen vor. Die Helix der A- und B-Amylose besteht aus zwei parallelen Amyloseketten. Eine Windung wird aus 6 x 2 Glucosen aufgebaut. Die Doppelhelix hat eine Ganghöhe von ca. 20 Å (Sarko & Zugenmaier, 1980). Die einzelsträngige Helix der V-Amylose hat ebenfalls sechs Glucosen pro Windung mit einer Ganghöhe von ca. 8 Å und einem Durchmesser von ~12 Å (Sarko & Zugenmaier, 1980; Geßler *et al.*, 1999) (Abbildung 43).

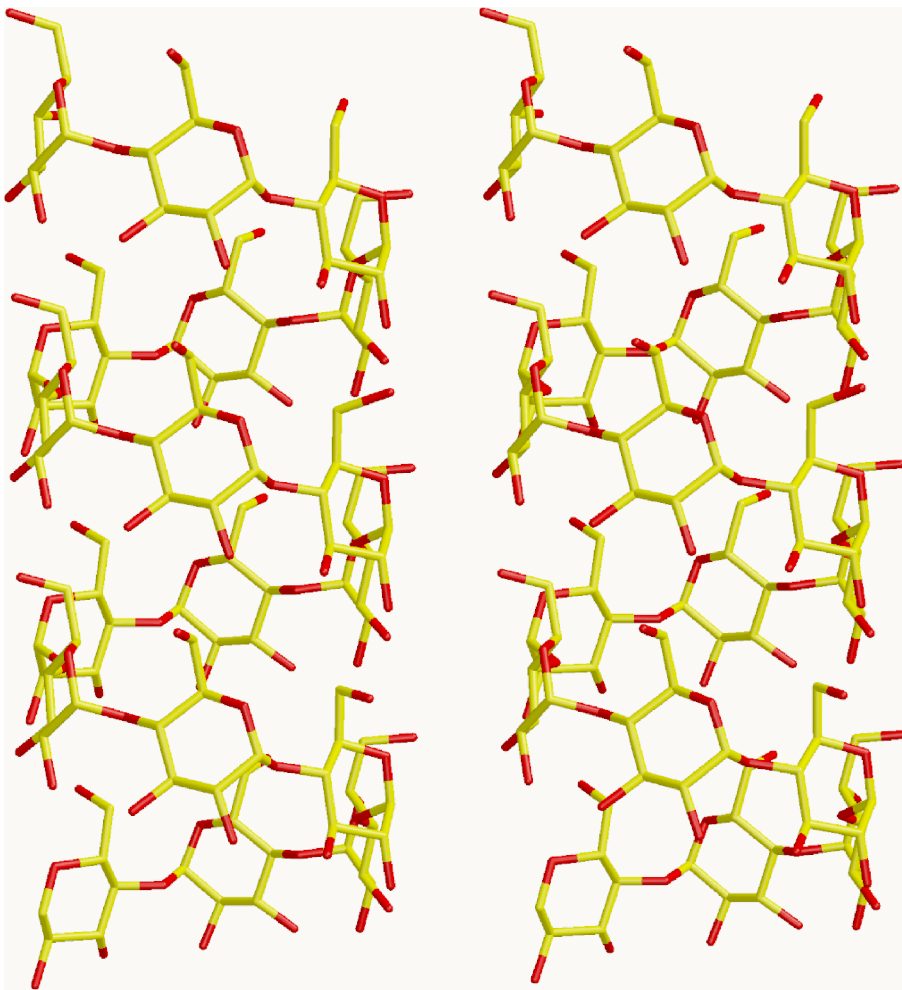


Abbildung 43: Modell der V-Amylose (Stereobild). Die Modellkoordinaten wurden freundlicherweise von Dr. K. Geßler zur Verfügung gestellt (Geßler *et al.*, 1999). Kohlenstoffe sind gelb und Sauerstoffatome sind rot eingezeichnet.

Die zweite Bindungstasche ist passend für die helikale Struktur der V-Amylose gebogen und die in dieser Tasche gebundenen Acarbose überlagert sehr gut mit einem Ausschnitt der V-Amylose (Abbildung 44). Im Gegensatz zur Acarbose in der aktiven Tasche (Tabelle 7) ist die intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen O2 und O3' der Einheiten C und D vorhanden (Tabelle 8). Nur zwei von vier Glucosen der Acarbose in dieser Bindungstasche sind über mehrere Wechselwirkungen mit dem Enzym verbunden. Die Torsionswinkel φ und ψ zwischen den beiden Glucoseeinheiten weichen hier am meisten von dem Modell der V-Amylose ab (Geßler *et al.*, 1999).

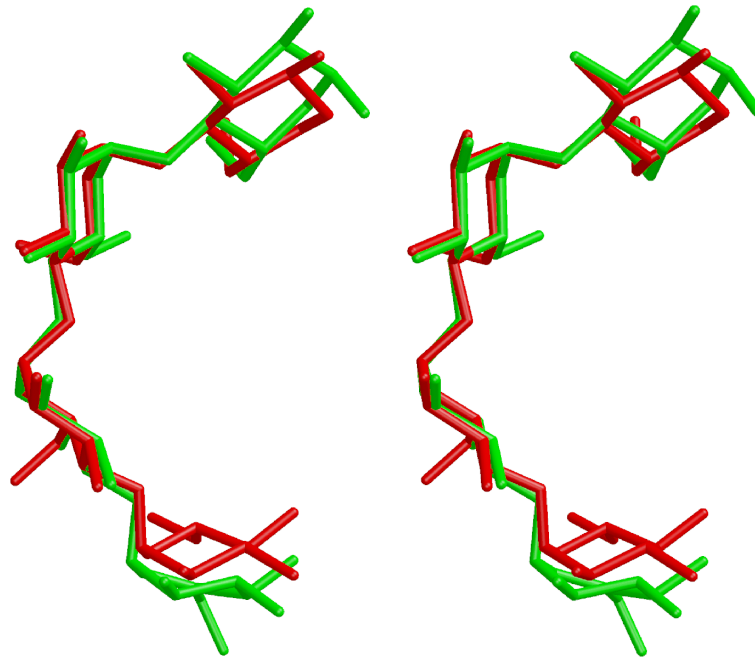


Abbildung 44: Überlagerung der Acarbose in der zweiten Bindungstasche mit einem Fragment V-Amylose. Die Acarbose ist grün, die V-Amylose ist rot dargestellt.

5.5 Möglicher Bindungspfad längerer Substrate und Mechanismus der Ringbildung

5.5.1 Die Struktur von Amylose und der Substratbindungstaschen

Aufgrund der räumlichen Ausdehnung der Umgebung der beiden gefundenen Bindungstaschen der Amylomaltase für Acarbose muß angenommen werden, daß Amylomaltase nur einzelsträngige V-Amylose und nicht die doppelsträngige A- oder B-Amylose prozessieren kann. Im aktiven Zentrum wird der Platz durch die hochkonservierte 250er-Schleife begrenzt und in der zweiten Bindungstasche kann aufgrund ihrer Form und Ausdehnung nur V-Amylose binden.

In der Bindungstasche des aktiven Zentrums weicht die Konformation der Acarbose stark von der einer V-Amylose ab, so daß sich keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Windungen der Helix und der benachbarten Glucosen in den Bindungstaschen -1 und +1 ausbilden können (Abbildung 45). Die zweite Bindungstasche entspricht in ihrer Form einer Windung der V-Amylose (Abbildung 44).

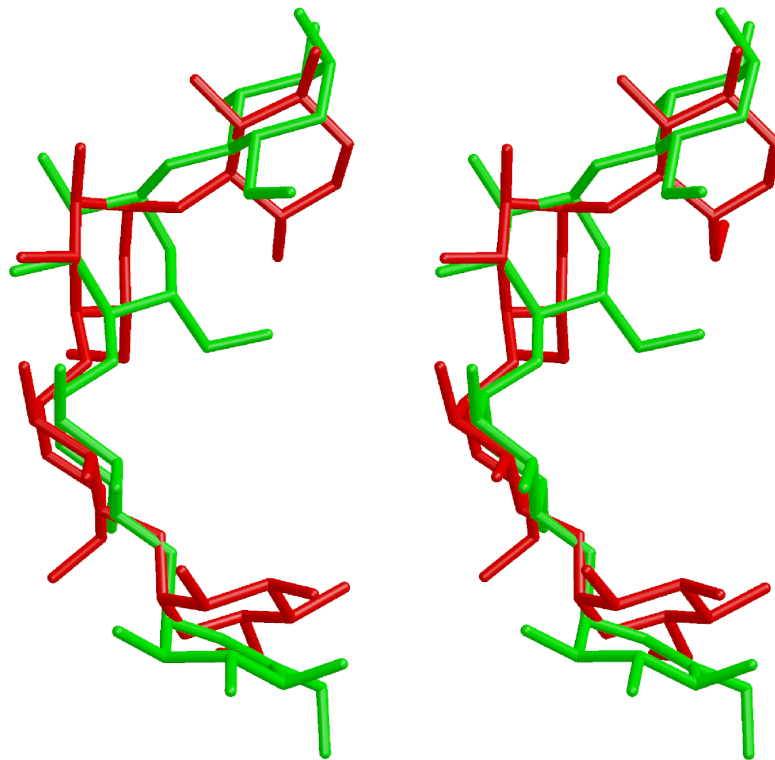


Abbildung 45: Überlagerung der Acarbose gebunden im aktiven Zentrum mit einem Fragment der V-Amylose. Die Acarbose ist grün, die V-Amylose ist rot dargestellt.

Es ist anzunehmen, daß nicht die gesamte Amylosekette, sondern nur einige Abschnitte an das Enzym binden. Dafür sprechen sowohl energetische als auch entropische Gründe. Energetisch ist die Aufwindung der Amylose-Helix, bei der viele Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden, ungünstig. Außerdem schränkt die Bindung der gesamten Amylose-Kette deren Freiheitsgrade stark ein, so daß ein entropisch weniger bevorzugter Zustand erhalten wird. Die Tendenz der Bindung nur einiger Bereiche der Amylosekette kann auch schon bei den beiden Acarbose-Molekülen beobachtet werden. Wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben, kann bei der Acarbose im aktiven Zentrum aufgrund der geringen Wechselwirkung mit dem Protein nicht von einer Bindungstasche -3 gesprochen werden. Ebenso wird die Acarbose in der zweiten Bindungstasche nur mit zwei ihrer vier Glucoseeinheiten von der Amylomaltase gebunden (Kapitel 5.4.2).

Insgesamt werden von den zwei mal vier Glucosen der Acarbose nur fünf gebunden. Dies deutet darauf hin, daß die Amylosekette von der Amylomaltase nur teilweise gebunden wird, um die notwendige Verbiegung der Amylose von der Idealkonformation zu kompensieren.

5.5.2 Bindung längerer Substratketten

Nach der kristallographischen Verfeinerung wurde ein größerer Teil Restelektronendichte für die weitere Diskussion als ein Glucosemolekül interpretiert (Abbildung 27). Möglicherweise hat hier ein weiteres Acarbose-Molekül gebunden, bei dem die restlichen drei Einheiten allerdings nicht fest orientiert sondern frei beweglich sind. Die hohe Flexibilität der drei fehlenden Glucosen würde erklären, weshalb keine weitere Restelektronendichte erkennbar war.

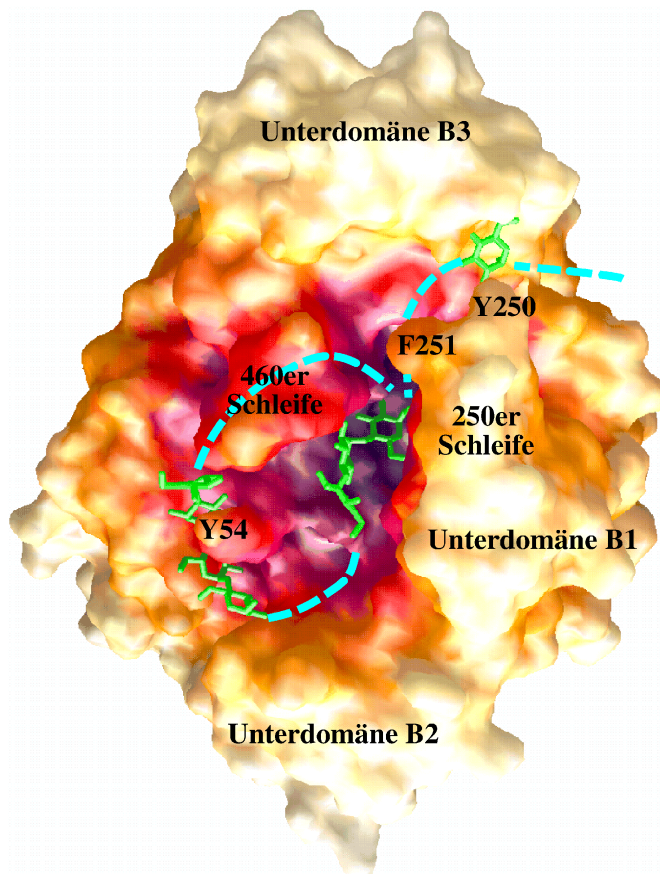


Abbildung 46: Vorschlag der Bindung von Amylose und die Bildung von Cycloamylose. Die Orientierung und die Farben sind analog zu Abbildung 41. Die gestrichelte Linie (türkis) zeigt den vorgeschlagenen Bindungsmodus für längere Amyloseketten sowie den angenommenen Pfad für die Ringbildung.

Der Abstand dieser Bindungsstelle zum Tyr-250, welches sich an der Spitze der 250er-Schleife befindet, beträgt ~ 4.5 Å. Der Abstand zum reduzierenden Ende der Acarbose im aktiven Zentrum liegt bei 11 Å. Möglicherweise ist diese Glucosebindungstasche Teil einer Bindungsspalte für längere Amyloseketten, die bis zum aktiven Zentrum reicht (Abbildung 46). Die Solvens-exponierten Aminosäuren Tyr-250, Phe-251 und Phe-366 (vgl. Abbildung 27) sind zwar inner-

halb der Amylomaltasen und eines pflanzlichen D-Enzyms nicht konserviert, allerdings sind in diesen Sequenzpositionen nur hydrophobe Seitenketten zu beobachten (Abbildung 32), so daß möglicherweise nur deren hydrophobe Eigenschaft eine wichtige Rolle spielt.

5.5.3 Angenommene wichtige Faktoren für die Ringbildung

Die Form der molekularen Oberfläche der Amylomaltase in Verbindung mit der Lage der beiden gebundenen Acarbose-Moleküle ermöglicht ein Modell für die Prozessierung von Amylose durch die Amylomaltase (Abbildung 46).

Das reduzierende Ende der zweiten Acarbose ist nur ca. 14 Å vom nicht-reduzierenden Ende der Glucoseeinheit A der im aktiven Zentrum gebundenen Acarbose entfernt. Die Länge einer Glucose ist etwa 4.6 Å, d. h. um die Lücke zu schließen und eine durchgehende Kette zu erhalten, wären, wenn man die helikale Struktur der Amylose vernachlässigt, mindestens drei Hexosen nötig. Die Kette hätte dann eine Länge von 11 Glucosen.

Die Distanz zwischen dem nicht-reduzierenden Ende der zweiten Acarbose und dem reduzierenden Ende der Acarbose im aktiven Zentrum beträgt ~25 Å. Allerdings ist bei dieser Route die 460er-Schleife im Weg, so daß die Lücke nicht durch nur sechs Glucoseeinheiten ($6 \cdot 4.6 \text{ \AA}$), wiederum unter Vernachlässigung der V-Amylose-Struktur, geschlossen werden könnte. Die minimale theoretische Ringgröße muß daher allein schon aufgrund der sterischen Hinderung der 460er-Schleife größer als 17 Einheiten sein.

5.5.3.1 Die 460er-Schleife

Wenn die zweite Bindungsspalte wie angenommen für die Bildung zyklischer Verbindungen relevant ist, spielt die 460er-Schleife eine wichtige Rolle. Im Sequenzalignment der Amylomaltase und eines D-Enzyms sind in diesem Segment des Alignments vier Aminosäuren (Asn-464, Pro-466, Asn-472 und Trp-473) konserviert (Abbildung 32). Asn-464 und Trp-473 nehmen an der Bindung der Acarbose im aktiven Zentrum teil. Pro-466 und Asn-472 bilden miteinander innerhalb der Schleife Wasserstoffbrücken aus, die möglicherweise notwendig für die spezifische Form der Schleife sind. Größere Indels in diesem Bereich des Alignments zeigen, daß die Länge der 460er-Schleife unter den Enzymen stark variiert. Möglicherweise ist dies ein entscheidender Faktor für die minimale Ringgröße der Cycloamylose-Produkte, die für das einzelne Enzym

jeweils charakteristisch ist. Sie ist lediglich für die Amylomaltasen aus *Thermus aquaticus* (DP = 22) (Terada *et al.*, 1999) und *E. coli* (DP = 17) (Takaha & Smith, 1999) sowie für das D-Enzym aus der Kartoffel (DP = 17) (Takaha *et al.*, 1996) bekannt.

5.5.3.2 Die zweite Bindungstasche

Die Aminosäuren der zweiten Bindungstasche der Acarbose sind alle in der Unterdomäne B2 lokalisiert. Im Alignment mit anderen Amylomaltasen und eines D-Enzyms ist keine dieser Aminosäuren konserviert. Alle Aminosäuren liegen in der Nähe zu kleineren Indels. Möglicherweise ist die geringe Konservierung ein Hinweis darauf, daß die zweite Bindungstasche zusammen mit der 460er-Schleife für die Variation der minimalen Ringgröße der Cycloamylosen verantwortlich ist.

Die Struktur der Komplexes der Amylomaltase mit Acarbose legt einen möglichen Pfad für die Bildung zyklischer Verbindungen nahe. Schlüsselfunktionen übernehmen dabei die 250er- und 460er-Schleifen, die beide die Ringgröße der gebildeten Cycloamylosen beeinflussen könnten und auch die Unterdomäne B2, in der sämtliche Aminosäuren der zweiten Bindungstasche lokalisiert sind. Die theoretische Ringgröße entlang des angenommenen Pfades unter Vernachlässigung der helikalen Struktur der Amylose wurde mit mindestens 17 Glucoseeinheiten nahe dem experimentellen Wert von 22 bestimmt.