

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mutarotation der Glucose in wässriger Lösung.	1
Abbildung 2: Struktur der α -D-(+)-Glucose in α -1,4-verknüpften Sacchariden.	2
Abbildung 3: Reaktionsmechanismus für α -1,4-reagierende Enzyme unter Retention der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff.	6
Abbildung 4: Struktur der Cycloamylose mit 26 Glucoseresten.	9
Abbildung 5: Relevante Bereiche des Plasmides pFGQ8.	14
Abbildung 6: Expression der Amylomaltase mit der Zelllinie MC1062 in LB-Medium.	25
Abbildung 7: Vergleich zwischen Methionin und Selenomethionin.	26
Abbildung 8: Expression der Amylomaltase mit der Zelllinie DSM5912 mit NM-Medium und Methionin.	27
Abbildung 9: Expression der Amylomaltase mit der Zelllinie B834(DE3) mit NM-Medium und Methionin.	28
Abbildung 10: Anionenaustauschchromatogramm des letzten Reinigungsschrittes der Amylomaltase.	29
Abbildung 11: Isoelektrische Fokussierung der Amylomaltase.	30
Abbildung 12: Kristalle der Amylomaltase aus <i>Thermus aquaticus</i> bei verschiedenen Bedingungen eines Kristallscreens.	31
Abbildung 13: Kristall der Amylomaltase aus <i>Thermus aquaticus</i>	32
Abbildung 14: Harkerschnitte der Schweratomderivate für die Raumgruppe $P6_{2/4}$	37
Abbildung 15: Molekulare Struktur von (a) 3KB-CNP- β -G5 und (b) Hoxa.	43
Abbildung 16: Molekulare Struktur der Acarbose.	43
Abbildung 17: Abfolge der Sekundärstrukturelemente eines $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses.	46
Abbildung 18: Anordnung der acht α -Helices und acht β -Stränge zum $(\beta, \alpha)_8$ -Faß.	47
Abbildung 19: Topographische Darstellung der Amylomaltase aus <i>Thermus aquaticus</i>	48
Abbildung 20: Die Faltung der Amylomaltase.	49
Abbildung 21: Unterschiede in der Struktur der Acarbose zu Maltotetraose.	50
Abbildung 22: Die Faltung der Amylomaltase im Komplex mit Acarbose.	51

Abbildung 23: $ F_o - F_c $ omit Elektronendichte der im aktiven Zentrum gebundenen Acarbose ...	52
Abbildung 24: Schema der Wechselwirkungen der Acarbose im aktiven Zentrum.....	53
Abbildung 25: $ F_o - F_c $ omit Elektronendichte der Acarbose gebunden in der zweiten Bindungs- stelle.....	54
Abbildung 26: Schema der Wechselwirkungen der Acarbose mit der zweiten Bindungsstelle....	55
Abbildung 27: $ F_o - F_c $ Restelektronendichte in der Nähe des aktiven Zentrums.....	57
Abbildung 28: Stereobild der Kristallkontakte.....	59
Abbildung 29: Temperaturverlauf der Hauptkettenatome der nativen Amylomaltase-Struktur. ..	63
Abbildung 31: Überlagerung der aktiven Zentren der nativen und Acarbose-gebundenen Amylo- maltase.	64
Abbildung 32: Sequenzalignment für verschiedene Amylomaltasen und dem D-Enzym aus der Kartoffel.....	66
Abbildung 33: Strukturelles Alignment verschiedener Enzyme der α -Amylase-Familie.....	68
Abbildung 34: Produktspezifität der α -Amylase, CGTase und Amylomaltase.	69
Abbildung 35: Überlagerung der aktiven Zentren der Amylomaltase aus <i>Thermus aquaticus</i> , einer CGTase aus <i>Bacillus circulans</i> Stamm 8 und einer α -Amylase aus Schweinemagen. 70	70
Abbildung 36: Topographie-Diagramm der α -Amylase aus Schweinemagen und CGTase aus <i>Bacillus circulans</i> Stamm 8.....	74
Abbildung 37: Topographie-Diagramm der CGTase aus <i>Bacillus circulans</i> Stamm 8 und der Amylomaltase aus <i>Thermus aquaticus</i>	76
Abbildung 38: Überlagerung der C_α -Kette einer α -Amylase aus Schweinemagen mit einer CGTase aus <i>Bacillus circulans</i>	77
Abbildung 39: Überlagerung der C_α -Kette der Amylomaltase mit der CGTase aus <i>Bacillus</i> <i>circulans</i>	78
Abbildung 40: Molekulare Oberflächen der α -Amylase Isoenzym II aus Schweinemagen in Komplex mit einer Maltohexaose und einer CGTase aus <i>Bacillus circulans</i> Stamm 8 im Komplex mit einem β -Cylodextrin.....	79
Abbildung 41: Molekulare Oberfläche der Amylomaltase aus <i>Thermus aquaticus</i> im Komplex mit Acarbose.	80
Abbildung 42: Vergleich der Omit-Elektronendichten der 250er-Schleife konturiert bei $4.5 \sigma_{rms}$ und ausgewählter Seitenketten des aktiven Zentrums konturiert bei $5.5 \sigma_{rms}$	81

Abbildung 43: Modell der V-Amylose.	84
Abbildung 44: Überlagerung der Acarbose in der zweiten Bindungstasche mit einem Fragment V-Amylose.	85
Abbildung 45: Überlagerung der Acarbose gebunden im aktiven Zentrum mit einem Fragment der V-Amylose.	86
Abbildung 46: Vorschlag der Bindung von Amylose und die Bildung von Cycloamylose.	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Statistiken der verwendeten nativen kristallographischen Datensätze	33
Tabelle 2: Schweratomlagen und berechnete Harkerpeaks der Schweratomverbindungen.	37
Tabelle 3: Statistiken der Schweratomdatensammlung und Phasierung.	38
Tabelle 4: „ <i>figure of merit</i> “ als Funktion der Auflösung für alle Schweratomdaten.	39
Tabelle 5: Verfeinerungsstatistik für die Struktur der nativen Amylomaltase.	41
Tabelle 6: Verfeinerungsstatistik für den Komplex aus Amylomaltase mit Acarbose.	44
Tabelle 7: Torsionswinkel der glykosidischen Bindungen und Abstände der O2-O3'-Sauerstoffatome der im aktiven Zentrum gebundenen Acarbose.	54
Tabelle 8: Torsionswinkel der glykosidischen Bindungen und Abstände der O2-O3' Atome der Acarbose gebunden in der Nähe des aktiven Zentrums.	56
Tabelle 9: Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen.	58
Tabelle 10: Sequenzhomologien in Prozent für verschiedene Amylomaltasen und ein D-Enzym aus der Kartoffel.	65
Tabelle 11: Strukturell verwandte Enzyme zur Amylomaltase aus <i>Thermus aquaticus</i>	67

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Ingo Dirk Przylas
Geburtsort 17. September 1971 in Berlin
Familienstand ledig

Schulausbildung

Sep. '78 – Juli '82 Südgrundschule Zehlendorf in Berlin
Sep. '82 – Juni '91 Evangelisches Gymnasium zum Grauen Kloster in Berlin;
Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Okt. '91 – Okt. '94 Studium der Chemie an der Technischen Universität Berlin
Aug. '93 Vordiplom
Okt. '94 – Okt. '96 Fortführung des Studiums der Chemie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, Schweiz
April '95 *Vordiplom* der ETH Zürich, Schweiz
April '96 – Aug. '96 *Diplomarbeit* an der Harvard University, Cambridge, USA mit dem Thema „Studies toward the Synthesis of a Partially Labeled Protein“ im Labor von Prof. Dr. S. Schreiber
Okt. '96 Abschluß des Chemiestudiums als *Diplom* Chemiker ETH an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, Schweiz
Dez. '96 - April '00 Arbeit an der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. Saenger im Institut für Kristallographie (FU Berlin)

Veröffentlichungen

- Przylas, I., Tomoo, K., Terada, Y., Takaha, T., Fujii, K., Saenger, W. & Sträter, N. (2000). Crystal structure of amyloamylase from *Thermus aquaticus*, a glycosyltransferase catalysing the production of large cyclic glucans. *J. Mol. Biol.* **296**, 873-886.
- Przylas, I., Terada, Y., Fujii, K., Takaha, T., Saenger, W. & Sträter, N. (2000). X-ray structure of acarbose bound to amyloamylase from *Thermus aquaticus*. Implications for the synthesis of large cyclic glucans. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6903-6913.
- Maier, T., Przylas, I., Herdewijn, P. & Saenger, W. (2000). Structural determination of a decamer of RNA in complex with HNA, a new potent antisense construct for gen-therapy. in Vorbereitung

Vorträge

- Przylas, I., Tomoo, K., Terada, Y., Takaha, T., Fujii, K., Saenger, W. and Sträter, N. (1999). Crystal Structure of Amyloamylase from *Thermus aquaticus*. Ezaki Glico Co., Osaka, Japan.
- Przylas, I., Tomoo, K., Terada, Y., Takaha, T., Fujii, K., Saenger, W. and Sträter, N. (1999). Crystal Structure of Amyloamylase from *Thermus aquaticus*, a Glycosyltransferase Catalysing the Production of Large Cyclic Glucans. 2nd Heart of Europe *bio-crystallography* Konferenz, Lübben.