



Die Kristallstruktur der  $\alpha$ -Amylase A aus dem  
hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* MSB8

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Thomas Pape**  
aus Göttingen

Göttingen 2002

D 7

Referent: Prof. G.M. Sheldrick, Ph.D.

Korreferent: Prof. Dr. W. Liebl

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2002

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DIE FAMILIE DER $\alpha$ -AMYLASEN	1
1.2	<i>THERMOTOGA MARITIMA</i> $\alpha$ -AMYLASE	2
1.3	HYPERTHERMOSTABILITÄT	4
1.4	ÜBERBLICK ÜBER DIE ARBEIT	5
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>6</b>
2.1	BIOCHEMISCHE METHODEN	6
2.1.1	<i>Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	6
2.1.2	<i>Matrix-assistierte Laser Desorptions / Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)</i>	7
2.2	KRISTALLOGRAPHISCHE GRUNDLAGEN	8
2.2.1	<i>Strukturlösung</i>	8
2.2.2	<i>Dichtemodifikation</i>	19
2.2.3	<i>Strukturverfeinerung</i>	25
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTELLES</b>	<b>28</b>
3.1	SDS-POLYACRYLAMID-GELEKTROPHORESE DER AMYA	28
3.2	MATRIX-UNTERSTÜTZTE LASER-DESORPTIONS / IONISATIONS-FLUGZEIT- MASSENSPEKTROMETRIE (MALDI-ToF-MS) VON AMYA' UND AMYA''	30
3.3	KRISTALLISATION	31
3.3.1	<i>Umgang mit Proteinlösungen</i>	31
3.3.2	<i>Ansetzen von Lösungen zur Kristallisation</i>	32
3.3.3	<i>Kristallisation der Thermotoga maritima <math>\alpha</math>-Amylase A</i>	32
3.3.4	<i>Einbau von Heteroatomen in die Kristallstruktur der AmyA''</i>	36
3.4	KRYOPROTEKTION	37
3.5	KRISTALLMONTAGE	38
3.6	DATENSAMMLUNG UND -PROZESSIERUNG	39
3.6.1	<i>Transformation der Elementarzelle</i>	39
3.7	LÖSUNG DER STRUKTUR DER UNKOMPLEXIERTEN AMYA''	43
3.7.1	<i>Molecular Replacement</i>	43

---

3.7.2	<i>Strukturlösung mit isomorphen und anomalen Differenzen</i>	44
3.8	GENERIERUNG EINES ERSTEN STRUKTURMODELLS	63
3.9	LÖSUNG DER STRUKTUR DER AMYA'' IM KOMPLEX MIT ACARBOSE	64
3.10	STRUKTURVERFEINERUNG	64
3.11	BEURTEILUNG DER PROTEINSTRUKTUREN	67
3.12	GENERIERUNG VON ABBILDUNGEN	67
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>68</b>
4.1	STRUKTUR DER UNKOMPLEXIERTEN AMYA''	68
4.1.1	<i>Qualität des Strukturmodells</i>	68
4.1.2	<i>Beschreibung der Struktur</i>	69
4.2	STRUKTUR DER AMYA'' IM KOMPLEX MIT DEM INHIBITOR ACARBOSE	77
4.2.1	<i>Qualität des Strukturmodells</i>	78
4.2.2	<i>Beschreibung der Struktur</i>	80
4.3	THERMOSTABILITÄT DER <i>THERMOTOGA MARITIMA</i> $\alpha$ -AMYLASE A	93
4.3.1	<i>Packungseffekte</i>	95
4.3.2	<i>Wasserstoffbrückenbindungen</i>	96
4.3.3	<i>Ionische Wechselwirkungen</i>	99
4.3.4	<i>Disulfidbrücken</i>	102
4.3.5	<i>Anteil und Verteilung hydrophober, polarer und geladener Seitenketten</i>	103
4.3.6	<i>Prolin-Substitutionen</i>	107
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>113</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	Acarbose
AmyA	authentische <i>Thermotoga maritima</i> $\alpha$ -Amylase A (553 AS)
AmyA'	um das mutmaßliche, n-terminale Signalpeptid verkürzte AmyA (535 AS)
AmyA''	um das mutmaßliche, n-terminale Signalpeptid und den folgenden Membranlinker verkürzte AmyA (505 AS)
AS	Aminosäure
BCOG	<i>Bacillus cereus</i> Oligo-1,6-Glucosidase
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CC	<i>correlation coefficient</i> (Korrelationskoeffizient)
C-terminal	carboxyterminal
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
F <sub>c</sub>	berechneter Strukturfaktor
FFT	<i>Fast Fourier Transformation</i>
F <sub>o</sub>	beobachteter Strukturfaktor
fom	<i>figure of merit</i>
kDa	Kilodalton
M	molar, mol/l
mPEG	Polyethylenglykol-monomethylether
MR	<i>molecular replacement</i> („Methode des molekularen Ersatzes“)
NCS	<i>non-crystallographic symmetry</i> (nicht-kristallographische Symmetrie)
N-terminal	aminoterminal
PATFOM	Patterson <i>figure of merit</i>
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PFP	perfluorierter Polyether

---

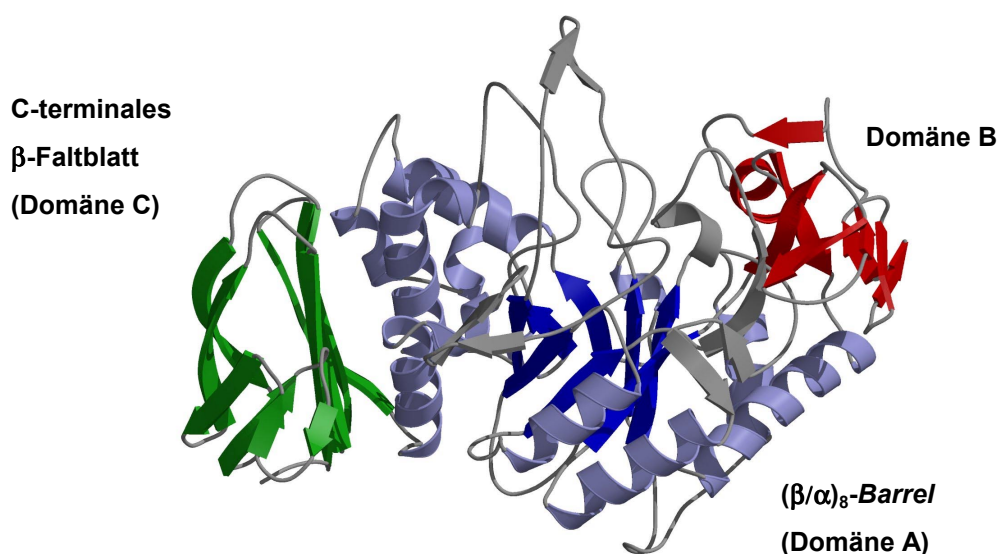
r.m.s.	<i>root mean square</i> (mittlere Quadratwurzel)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese)
SIR	<i>single isomorphous replacement</i>
SIRAS	<i>single isomorphous replacement anomalous scattering</i>
Tab.	Tabelle
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
TLS	Tensoren zur Beschreibung der anisotropen Bewegung einer starren Gruppe
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
(w/w)	<i>weight-weight</i>

# 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Struktur, Substrat- bzw. Inhibitorbindung und Thermostabilität der  $\alpha$ -Amylase A (AmyA) des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* MSB8. Um eine Einordnung des Organismus sowie des untersuchten Enzyms zu ermöglichen, werden im folgenden relevante Ergebnisse vorausgegangener Arbeiten vorgestellt und zugrundeliegende Prinzipien aufgezeigt.

## 1.1 Die Familie der $\alpha$ -Amylasen

Anhand von Vergleichen bezüglich der Übereinstimmung ihrer Peptidsequenzen können  $\alpha$ -Amylasen gemeinsam mit anderen Glucosidasen und Transferasen den Familien 13 und 57 der glycosidischen Hydrolasen zugeordnet werden (Henrissat & Bairoch 1996, Henrissat 1991). Während über die dreidimensionalen Strukturen der Familie 57 nur sehr wenig bekannt ist (Coutinho & Henrissat 1999), existieren von  $\alpha$ -Amylasen der Familie 13 inzwischen über 60 Strukturen in der Protein Daten Bank (Berman *et al.* 2000), die bezüglich ihrer Topologien eine weitgehende Übereinstimmung zeigen. Allen Familie 13 Amylasen gemeinsam ist eine Domänenstruktur, bestehend aus einem zentralen  $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel, das an gegenüberliegenden Seiten um eine kleine, unregelmäßige  $\beta$ -Domäne B sowie ein  $\beta$ -Faltblatt am Carboxyterminus erweitert ist (vergl. Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Allgemeine Topologie der Familie 13  $\alpha$ -Amylasen am Beispiel des Enzyms aus dem Schweinepankreas (pdb-Code: 1DHK, Qian *et al.* 1993). Das zentrale  $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel ist in dunkel- und hellblau dargestellt, Domäne B ist rot, das carboxyterminale  $\beta$ -Faltblatt grün koloriert.



Das aktive Zentrum der bekannten Familie 13 Amylasen befindet sich in einer Furche zwischen der carboxyterminalen Seite des zentralen TIM-Barrels (Domäne A) und der Domäne B. Es umfasst zwei Aspartatreste und einen Glutamatrest, sowie zwei Histidine, die zur Fixierung des gebundenen Substrats beitragen (Ishikawa *et al.* 1992). Über weitere polare Seitenketten können je nach Spezies insgesamt 4 - 10 Glucoseeinheiten an dem Enzym fixiert werden. Dabei binden relativ zu der *cleavage site* auf der reduzierenden Seite (Davies *et al.* 1997) in der Regel zwei oder drei Saccharidreste, während auf der nicht-reduzierenden Seite bis zu sieben Saccharideinheiten fixiert werden können (Nielsen & Borchert 2000). Abweichungen von diesem Bindungsmodus sind möglich.

Aufgrund der biotechnologischen Relevanz dieser Gruppe von Enzymen, die vermehrt im Rahmen der industriellen Stärkeverarbeitung und Waschmittelproduktion, aber auch der Pharmazie eingesetzt werden (Coutinho & Henrissat 1999), hat die Zahl der röntgenkristallographisch untersuchten Glucosidasen in den vergangenen Jahren stark zugenommen (Berman *et al.* 2000). Besonderes Interesse wird in diesem Zusammenhang Enzymen aus hyperthermophilen Organismen entgegengebracht, da sie aufgrund ihrer hohen thermischen Stabilität weniger kompliziert zu handhaben sind und bei den für sie optimalen Temperaturen die jeweiligen Reaktionen mit teils deutlich höheren Umsatzraten katalysieren als verwandte mesophile Enzyme (Liebl *et al.* 1997).

## 1.2 *Thermotoga maritima* $\alpha$ -Amylase

Bei *Thermotoga maritima* handelt es sich um ein stäbchenförmiges, marin lebendes Bakterium mit einem Temperaturoptimum von 80°C und einem bevorzugten pH-Wert von 6.5. Die erste Isolierung dieser strikt anaeroben und obligat heterotrophen Spezies gelang Huber *et al.* 1986 aus geothermal erhitzten Meeressedimenten in der Nähe der Insel Vulcano / Italien.

Von *Thermotoga maritima* konnten bis dato die drei  $\alpha$ -Amylasen AmyA, AmyB und AmyC identifiziert, exprimiert, gereinigt und mikrobiologisch charakterisiert werden (Fütterer 2001). Während die Funktion der AmyA eindeutig dem Katabolismus von  $\alpha$ -Glukanen und somit der Bereitstellung von Energie zuzuordnen ist, sind die Rollen der AmyB und der AmyC noch nicht eindeutig geklärt. Ihre Gene liegen im Genom von *Thermotoga maritima* an einer von dem Gencluster der *amyA* und anderer amylolytischer Enzyme weit entfernten Stelle, deren

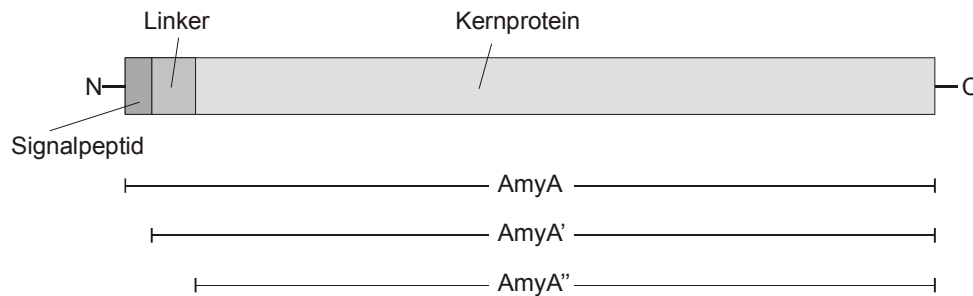
genetischer Kontext sich nicht mit dem Kohlenhydratstoffwechsel in Verbindung bringen lässt. Es wird aber angenommen, dass AmyB dem Abbau zellulärer Speicherpolymere dient und AmyC in die Regulation der Viskosität des Cytoplasmas und des osmotischen Drucks eingebunden ist (Fütterer 2001).

Während AmyB und AmyC intrazellulär vorkommen, handelt es sich bei AmyA um ein wahrscheinlich extrazellulär vorliegendes Lipoprotein (Liebl *et al.* 1997). Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 61 kDa und umfasst insgesamt 553 Aminosäurereste, von denen die 18 N-terminalen Reste vermutlich ein Signalpeptid zur Translokation des Enzyms durch die cytoplasmatische Membran darstellen. Daran anschließend folgt ein ca. 25 Aminosäurereste langer Abschnitt, der reich an Serin und Threonin ist und von dem angenommen wird, dass er als flexible Verbindung des Kernproteins mit der Toga des Bakteriums fungiert. Eine entsprechende Lokalisation des Enzyms konnte kürzlich mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen einer Immunogold-Markierung bestätigt werden (Armbrecht 2001). Der Nachweis von 85% der Aktivität der AmyA an der Außenseite intakter Zellen deutet ebenfalls auf eine extrazelluläre Lage des Proteins hin (Liebl *et al.* 1997).

AmyA hydrolysiert spezifisch  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindungen, während  $\alpha$ -1,6-verknüpfte Saccharide nicht gespalten werden. Das bevorzugte Substrat des Enzyms ist Amylose, mit dem bei einer optimalen Temperatur von 85 - 90°C und einem pH-Wert von 7.0 eine maximale spezifische Aktivität von  $5.6 \cdot 10^3$  U/mg erreicht wird. Als Produkte entstehen kurzkettige Maltodextrine sowie Glukose und Maltose. Wie die meisten bekannten  $\alpha$ -Amylasen ist auch AmyA auf das Vorhandensein von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen angewiesen und benötigt zum Erreichen der maximalen Aktivität außerdem NaCl als Additiv in Konzentrationen von 100 - 150 mM.  $\text{Ca}^{2+}$  kann durch Metallionen der zweiten Hauptgruppe wie  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ba}^{2+}$  substituiert werden, andere divalente Metallionen wie z.B.  $\text{Hg}^{2+}$  bewirken jedoch eine vollständige Inaktivierung des Enzyms. Gleichsam können Calciumionen in zu hoher Konzentration (>10mM) eine Reduktion der Aktivität um bis zu 50% zur Folge haben (Liebl *et al.* 1997).

*Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A wurde in vorangegangenen Arbeiten in drei unterschiedlichen Formen erhalten. Das authentische, 553 Aminosäuren umfassende Enzym AmyA (siehe Abb. 1.2) konnte lediglich in sehr geringen Mengen gewonnen werden, so dass eine weitere Charakterisierung nicht möglich war. Die Expression in *E. coli* und Aufreinigung

des rekombinanten Proteins ohne das Signalpeptid (535 AS, berechnete Masse 62.656 kDa, AmyA'), bzw. ohne Signalpeptid und Linkerregion (505 AS, berechnete Masse 59.487 kDa, AmyA'') lieferte jedoch ausreichende Mengen des reinen Proteins, das im Anschluss biochemisch untersucht und zur Kristallisation verwendet werden konnte (Fütterer 2001).



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung verschiedener Konstrukte der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A. AmyA: authentisches Protein, 553 Aminosäurereste; AmyA': um das mutmaßliche N-terminale Signalpeptid verkürzte AmyA, 535 Aminosäurereste; AmyA'': um das mutmaßliche N-terminale Signalpeptid und den Membranlinker verkürzte AmyA, 505 Aminosäuren.

### 1.3 Hyperthermostabilität

Als hyperthermophil werden Organismen bezeichnet, deren Temperaturoptimum bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit oberhalb von 80°C liegt (Stetter 1996). Entsprechende Vertreter kommen innerhalb der *Archaea* sowie der *Bacteria* vor, nicht jedoch in der Domäne der *Eucaryota*. Während innerhalb der Archaeen eine große Anzahl hyperthermophiler Ordnungen existiert, sind unter den *Bacteria* lediglich die beiden hyperthermophilen Ordnungen Aquificales und Thermotogales bekannt, von denen letztere auch die Art *Thermotoga maritima* mit einschließt.

Zahlreiche Untersuchungen zur Thermostabilität wurden in den vergangenen Jahren auf der Grundlage der dreidimensionalen Struktur röntgenographisch erfasster Proteine und der Analyse kompletter Genome thermophiler und mesophiler Organismen durchgeführt. In diesem Kontext wurden die generelle Größe mesophiler und hyperthermophiler Proteine (Chakravarty & Varadarajan 2000), die atomare Packung und damit zusammenhängend die Reduktion von Kavitäten und Oberflächenloops (Thompson & Eisenberg 1999, Szilagyi & Zavodszky 2000, Hennig *et al.* 1997, Britton *et al.* 1999), das Verhältnis der Oberfläche eines Proteins zu seinem Volumen (Wallon *et al.* 1997, Russell *et al.* 97) sowie eine evtl. Oligomerisierung (Kumar & Nussinov 2001, Villeret *et al.* 1998) analysiert. Besonderes Interesse wurde der Zusammensetzung der untersuchten Proteine bezüglich der Polarität und

Ladung der verschiedenen Aminosäuren (Chakravarty & Varadarajan 2000, Cambillau & Claverie 2000) sowie deren Verteilung im Inneren bzw. auf der Oberfläche des Proteins (Cambillau & Claverie 2000,) entgegengebracht, da sich hier vergleichsweise einheitliche Tendenzen erkennen lassen (Kumar & Nussinov 2001). Damit in Zusammenhang steht die Anzahl und das Arrangement von Wasserstoffbrückenbindungen (Kumar *et al.* 2000, Vogt *et al.* 1997, Querol *et al.* 1996 ) und ionischen Wechselwirkungen (Vogt *et al.* 97, Vetriani *et al.* 1998) innerhalb und zwischen Proteinmolekülen. Dass sich auch die Substitution einzelner definierter Aminosäuren auf die Thermostabilität eines Proteins auswirken kann, konnte für Disulfidbrücken bildende Cysteine (Matsumura *et al.* 1989, Radford *et al.* 1991) sowie Prolin-Reste (Suzuki *et al.* 1987, Watanabe *et al.* 1994) gezeigt werden.

War man zu Beginn der Forschung an thermostabilen und thermophilen Proteinen noch von einem einheitlichen Konzept zu deren Stabilisierung ausgegangen, lassen diese Untersuchungen klar erkennen, dass in der Natur eine Reihe völlig verschiedener Mechanismen zur Anpassung an extreme Temperaturen existieren. Tendenzen in ausgewählten Bereichen sind gleichwohl erkennbar.

#### 1.4 Überblick über die Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschreibt ausgehend von einer Probe der in *E. coli* überexprimierten  $\alpha$ -Amylase A des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* MSB8 die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur dieses Proteins mit Hilfe der Röntgenbeugung am Einkristall.

In diesem Zusammenhang wird zunächst die Kristallisation eines geeigneten Konstruktes des Enzyms beschrieben, wobei Kristallisationsversuche sowohl mit der 535 Aminosäuren umfassenden AmyA' als auch mit einer auf 505 Reste verkürzten Variante AmyA'' durchgeführt wurden. Da die Behandlung der erhaltenen Kristalle mit einem geeigneten Kryoprotektanden sowie die Strukturlösung größere Schwierigkeiten bereiteten, wird auf diese Punkte in den folgenden Kapiteln ausführlicher eingegangen. Die Struktur der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A wird sowohl in unkomplexierter Form als auch im Komplex mit dem Inhibitor Acarbose besprochen. Schließlich werden über Vergleiche der AmyA mit homologen Enzymen psychrophiler, mesophiler und (hyper-)thermophiler Organismen Argumente für die ausgeprägte Thermostabilität dieses Proteins diskutiert.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Biochemische Methoden

#### 2.1.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Kristallisierbarkeit eines Proteins wird entscheidend durch seine Reinheit beeinflusst. Eine relativ einfache aber gleichsam empfindliche Methode, Proteinlösungen auf eventuelle, makromolekulare Verunreinigungen und Abbauprodukte zu überprüfen, stellt die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese dar. Diese Analysemethode basiert auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit verschieden großer, negativ geladener Teilchen im elektrischen Feld, die definiert ist als

$$v = \frac{q \cdot E}{f_c} = u \cdot E \quad (2.1)$$

v	:	Wanderungsgeschwindigkeit	E	:	elektrische Feldstärke
q	:	Teilchenladung	$f_c$	:	Reibungskoeffizient
u	:	Mobilität			

Der Zusatz des Detergens Natriumdodecylsulfat (engl.: *sodium dodecyl sulphate*, SDS) zu einer Proteinprobe bewirkt eine Dissoziation inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen und führt so zu einer Entfaltung des Moleküls. Gleichzeitig wird das denaturierte Protein durch Bindung des SDS-Anions annähernd proportional zu seiner Masse (~1 SDS / 2 Aminosäuren) so stark negativ aufgeladen, dass die intrinsische Ladung des Proteins vernachlässigbar gering wird. Setzt man ein Gemisch entsprechend behandelte Proteine einem elektrischen Feld aus, so werden diese sich ihrer negativen Ladung entsprechend in Richtung der Anode bewegen. Da sich die Mobilität in einem Gel für einen gewissen Bereich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Masse des Proteins verhält, wandern kleine Proteine entsprechend schneller als große, so dass es zu einer Auftrennung des Gemisches kommt.

### 2.1.2 Matrix-assistierte Laser Desorptions / Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Mit Hilfe der 1989 etablierten (Lottspeich & Zorbas 1998) MALDI-MS-Analyse ist es möglich, hochmolekulare Proben auf einfache Weise und mit hoher Genauigkeit bezüglich ihrer Masse zu charakterisieren. Dazu wird die zu untersuchende Probe auf einem metallischen *target* mit einem  $10^3$  bis  $10^4$ -fachen Überschuss einer Matrix vermischt, die in der Lage ist, Laserlicht der im Experiment verwendeten Wellenlänge zu absorbieren. Als Matrix für Proteine haben sich beispielsweise Nikotinsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder Sinapinsäure bewährt. Diese Substanzen lassen sich mit Lasern einer Wellenlänge zwischen 266 und 355 nm kombinieren. Durch die Verdunstung des Lösungsmittels kristallisiert die Matrix aus, wobei der Analyt in das Kristallgitter der Matrix eingebaut wird. Die Probe wird dann in das Hochvakuum des Massenspektrometers ( $10^{-9}$  mbar) überführt und dort einem intensiven, kurzwelligen Laserpuls von einigen Nanosekunden Länge ausgesetzt. Durch resonante elektronische Anregung des  $\pi$ -Elektronensystems der Matrixmoleküle und Relaxation der absorbierten Energie in das Festkörpergitter der Matrix kommt es zu einem explosiven Übergang der Matrix in die Gasphase. Dabei wird ein Teil der Analytmoleküle von der expandierenden Matrixwolke mitgerissen und durch Matrixfragmentradikale chemisch ionisiert. Es entstehen so hauptsächlich die einfach protonierten ( $[M-H]^+$ ) bzw. einfach deprotonierten ( $[M-H]^-$ ) ionischen Formen der Analytmoleküle. Durch eine wenige Millimeter vor dem Metalltarget platzierte Elektrode wird nun ein elektrostatisches Feld von einigen 100 bis 1000 V/mm erzeugt, das je nach Polarität die positiv oder negativ ionisierten Probenmoleküle in Richtung dieser Elektrode beschleunigt. Nach Passage eines fokussierenden Ionenlinsensystems treten die Ionen durch eine Lochplatte in das Flugrohr ein. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeit, die aus dem jeweiligen Masse-Ladungsverhältnis  $m/z$  und der Stärke des Beschleunigungsfeldes resultiert, werden die verschiedenen Ionen nun entlang einer feldfreien Driftstrecke von 1 - 4 m separiert. Ein Detektor registriert das Eintreffen der Molekülonen am Ende dieser Driftstrecke. Abbildung 2.1 zeigt stark schematisiert den Aufbau eines linearen MALDI-Massenspektrometers. Durch zusätzliche Integration eines Reflektors am Ende der linearen Driftstrecke kann die Auflösung der beschriebenen Methode ( $m/\Delta m$ ) signifikant auf 5 - 35 ppm erhöht werden, so dass Proteine anhand weniger Signale mit hoher Zuverlässigkeit identifizierbar sind.

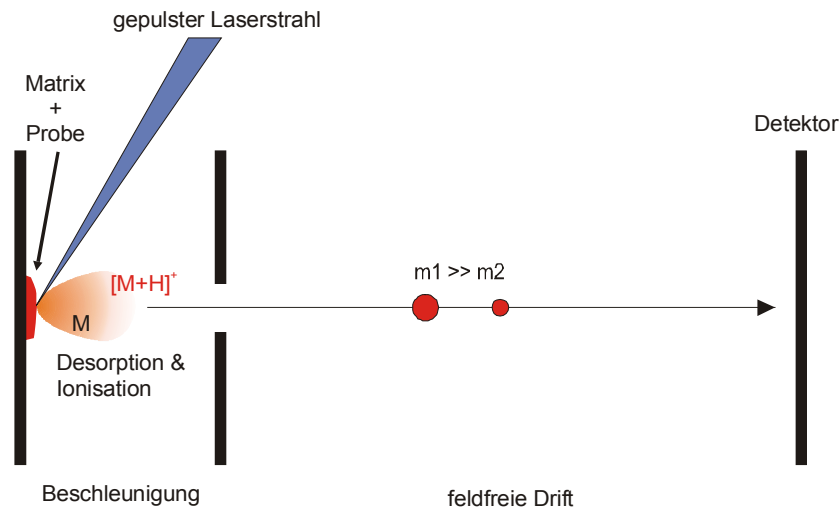


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines linearen MALDI-TOF Massenspektrometers.

Mit Hilfe eines Oszilloskops kann nun die Flugzeit ( $TOF = \textit{time of flight}$ ) anhand von Laser- und Detektorereignissen (‚start‘ und ‚stop‘) gemessen werden. Diese ist in erster Näherung proportional der Wurzel des Verhältnisses von Masse zu Ladung. Typische Flugzeiten liegen zwischen wenigen  $\mu\text{s}$  und einigen 100  $\mu\text{s}$ .

$$TOF = \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (2.2)$$

Als Ergebnis eines MALDI-TOF-Experimentes erhält man eine Auftragung der relativen detektierten Intensität gegen das Masse-Ladungs-Verhältnis  $m/z$ , aus der sich die Masse der untersuchten Substanz direkt als Maximum ablesen lässt. Im Falle mehrfach ionisierter Moleküle treten entsprechend zusätzliche *peaks* auf.

## 2.2 Kristallographische Grundlagen

### 2.2.1 Strukturlösung

Ein Röntgenbeugungsexperiment am Einkristall liefert innerhalb eines bestimmten Auflösungsbereiches die Intensitäten  $I$  der Reflexe  $hkl$ , die mit den Struktur Faktoren  $F_{hkl}$  in direkter Beziehung stehen. Zur Berechnung der Elektronendichte einer Molekülstruktur ist jedoch auch die Kenntnis der relativen Phasen der Reflexe zwingend erforderlich, die in einem üblichen Beugungsexperiment aber nicht direkt erfasst werden können. Auf den folgenden Seiten sollen deshalb einige Methoden der Phasenbestimmung näher erläutert

werden, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation zur Anwendung gekommen sind (Drenth 1994, Matthews 2001).

### 2.2.1.1 *Isomorphe Differenzen*

Existiert neben dem nativen Proteinkristall zusätzlich ein Schweratomderivat mit identischer Zelle und Raumgruppe so ist es möglich, aus den Unterschieden in den messbaren Intensitäten der zwei Datensätze zunächst die Schweratompositionen abzuleiten und im Anschluss Phasen für das native Protein bzw. das Schweratomderivat zu berechnen. Nimmt man an, dass  $F_P$  der Strukturfaktor eines nativen Proteins und  $F_{PH}$  der entsprechende Strukturfaktor eines Schweratomderivates des selben Proteins ist, so kann der Strukturfaktoranteil der Schweratome  $F_H$  aus diesen Werten durch Vektoraddition berechnet werden.

$$F_{PH} = F_P + F_H \quad (2.3)$$

Da die Phasen der Strukturfaktoren zu diesem Zeitpunkt eines Experimentes jedoch noch unbekannt sind, liefert die Differenz von  $F_{PH}$  und  $F_P$  lediglich einen unteren Grenzwert für die Amplitude von  $F_H$ . Der tatsächliche Wert ist umso größer, je stärker die Phasen  $\phi_P$  und  $\phi_{PH}$  voneinander abweichen (vergl. Abb. 2.2:A).

Um die Differenzen aus  $F_P$  und  $F_{PH}$  in einem SIR-Experiment (*single isomorphous replacement*) zur Bestimmung der Substruktur der Schweratome und anschließenden Berechnung der nativen Phasen nutzen zu können, ist es essentiell wichtig, dass die Zellen der verwendeten Kristalle zueinander möglichst isomorph sind. Als maximale Differenz kann etwa 1% der jeweiligen Kantenlänge angenommen werden. Die einzelnen Datensätze müssen zudem präzise gegeneinander skaliert werden, um Fehler in den isomorphen Differenzen klein zu halten.

### 2.2.1.2 *Anomale Streuung*

Neben der elastischen Streuung, deren Amplitude dem Streufaktor  $f_0$  eines Atoms proportional ist und die den größten Beitrag zu dem Streufaktor  $f$  liefert, existieren noch weitere Wechselwirkungen zwischen Röntgenquanten und der Atomhülle. Ist die Energie der eingestrahlten Röntgenwellen etwas größer als die Anregungsenergie einer im Kristall enthaltenen Atomsorte, so kann ein Photon absorbiert und ohne Verzögerung mit der gleichen Energie wieder emittiert werden. Dieser Effekt liefert den Beitrag  $f'$ , der dem Vektor des



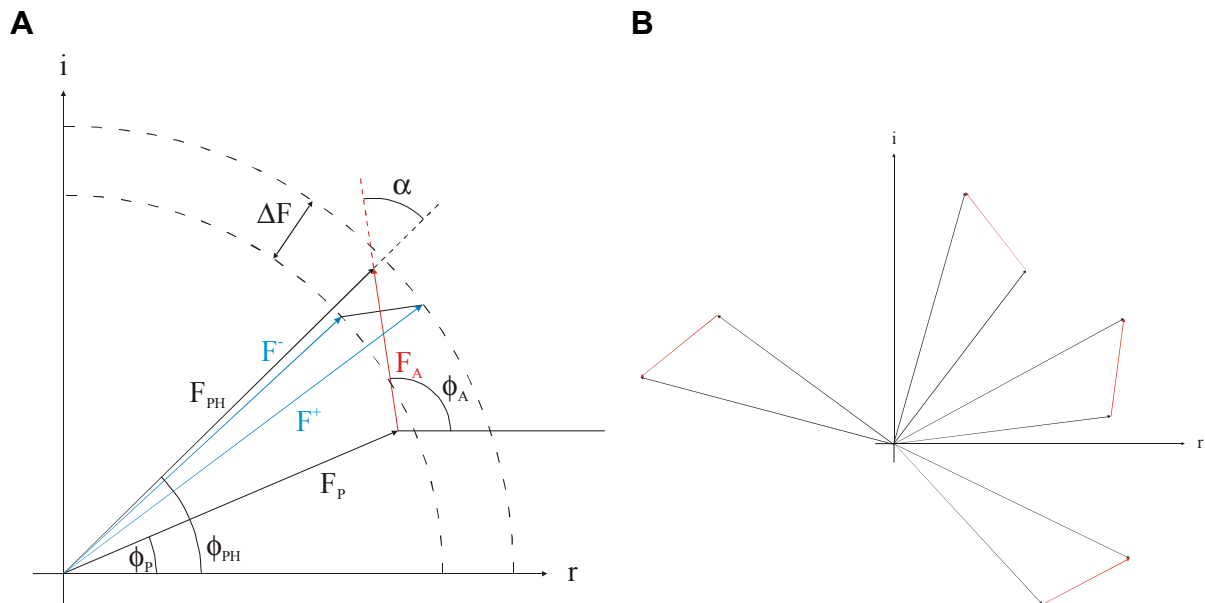
Streufaktors  $f_0$  parallel ist. Weiterhin kann ein Photon absorbiert und zeitlich verzögert, also mit einer Verschiebung der Phase relativ zu  $f$ , re-emittiert werden. Die Wahrscheinlichkeit dieses Effektes ist proportional zu  $f''$ , der Phasenunterschied ist dabei immer positiv. Für den Gesamtstreufaktor  $f$  gilt dann:

$$f = f_0 + f'(\lambda) + if''(\lambda) \quad (2.4)$$

Die Phasenverschiebung bezüglich  $f''$  hat zur Folge, dass die Friedelpaare  $F_{hkl}$  und  $F_{-h-k-l}$  für azentrische Reflexe nicht mehr exakt identisch sind und so statt des mittleren Strukturformfaktors  $F_{PH}$  die Amplituden für  $F_{PH}^+$  und  $F_{PH}^-$  (im Folgenden mit  $F^+$  und  $F^-$  abgekürzt) getrennt erfasst werden können. Analog den isomorphen Differenzen lassen sich daraus dann  $\Delta F_{anom}$ -Werte generieren, mit deren Hilfe eine Lösung der Schweratomsstruktur möglich ist. Da die zu messenden Differenzen in  $F^+$  und  $F^-$  in der Regel überaus gering sind, ist es notwendig, sehr präzise Daten, z.B. mittels einer hohen Redundanz, zu messen, um korrekte  $\Delta F$ -Werte berechnen zu können.

### 2.2.1.3 Substrukturlösung und Phasenberechnung mit SIRAS

In einem SIRAS-Experiment werden die zuvor beschriebenen Methoden der isomorphen und anomalen Differenzen zur Lösung unbekannter Strukturen miteinander kombiniert. Aus den Reflexintensitäten lassen sich dementsprechend die Amplituden für  $F^+$ ,  $F^-$ ,  $F_P$  und  $F_{PH}$  direkt berechnen. Bei Kenntnis der Wellenlänge und des anomal streuenden Elementes sind ferner die Werte für  $f'$  und  $f''$  bekannt, so dass mit Hilfe einer Harker-Konstruktion die Amplituden für  $F_A$  und der Winkel  $\alpha$  berechnet werden können. Wie Abbildung 2.2:A zeigt, beschreibt  $\alpha$  dabei die Differenz zwischen den Phasen der Schweratome  $\phi_A$  und denen des Proteins  $\phi_{PH}$  (inkl. der Schweratome). Der Wert für  $\alpha$  ist in einem SAD Experiment auf die Werte 90 und 270° und für SIR auf 0 und 180° beschränkt, unterliegt im Falle von MAD oder SIRAS aber keinen Restriktionen. Die  $|F_A|$ -Werte entsprechen letztlich den Strukturformfaktoramplituden der anomalen Streuer ohne anomalen Beitrag.



**Abb. 2.2:** **A:** Harker-Konstruktion der aus einem SIRAS Experiment ableitbaren Strukturfaktoren.  $\alpha$  beschreibt die Differenz zwischen den Phasen der Schweratomsstruktur und des nativen Proteins inklusive dieser Schweratome. **B:** Schematisierte Darstellung der aus den Intensitäten allein nicht ableitbaren Phasenwinkel der ermittelbaren Strukturfaktoren.

Die Berechnung der  $|F_A|$ -Werte und der Phasendifferenzen  $\alpha$  kann in einem SIRAS Experiment für den Benutzer unkompliziert mit dem Programm XPREP (Sheldrick 1997) aus nicht gemittelten Datensätzen der nativen Struktur sowie eines Schweratomderivats durchgeführt werden. Allein aus diesen Daten lässt sich also das Dreieck mit den Kanten  $F_{PH}$ ,  $F_P$  und  $F_A$  eindeutig berechnen, nicht aber dessen Orientierung im Koordinatensystem und damit auch noch nicht die zur Lösung der Struktur essentielle Phaseninformation  $\phi_{PH}$  bzw.  $\phi_P$  (Abb 2.2:B).  $\phi_{PH}$  ist aber zugänglich, wenn die Positionen der Schweratome und somit  $\phi_A$  bekannt sind und auch  $\phi_P$  lässt sich dann analog berechnen.

$$\phi_{PH} = \phi_A - \alpha \quad (2.5)$$

Die Lösung der Schweratomsstruktur aus den berechneten  $|F_A|$ -Werten kann im Anschluss mit dem Programm SHELXD (Usón & Sheldrick 1999) erfolgen. Da die in dem Programm verwendete Methode des *dual space recycling* auf den stärksten Strukturfaktoren basiert, werden die  $|F_A|$ -Werte zunächst in normalisierte Strukturfaktoren  $E$  umgewandelt, so dass sie der Annahme von Punktatomen besser entsprechen. Dabei werden die Effekte der Thermalbewegung und der sphärischen Elektronendichteverteilung um den Atomkern entfernt, die ansonsten zu einer Abnahme der Strukturfaktoramplituden bei höherer Auflösung führen.

$$E^2 = \frac{F^2 / \varepsilon}{\langle F^2 / \varepsilon \rangle} \quad (2.6)$$

- E : normalisierter Strukturfaktor      F : Strukturfaktor  
 ε : statistischer Faktor (für die meisten Reflexe 1)  
 $\langle F^2 / \varepsilon \rangle$  : mittlerer Strukturfaktor in einer Auflösungsschale

SHELXD generiert zunächst einen Satz von Startatomen, die entweder zufällig in der Zelle verteilt sind oder mit der *Patterson minimum function* lokalisiert werden konnten. Letzteres führt in der Regel zu vollständigeren und präziseren Lösungen, die zudem schneller gefunden werden. Aus diesen Atompositionen werden dann per Fouriertransformation Phasen berechnet und bezüglich ihrer Zuverlässigkeit beurteilt. Ungefähr die schlechtesten 60% der Phasen werden verworfen und mit Hilfe der Tangens-Formel aus den verbliebenen Daten regeneriert. Nach einer Rücktransformation in den reellen Raum können im Anschluss starke *constraints* auf die Parameter angewendet werden, indem den höchsten Maxima der Elektronendichte wiederum Atompositionen zugewiesen werden. Dies erlaubt die einfache Eliminierung chemisch nicht sinnvoller Atomlagen (z.B. aufgrund zu geringer Distanzen zwischen den Atomen) und kann als eine extreme Form der Dichtemodifikation betrachtet werden. Im nächsten Schritt werden dann von N zugewiesenen *peaks* (N: Anzahl der gesuchten Atome) 30% zufällig ausgewählt und gelöscht, was im Prinzip der Berechnung einer *omit map* während einer Strukturverfeinerung entspricht. Auf diese Weise lassen sich falsch zugewiesene Atompositionen eliminieren, während irrtümlicherweise gelöschte Atome im nächsten Zyklus erneut auftreten. Die Information aus den verbliebenen Atomen wird dann erneut per Fouriertransformation in den reziproken Raum überführt und dort verfeinert. Dieses iterative Verfahren wird im Regelfall 2N mal wiederholt. Abschließend erlaubt die aktuelle Version des Programms die Verfeinerung der Besetzungsfaktoren der gefundenen Atome. Damit kann einerseits einer nur teilweisen Besetzung der Schweratomlagen Rechnung getragen werden, gleichzeitig lässt sich daran aber auch feststellen, ob möglicherweise mehr als eine Sorte von Schweratomen vorhanden ist. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendete Version von SHELXD bot jedoch noch nicht diese Option.

Das Programm liefert schließlich für jeden Lösungsversuch eine Liste der gefundenen Atompositionen in Fraktionalkoordinaten und dazu gehörige Gütekriterien, anhand derer sich

abschätzen lässt, ob die Lösung korrekt ist. Das zuverlässigste Kriterium zur Beurteilung der Lösungen ist der Korrelationskoeffizient  $CC$  zwischen beobachteten und berechneten normalisierten Struktur Faktoren ( $E_o$  und  $E_c$ ). Eine Substruktur ist in der Regel korrekt, wenn sich Korrelationskoeffizienten mit Werten von 35% oder mehr deutlich von niedrigeren Werten absetzen.

$$CC = 100 \frac{(\sum w E_o E_c \sum w - \sum w E_o \sum w E_c)}{\left\{ \left[ \sum w E_o^2 \sum w - (\sum w E_o^2) \right] \left[ \sum w E_c^2 \sum w - (\sum w E_c^2) \right] \right\}^{1/2}} \quad (2.7)$$

Die aus der *Patterson superposition function* berechnete Kreuzwortabelle erlaubt die Unterscheidung einzelner korrekter und falscher Atomlagen der Substruktur. Während die Werte der *Patterson minimum function* für korrekte Schweratompositionen durchweg positiv sein sollten, treten im Falle falscher Lösungen vermehrt Werte  $\leq 0$  auf. Liegen in der asymmetrischen Einheit zwei oder mehr unabhängige Moleküle vor, so ist es zudem möglich, aus den Vektoren zwischen den einzelnen Atomen die nicht-kristallographische Symmetrie abzuleiten (vergl. Kap. 3.7.2.5.1).

Mit einer *Fast Fourier Transformation* können die gefundenen Schweratompositionen schließlich in Struktur Faktoren und Phasen umgerechnet werden, aus denen sich entsprechend der beschriebenen Harker-Konstruktion (Abb. 2.2) dann eine erste experimentelle Elektronendichte für das jeweilige Protein berechnen lässt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Chiralität der Substruktur aus den  $\Delta F$  bzw.  $F_A$ -Werten nicht bestimmt werden kann, so dass beide Händigkeiten der Substruktur zur Berechnung der Elektronendichte eingesetzt werden müssen.

#### 2.2.1.4 *Molecular Replacement*

Die Methode des molekularen Ersatzes geht davon aus, dass ein ungefähres Modell der zu lösenden Proteinstruktur vorhanden ist. Dabei kann es sich entweder um das identische Molekül handeln, das zuvor bereits in einer anderen Kristallmodifikation bestimmt wurde, oder um eine Proteinstruktur, von der man annimmt, dass sie eine ähnliche dreidimensionale Konformation aufweist wie die zu bestimmende Struktur. Letzteres ist häufig bei homologen Proteinen aus unterschiedlichen Organismen der Fall und lässt sich anhand eines Vergleiches der jeweiligen Peptidsequenzen abschätzen (*sequence alignment*, vergl. Kap. *Kristallisation*). Durch die stetige Zunahme bekannter Proteinstrukturen und damit auch potentieller

Suchmodelle hat diese Methode in den vergangenen Jahren kontinuierlich an Bedeutung gewonnen. Ein entscheidender Vorteil dieser Technik liegt darin, dass zur Lösung der Struktur lediglich ein nativer Datensatz ohne hohe Redundanz benötigt wird, während die Strukturlösung mit MAD, SIR, SAD und ähnlichen Methoden entweder mehrere Datensätze oder aber sehr hohe Redundanz und außergewöhnlich präzise Daten erfordert.

Der Gedanke, die räumliche Struktur bekannter Proteine für die Lösung neuer Röntgenstrukturen zu nutzen, wurde 1962 von Rossmann und Blow (Rossmann & Blow 1962) veröffentlicht und fand seine erste Anwendung in der Lösung des Insulins (Dodson *et al.* 1966). Bei dieser Methode werden prinzipiell die Atomkoordinaten eines bekannten Moleküls so transformiert, dass sie sich mit denen der gesuchten Struktur möglichst exakt überschneiden. Diese Transformation kann durch sechs Variablen beschrieben werden, von denen drei einer Rotationsmatrix und drei einem Translationsvektor entsprechen.

$$x' = [R]x + t \quad (2.8)$$

$x'$	:	transformierte Koordinaten	$x$	:	ursprüngliche Koordinaten
$[R]$	:	Rotationsmatrix	$t$	:	Translationsvektor

Da die gleichzeitige Berechnung aller Variablen in einer sechs-dimensionalen Suche mit einem enormen Rechenaufwand verbunden ist, wird das Problem normalerweise in zwei aufeinander folgende, dreidimensionale Suchen aufgeteilt, die Rotations- und die Translationssuche. Zur Bestimmung beider Komponenten bedient man sich jeweils der Patterson-Funktion. Maxima in dieser Funktion können generell in zwei Kategorien unterteilt werden:

Jedes Molekül mit  $N$  Atomen erzeugt in der Patterson-Funktion  $N(N-1)$  Maxima, die den intramolekularen Vektoren (*self vectors*) entsprechen, also Abständen zwischen zwei Atomen innerhalb eines Moleküls. Da alle zu einem Molekül gehörenden Atompaare relativ nah zusammen liegen, befinden sich die aus ihnen resultierenden *peaks* der Patterson-Funktion entsprechend nah an deren Ursprung. Vektoren, die aus Abständen zweier Atome in unterschiedlichen, z.B. symmetrieverwandten Molekülen hervorgehen (*cross vectors*), zeigen gegenüber den *self vectors* im Mittel höhere Beträge und sind dementsprechend in der Patterson-Funktion weiter vom Ursprung entfernt.

## 2.2.1.4.1 Die Rotationsfunktion

Für zwei gleiche, jedoch unterschiedlich orientierte Moleküle ist die Verteilung der *self vectors* in der Patterson-Funktion, abgesehen von einer Rotationskomponente, identisch, für zwei strukturell verwandte Proteine zumindest ähnlich. Eine Superposition der Patterson-Funktion eines Suchmodells auf die des Kristalls wird also bei korrekter Orientierung in einer maximalen Überlappung der beiden Funktionen resultieren und lässt sich in folgender Gleichung ausdrücken:

$$R(C) = \int_V P_{cryst}(u)P_{mol}(Cu)du \quad (2.9)$$

- C : Matrix zur Rotation des Modells  
 $P_{cryst}(u)$  : Patterson-Funktion des Kristalls  
 $P_{mol}(Cu)$  : Patterson-Funktion des Modells nach Rotation um C  
 V : Integrationsvolumen

Die Gleichung kann in der Praxis durch Berechnung von  $R(C)$  für alle möglichen Werte der Rotationskomponente C gelöst werden. Dabei ist es notwendig einige Parameter entsprechend abzustimmen, um für unterschiedliche Moleküle eine korrekte Lösung zu erhalten. So muss die Genauigkeit, mit der die Patterson-Funktion berechnet wird, hinreichend groß gewählt werden. Werte zwischen  $\frac{1}{3}$  und  $\frac{1}{2}$  der Auflösung der verwendeten Daten liefern in der Regel gute Ergebnisse. Das Integrationsvolumen ist abhängig von der Größe des Suchmodells. Es sollte möglichst viele der *self vectors* einschließen, die *cross vectors* aber soweit möglich nicht in die Berechnungen einbeziehen. Für ein Modellmolekül mit der längsten Dimension L ergäbe sich so ein Integrationsvolumen von  $\frac{4}{3} L^3 \pi$ . Da in diesen Bereich aber bereits zahlreiche Kreuzvektoren fallen, empfehlen Driessen *et al.* (1991), für den Kugelradius lediglich 75 - 80% der längsten Ausdehnung des Suchmodells einzusetzen. Entscheidend für die Lösung kann auch der verwendete Auflösungsbereich der Daten sein. Er hängt maßgeblich davon ab, inwieweit sich das Suchmodell und die zu lösende Struktur ähneln. Da hierüber im Regelfall aber keine exakten Daten vorliegen, ist es sinnvoll, mehrere Werte für  $d_{min}$  auszuprobieren. Bewährt haben sich 3.5 - 4 Å.

Die Rotationsfunktion kann durch eine Fouriertransformation in den reziproken Raum übertragen werden. Nach Entfernung einer Konstanten lässt sie sich ausdrücken als

$$R(C) = \sum_p \sum_h F_{mol}(p)^2 F(h)^2 G_{h,h'} \quad (2.10)$$

- $F(h)$  : Fourierkoeffizienten des Kristalls  
 $F_{mol}(p)$  : Fourierkoeffizienten des Suchmodells nach Rotation um C  
 $G_{h,h'}$  : Interferenzfunktion, deren Größe von h, h' sowie dem Integrationsvolumen abhängt  
h, h' : unterschiedliche Ausdrücke für (hkl) Werte

Da die Funktion von großen Fourierkoeffizienten dominiert wird, ist es möglich, die Anzahl der für F(p) eingesetzten Werte zu reduzieren und so die Berechnung der Rotationsmatrix zu beschleunigen. Dieses Ziel verfolgt auch die von Crowther entwickelte Form der Rotationsfunktion (Crowther 1972), die die Rotation der Patterson-Funktion in einem polaren Koordinatensystem berechnet.

$$R(C) = \int P_{crist}(r, \theta, \varphi) R P_{mol}(r, \theta, \varphi) r^2 \sin \theta \, dr \, d\theta \, d\varphi \quad (2.11)$$

Mit Hilfe von Bessel-Funktionen lässt sich diese Form der Rotationsfunktion so erweitern, dass R(C) schließlich als Summation über zwei Terme erfasst werden kann, von denen einer von der Rotation unabhängig ist. Da der Rechenaufwand so gegenüber (2.10) und (2.11) erheblich reduziert werden kann, ist diese *fast-rotation function* in den meisten Programmen zur Strukturlösung mit *molecular replacement* Methoden bzw. zur Berechnung einer Selbstrotationsfunktion implementiert.

#### 2.2.1.4.2 Die Translationsfunktion

Nach der korrekten Orientierung eines Suchfragmentes in der asymmetrischen Einheit ist der nächste Schritt die Bestimmung der absoluten Koordinaten in der Einheitszelle mit Hilfe einer Translation. In der Raumgruppe P1 existiert dieses Problem nicht, da hier aufgrund fehlender Symmetrieeoperatoren die Wahl des Ursprungs beliebig ist und in Raumgruppen mit einer polaren Achse reduziert es sich auf die Bestimmung von zwei statt der zuvor beschriebenen drei Variablen. Prinzipiell existieren zwei Vorgehensweisen zur Bestimmung des Translationsvektors.

Die einfachste Methode besteht darin, das bekannte Molekül willkürlich durch die asymmetrische Einheit zu bewegen, für alle Positionen Strukturfaktoren  $|F_c|$  zu berechnen und diese mit den beobachteten Strukturfaktoren  $|F_o|$  zu vergleichen. Dieser Vergleich ist entweder über einen R-Faktor oder den Korrelationskoeffizienten zwischen den beobachteten und den berechneten Strukturfaktoren möglich.

$$R = \frac{\sum_{hkl} || F_o | -k | F_c ||}{\sum_{hkl} | F_o |} \quad (2.12)$$

$$CC = \frac{\sum_{hkl} (| F_o |^2 - \overline{| F_o |^2}) \times (| F_c |^2 - \overline{| F_c |^2})}{\left[ \sum_{hkl} (| F_o |^2 - \overline{| F_o |^2})^2 \sum_{hkl} (| F_c |^2 - \overline{| F_c |^2})^2 \right]^{1/2}} \quad (2.13)$$

- $F_o$  : beobachteter Strukturfaktor  
 $F_c$  : aus dem Suchmodell berechneter Strukturfaktor  
 $k$  : Skalierungsfaktor zur Anpassung der Intensitäten

Ein systematischeres Herangehen ermöglicht die Berechnung der Translationsfunktion aus der Korrelation zwischen den Kreuzvektoren einer Modellstruktur und der beobachteten Patterson-Funktion. Da diese *cross vectors* sich aus symmetrieverwandten Molekülen ableiten, ist es notwendig, für die Translationssuche die gesamte Symmetrie des Kristalls zu berücksichtigen. Die intramolekularen Patterson-Vektoren beeinflussen die Translationssuche dagegen nicht. Eine Möglichkeit der Berechnung, die auch in den meisten MR Programmen implementiert ist, haben Crowther und Blow (Crowther & Blow 1967) beschrieben.

$$T(t) = \int_V P_o(u) P_{12}(u, t) du \quad (2.14)$$

- $P_o$  : beobachtete Patterson-Funktion  
 $P_{12}$  : berechnete *cross vector* Patterson-Funktion  
 $t$  : Translationsvektor



Die Funktion  $T$  wird dabei nach Anwendung des Translationsvektors  $t$  durch Überlagerung der beiden Patterson-Funktionen maximiert. Gütekriterien lassen sich analog der willkürlichen Suche als R-Faktor und Korrelationskoeffizient berechnen.

#### 2.2.1.4.3 Sechsdimensionale Suche

Eine effiziente sechs-dimensionale Suche wurde erstmalig im Jahr 1998 mit dem Programm EPMR (Kissinger *et al.* 1999) allgemein veröffentlicht. Durch die Implementierung eines evolutionären Optimierungsalgorithmus gelang es, die Berechnungen gegenüber einer systematischen sechs-dimensionalen Suche um mehrere Größenordnungen zu beschleunigen. Gleichzeitig konnten einige Nachteile der Programme, die das MR Problem in zwei dreidimensionale Suchen unterteilen, umgangen bzw. reduziert werden. So wird beispielsweise das Signal-Rausch-Verhältnis in einer ‚klassischen‘ Rotationssuche reduziert, da nicht alle Patterson-Vektoren für die Superposition betrachtet werden, und die anschließende Translationssuche verhält sich sehr empfindlich gegenüber Fehlern bezüglich der zuvor bestimmten Orientierung des Suchmodells. EPMR dagegen optimiert gleichzeitig die Orientierung und die Positionierung des eingesetzten Modells unter Berücksichtigung aller Daten hinsichtlich des Korrelationskoeffizienten zwischen beobachteten und berechneten Strukturfaktoren (entsprechend Gleichung 2.13). Der dabei verwendete, iterative Algorithmus soll im folgenden kurz beschrieben werden.

1. Aus dem Suchfragment wird eine Population der Größe  $P$  zufälliger Orientierungen und Positionierungen generiert.
2. Für jede mögliche Lösung werden die Strukturfaktoren unter voller Berücksichtigung der kristallographischen Symmetrie berechnet. Dies geschieht für das eingesetzte Suchmodell mit Hilfe der *Fast Fourier Transformation*. Da diese Methode jedoch sehr rechen- und damit zeitintensiv ist und mehrere tausend Transformationen im Rahmen einer Strukturlösung notwendig sind, werden für die einzelnen Individuen lediglich die Phasenverschieben relativ zu der ursprünglichen Lage berechnet.
3. Die ‚Lösungen‘ werden entsprechend ihrer Korrelationskoeffizienten zwischen beobachteten und berechneten Strukturfaktoren  $|F_o|$  und  $|F_c|$  geordnet.
4. Nach einem ‚stochastischen Wettkampf‘ werden die überlebenden Individuen ausgewählt und unverändert in die folgende Generation übernommen, die Verlierer werden gelöscht.
5. Durch zufällige Veränderung der Überlebenden werden Nachkommen generiert, mit denen die Population auf ihre ursprüngliche Größe aufgestockt wird.

6. Das Verfahren wird für eine zuvor festgelegte Anzahl an Generationen  $G$  ab Punkt 2 wiederholt.
7. Nach der letzten Iteration wird die Lösung mit dem höchsten Korrelationskoeffizienten als starre Gruppe verfeinert.

Die gesamte Prozedur kann mit unterschiedlichen Startpopulationen beliebig oft wiederholt werden. Zur Lösung von Strukturen mit mehr als einem unabhängigen Molekül in der asymmetrischen Einheit ist es möglich, nach der obigen Methode zunächst ein Modell zu positionieren und anschließend weitere hinzuzufügen. Die bereits gefundenen Fragmente werden dann an ihren Positionen fixiert, fließen aber in die Berechnung der Strukturfaktoren ein.

Ab welchem Korrelationskoeffizienten angenommen werden kann, dass eine Struktur gelöst ist, hängt sehr von der Güte und Vollständigkeit des eingesetzten Suchmodells sowie der Größe der gesuchten Struktur ab. Wie in Kapitel 3.7.2.8 beschrieben, können mit einem sehr unvollständigen, dafür aber genauen Suchmodell korrekte Lösungen gefunden werden, deren Korrelationskoeffizienten weit unter den Standardwerten des Programms liegen (45% für zwei unabhängige Moleküle). In einem solchen Fall kann das wiederholte Auftreten identischer Rotations- und Translationskomponenten ein Indiz dafür sein, dass es sich bei der entsprechenden Orientierung und Positionierung des Suchmodells tatsächlich um eine korrekte Lösung handelt.

### 2.2.2 Dichtemodifikation

In den meisten Fällen ist die Qualität einer aus Schweratompositionen berechneten, experimentellen Elektronendichte nicht ausreichend, als dass aus ihr der Verlauf der Polypeptidkette eindeutig zu erkennen wäre. Dies ist einerseits auf Fehler in den geringen Differenzen der gemessenen Strukturfaktoren zurückzuführen, ergibt sich in einem SIR oder SAD-Experiment aber auch aus der Tatsache, dass den experimentellen Phasen kein eindeutiger Wert zugewiesen werden kann (Zweideutigkeit der Phasen, *phase ambiguity*). Hinzu kommt, dass die zur Lösung der Substruktur verwendeten Daten im Regelfall eine geringere Auflösung aufweisen als Daten aus einer nativen Messung, so dass in die Berechnung der ersten Elektronendichte nicht alle verfügbaren Informationen einfließen. In einem solchen Fall kann der eigentlichen Erstellung und Verfeinerung des Proteinmodells ein Prozess zur Verbesserung der experimentellen Phasen und somit der Elektronendichte

vorangestellt werden. Durch Ausnutzung relevanter Informationen über das jeweilige Protein sowie allgemeiner Prinzipien kann die Elektronendichte in einem iterativen Prozess oft signifikant verbessert werden, ohne dass ein Strukturmodell der jeweiligen Verbindung notwendig wäre.

### 2.2.2.1 *Solvent flattening* (Wang 1985)

In Kristallen makromolekularer Verbindungen existieren zwischen den einzelnen Molekülen große Bereiche (typischerweise 30 - 70% des Volumens der Elementarzelle), die mit ungeordneten Lösungsmittelmolekülen angefüllt sind und deren Elektronendichte dementsprechend gleichmäßig ist. Ist es möglich, diese Regionen in der Elektronendichte von Bereichen zu unterscheiden, die mit Protein besetzt sind, so können Maxima innerhalb der Lösungsmittelbereiche entfernt werden, indem die Elektronendichte für diese Region auf einen konstanten, niedrigen Wert gesetzt wird. Eine Einteilung der Elementarzelle in Lösungsmittel- und Proteinbereiche ist am präzisesten anhand der Standardabweichung der Elektronendichte möglich.

$$\bar{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum (\rho - \bar{\rho})^2}{n}} \quad (2.15)$$

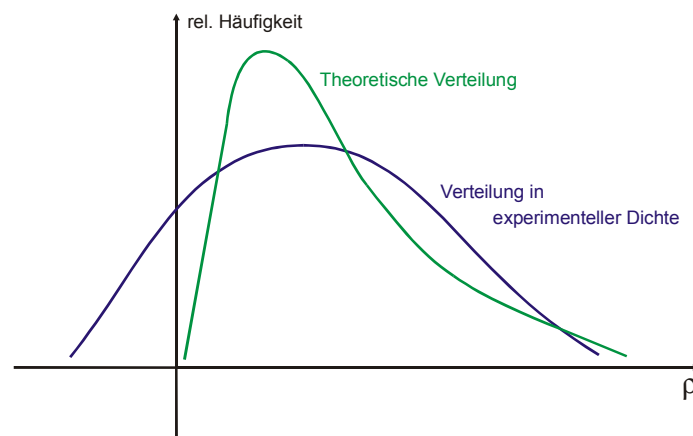
- $\bar{\sigma}$  : Standardabweichung der Elektronendichte innerhalb einer betrachteten Sphäre
- $\rho$  : Elektronendichte am Gitterpunkt
- $\bar{\rho}$  : mittlere Elektronendichte in der jeweiligen Sphäre
- n : Anzahl der Gitterpunkte in der jeweiligen Sphäre

Dazu wird ein Gitter über die asymmetrische Einheit gelegt und für jeden Gitterpunkt die Standardabweichung der Elektronendichte innerhalb einer Sphäre mit einem Radius  $r \sim 3\text{Å}$  um diesen Punkt berechnet. Innerhalb der Proteinregion variiert die Elektronendichte wesentlich stärker als in Bereichen des Lösungsmittels, so dass die Standardabweichung demgemäß größer sein sollte. Die Werte der Standardabweichungen können dann nach ihrer Höhe sortiert und der dem Lösungsmittelanteil entsprechende Prozentsatz mit den niedrigsten Standardabweichungen als zum Lösungsmittel zugehörig klassifiziert werden. Zusätzlich können im Anschluss noch kleinere ‚Inseln‘ entfernt und Hohlräume gefüllt werden.

Der Elektronendichte der Lösungsmittelregion wird nun ein konstanter, niedriger Wert zugewiesen und aus der modifizierten Dichte werden neue Phasenwinkel  $\phi_c$  berechnet. Eine genauere Beschreibung des Ablaufs der iterativen Dichtemodifikation findet sich in Kapitel 2.2.2.3 in Zusammenhang mit nicht-kristallographischer Symmetrie.

### 2.2.2.2 Histogram Matching

*Histogram matching* wird als eine Methode der Dichtemodifikation für gewöhnlich mit *solvent flattening* kombiniert, behandelt aber nicht die Elektronendichte als Ganzes, sondern betrachtet die Häufigkeitsverteilung einzelner Werte innerhalb der Elektronendichte. Systematische Untersuchungen an makromolekularen Röntgenstrukturen haben gezeigt, dass diese Häufigkeitsverteilung bei einer gegebenen Auflösung und ähnlichem Lösungsmittelgehalt weitgehend unabhängig von dem betrachteten Protein ist, wohingegen Elektronendichten schlechter Qualität eine davon deutlich verschiedene Verteilung aufweisen (vergl. Abb. 2.3). Lunin konnte 1988 zeigen, dass durch eine Anpassung der experimentellen Werte an diese theoretische Verteilung eine deutliche Verbesserung schlechter Elektronendichtekarten im Verlauf einer Strukturlösung erreicht werden kann (Lunin 1988). Dazu wird die Elektronendichte  $\rho$  für alle Punkte eines Gitters berechnet, nach ihrer Höhe sortiert und die einzelnen Werte mit den ihnen äquivalenten Werten aus der Standardverteilung ersetzt. Aus dieser verbesserten Elektronendichte können im Anschluss wiederum neue Phasen  $\phi_c$  berechnet und mit den bekannten Phasen  $\phi_0$  kombiniert werden.



**Abb. 2.3:** Theoretische (grün) und experimentelle (blau) Verteilung der Häufigkeiten einzelner Werte in der Elektronendichte einer typischen Proteinstruktur.

Zhang *et al.* haben 1997 an einem konkreten Beispiel gezeigt, dass *histogram matching* in Kombination mit anderen Dichtemodifikationstechniken insbesondere in der Erweiterung der Phasen zu höherer Auflösung hilfreich sein kann. *Solvent flattening* und die Ausnutzung

nicht-kristallographischer Symmetrie allein tragen dagegen vor allem zu einer Verbesserung der Phasen bei niedriger Auflösung bei (Zhang *et al.* 1997). Neuere Implementationen dieser Technik bewirken jedoch auch eine deutliche Verbesserung der erzielten Ergebnisse, wenn keine Phasenerweiterung durchgeführt wird (Cowtan 1994).

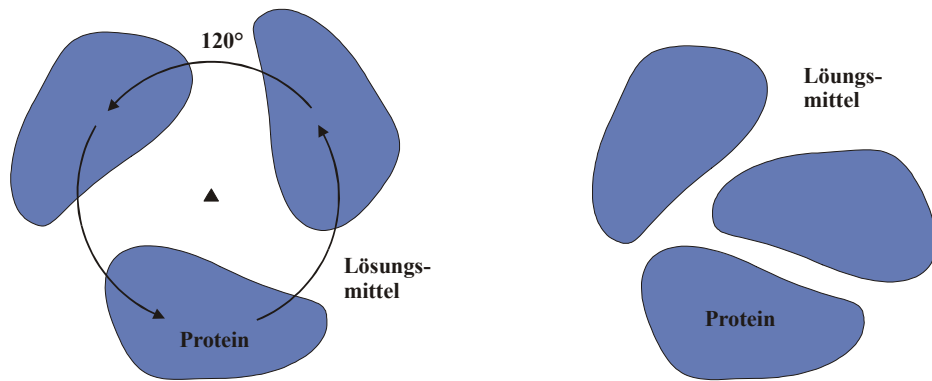
### 2.2.2.3 Mittelung über nicht-kristallographische Symmetrie (NCS)

Nicht-kristallographische Symmetrie beschreibt die Existenz mehrerer unabhängiger Kopien eines Objektes in der asymmetrischen Einheit bzw. in unterschiedlichen Kristallmodifikationen. Durch Ausnutzung dieser Redundanz ist es möglich, das Signal-Rausch-Verhältnis der Elektronendichte um den Faktor  $N^{1/2}$  zu erhöhen und so deren Interpretierbarkeit bzw. Präzision entscheidend zu verbessern.  $N$  entspricht dabei der Anzahl der unabhängigen Kopien eines Moleküls oder generell eines Objektes. Nicht-kristallographische Symmetrie ist im Gegensatz zu kristallographischer Symmetrie lokal beschränkt und bezieht sich dementsprechend nur auf einen bestimmten Satz von Objekten und ein zu definierendes Volumen innerhalb der kristallographischen Einheitszelle (Vellieux & Reed 1997, Drenth 1994, McRee 1993, Zhang, K.Y.J. *et al.* 2001).

Generell existieren zwei Arten von NCS, die einzeln aber auch nebeneinander in einer asymmetrischen Einheit auftreten können: Im Falle von geschlossener Symmetrie (*proper symmetry*) bildet die Gesamtheit der NCS-Operatoren eine geschlossene Gruppe, die einer der Punktgruppen entspricht. Für eine  $n$ -zählige Achse sind dann entsprechend die Operatoren, die Objekt 1 auf Objekt 2, Objekt  $i$  auf Objekt  $i + 1$  und Objekt  $n$  wieder auf Objekt 1 abbilden, identisch. Liegt dagegen eine offene Symmetrie (*improper symmetry*) vor, so unterscheiden sich die einzelnen NCS-Operatoren voneinander und die äquivalenten Objekte bilden keine Punktgruppe. Der beschriebene Sachverhalt ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt.

Die Existenz mehrerer Kopien eines Monomers bedeutet zwangsläufig, dass die Elektronendichte in den entsprechenden Bereichen prinzipiell identisch ist und führt zu *constraints* bezüglich der Proteinstrukturfaktoren und damit auch der Phasenwinkel. Aufgrund von Fehlern in den gemessenen Intensitäten sowie ungenau bestimmten (experimentellen) Phasen sind diese Einschränkungen insbesondere zu Beginn einer Strukturbestimmung jedoch nur unzureichend erfüllt. In einem iterativen Verfahren kann die Elektronendichte jedoch so modifiziert werden, dass sie den Restriktionen der nicht-kristallographischen Symmetrie in

weiterem Maße entspricht und ein klareres Bild der untersuchten Struktur zeigt. Als Voraussetzung müssen die Operatoren bekannt sein, die die einzelnen Moleküle aufeinander abbilden sowie eine Maske, die die Form eines der Monomere beschreibt.



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung von geschlossener (*proper*) und offener (*improper*) NCS; in beiden Fällen liegt 3-fache NCS vor; **A:** *proper* NCS, die Moleküle gehorchen der Punktgruppe  $C_3$  **B:** *improper* NCS, es wird keine Punktgruppe gebildet.

Die NCS-Operatoren lassen sich aus den Lagen von Schweratomen einer Substruktur berechnen, die zuvor mit SAD, SIR oder einer ähnlichen Technik gelöst wurde. Ebenso ist es möglich, *molecular replacement* Lösungen oder sogar direkt Elektronendichte als Eingabe zu nutzen. Die Operatoren zur Abbildung zweier Kopien aufeinander gliedern sich grundsätzlich in eine Rotations- und eine Translationskomponente, von denen sich erstere in einer Matrixnotation, in polaren oder in Euler'schen Koordinaten ausdrücken lässt.

$$x_n = [R_n]x_1 + t_n \quad (2.16)$$

$x_n$	:	transformierte Koordinaten	$x_1$	:	ursprüngliche Koordinaten
$[R_n]$	:	Rotationsmatrix	$t_n$	:	Translationsvektor

Liegt bereits ein (noch ungenaues) Proteinmodell vor, so kann dieses zur Berechnung der Maske verwendet werden. In der Mehrzahl der Fälle existieren jedoch nur die Koordinaten einer Substruktur, so dass über die konkrete Ausdehnung des eigentlichen Proteins wenig bekannt ist. In diesem Fall können um alle Atome Kugeln mit einem großen Radius (z.B. 25 Å, je nach erwarteter Größe des Proteins und Anzahl der Schweratome) definiert werden, die dann zu einer vorläufigen Proteinhülle verschmolzen werden. Diese Vorgehensweise hat

den Nachteil, dass die erhaltene Maske sehr grob ist und die tatsächliche Ausdehnung des eigentlichen Proteins nur unzureichend beschreibt. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die gefundenen Schweratome auf der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind. Eine bessere Möglichkeit ist meist die Berechnung einer ersten Elektronendichte aus den Schweratompositionen und den nativen Daten, in der sich unter Umständen Bereiche, in denen Protein vorliegt, und Regionen, die mit Lösungsmittel gefüllt sind, unterscheiden lassen. Eine Maske lässt sich dann direkt aus der vorliegenden Elektronendichte generieren und kann - falls notwendig - mit Hilfe eines Grafikprogramms manuell nachbearbeitet werden. Um das Überlappen symmetrieverwandter Masken zu verhindern, ist die Kenntnis und Berücksichtigung der nicht-kristallographischen sowie der kristallographischen Symmetrieeoperatoren während der Erstellung der Maske hilfreich. Ein Algorithmus zur Bestimmung der Maske aus den existierenden Strukturparametern und Phasenwinkeln ist beispielsweise in dem Programm DM (Cowtan 1994) implementiert.

Zur Verbesserung einer experimentellen Elektronendichte kann nicht-kristallographische Symmetrie besonders effektiv mit Methoden der Dichtemodifikation wie *solvent flattening* und der Erweiterung der Phasen zu höherer Auflösung kombiniert werden. Dabei werden die folgenden Schritte nacheinander durchgeführt und wiederholt, bis sämtliche gemessenen Reflexe in die Berechnungen einbezogen sind oder, falls keine Phasenerweiterung durchgeführt wird, bis sich die berechneten Gütekriterien nicht weiter verbessern lassen.

1. Berechnung der Elektronendichte aus den gemessenen Intensitäten und den momentan „besten“ Phasen per *FFT*
2. Reduktion der Elektronendichte auf die asymmetrische Einheit
3. evtl. Verfeinerung der NCS Operatoren sowie der NCS Maske
4. Mittelung der Elektronendichte innerhalb der durch die NCS äquivalenten Masken, *solvent flattening, histogram matching*
5. Expansion der Elektronendichte auf die Einheitszelle
6. Berechnung von  $F_c$ -Werten aus der gemittelten Dichte per *FFT*
7. Skalierung von  $|F_c|$  gegen  $|F_o|$ , daraus Berechnung von Gütekriterien und Gewichten
8. Erweiterung der Auflösung
9. Kombination der Phaseninformation aus  $\varphi_c$  und  $\varphi_o$  mit Hilfe der Hendrickson-Lattman-Koeffizienten

Dieser Ablauf ist so bzw. in ähnlicher Form in den Programmen SOLOMON (Abrahams & Leslie 1996) oder DM (Cowtan 1994) implementiert, und dort über Skripte und seit kurzem auch über eine graphische Benutzerschnittstelle in einfacher Weise zugänglich.

### 2.2.3 Strukturverfeinerung

Könnte aus der Strukturlösung ein erstes grobes Modell des untersuchten Proteins erhalten werden, so dient der Prozess der Strukturverfeinerung dazu, die Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den aus dem Modell berechneten Daten zu maximieren. Dazu wird das aktuelle Modell iterativ der Elektronendichte angepasst, die sich aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden und den Phasen dieses Modells berechnet, und daraufhin gegen die gemessenen Strukturfaktoramplituden bzw. Intensitäten verfeinert. Die Verfeinerung des Modells geschieht dabei durch Variation der Positions- und der Auslenkungsparameter aller (Nicht-Wasserstoff-) Atome der jeweiligen Struktur. Die Anpassung der Parameter erfolgt über die Minimierung bzw. Maximierung einer zuvor zu definierenden Zielfunktion. Im Falle eines *least squares targets* werden die gemessenen Daten als unveränderlich angesehen und die Parameter so variiert, dass die aus ihnen berechneten Daten möglichst gut mit den gemessenen Werten übereinstimmen.

$$M = \sum [w(F_o^2 - F_c^2)] + \sum \left[ \frac{1}{\sigma^2} (y_t - y)^2 \right] \quad (2.17)$$

Dieses Verfahren eignet sich gut für die Verfeinerung nahezu vollständiger Modelle bei einer Auflösung von etwa 2 Å oder besser, reagiert jedoch sensibel auf große Fehler in den gemessenen Daten und inkorrekte Startmodelle bei niedriger Auflösung. In der *maximum likelihood* Zielfunktion wird dagegen durch Veränderung der Parameter des Modells die Wahrscheinlichkeit maximiert, dass mit dem gegebenen Modell die gemessenen Daten tatsächlich beobachtet würden.

$$L = \prod_i P_a(F_i; F_{i,c}) \quad (2.18)$$

Zur Minimierung der Zielfunktionen finden derzeit vor allem zwei Algorithmen Anwendung in der Verfeinerung makromolekularer Strukturen. Während der *conjugate gradient* Algorithmus sich vor allem bei mittlerer und hoher Auflösung zur Anpassung



individueller Parameter eignet, stellt *simulated annealing* (insbesondere in Kombination mit *torsion angle dynamics*) eine robuste Möglichkeit dar, bei niedriger Auflösung grobe Fehler aus einem Modell zu eliminieren, das beispielsweise aus einer Strukturlösung mit *molecular replacement* stammt.

Für die Beschreibung eines isotropen Proteinmodells mit individuellen B-Faktoren sind vier (xyz, B), im Falle eines anisotropen Modells neun Parameter je Atom notwendig. Da bei einer für Proteine typischen Auflösung von 2.0 Å, das Verhältnis der gemessenen Daten zu den zu bestimmenden Parametern nur bei ungefähr zwei liegt, ist das der Verfeinerung zu Grunde liegende Gleichungssystem nur noch knapp über-, bzw. bei geringerer Auflösung sogar unterbestimmt. Zur Stabilisierung der Verfeinerung können in diesem Fall zusätzliche stereochemische Informationen in Form von *restraints* in die Verfeinerung einbezogen werden, bzw. die Anzahl der Parameter durch Einsatz spezifischer *constraints* verringert werden.

Als Index für die Übereinstimmung der Daten mit den Parametern des Modells wird ein Residual-Wert berechnet, der definiert ist als

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_o| - k|F_c| \right|}{\sum_{hkl} |F_o|} \quad (2.19)$$

Um eine Überinterpretation der gemessenen Daten bei niedrigem Daten-Parameter-Verhältnis zu verhindern, wird als zusätzliches Gütekriterium der freie R-Wert  $R_{\text{free}}$  eingeführt (Brünger 1992). Dafür wird ein Teil der gemessenen Daten (in der Regel 5%) nicht in die Verfeinerung der Parameter und Berechnung der Elektronendichte einbezogen, sondern ausschließlich zur Ermittlung des freien Residual-Wertes verwendet. Während ein *overfitting* des Modells zu einem Absinken des  $R_{\text{work}}$  führt, steigt  $R_{\text{free}}$  in den entsprechenden Verfeinerungszyklen an oder bleibt zumindest unverändert, da die verfeinerten Parameter von den für  $R_{\text{free}}$  markierten Reflexen gänzlich unabhängig sind.

Erlaubt die gemessene Auflösung nicht die Verfeinerung individueller anisotroper Auslenkungsparameter, so kann für Gruppen von Atomen ein TLS-Modell verfeinert werden, das die anisotrope Translation, Libration und Schraubenbewegung der jeweiligen Atome als

---

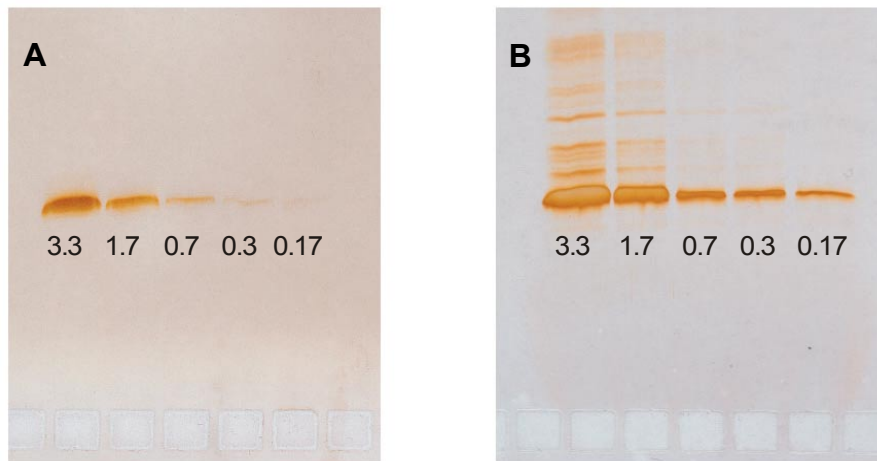
starre Gruppe beschreibt (Winn *et al.* 2001). Dieses Modell lässt sich mit lediglich 20 zusätzlichen Parametern je TLS-Gruppe berechnen und kann vor allem dann zu einer deutlichen Verbesserung der Verfeinerungsstatistiken sowie der Elektronendichte führen, wenn sich größere, pseudo-starre Gruppen innerhalb eines Moleküls relativ zueinander bewegen oder ganze Moleküle vergleichsweise beweglich im Kristallgitter angeordnet sind. Die Auslenkungsparameter  $U$  werden dabei in die einzelnen Beiträge  $U_{\text{TLS}}$  und  $U_{\text{Atom}}$  aufgeschlüsselt. Molekülinterne Bewegungen, z.B. Librationen um bestimmte Torsionswinkel, bleiben unberücksichtigt. Problematisch ist in diesem Zusammenhang, dass  $U_{\text{TLS}}$  und  $U_{\text{Atom}}$  miteinander korreliert sind, so dass es sich empfiehlt, die individuellen Auslenkungsparameter während der Bestimmung der TLS-Parameter konstant zu halten.

## 3 Experimentelles

### 3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der AmyA

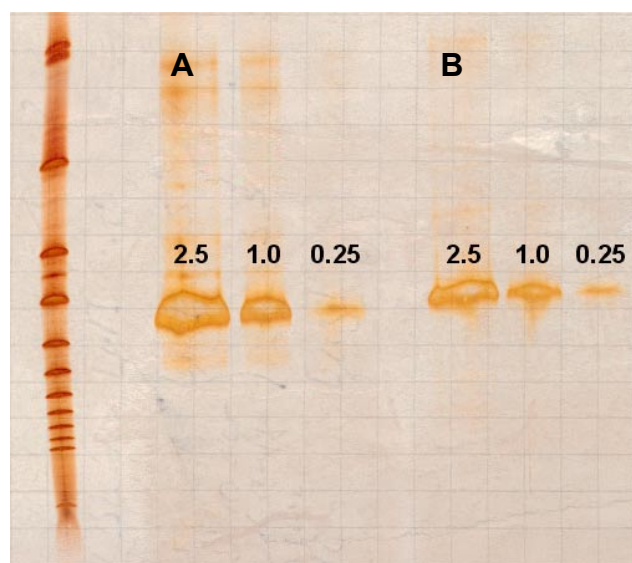
Die Charakterisierung aller Proben der *T. maritima*  $\alpha$ -Amylase A bezüglich ihrer Reinheit wurde mit Hilfe einer *silver stained* SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde das Protein mit einem Überschuss von Natriumdodecylsulfat und einem Zusatz von Dithiothreitol für 10 min auf ca. 95°C erhitzt. Sämtliche Auftrennungen wurden in einer Gelelektrophoresekammer vom Typ GenePhor bei 10°C durchgeführt. Als Gele wurden ausschließlich ExcelGel™ SDS Homogenous 15 der Größe 250 x 110 mm eingesetzt, die zur Einpassung in die Kammer in der Laufrichtung halbiert wurden. Die Übertragung der angelegten Spannung von 300V erfolgte mit Excel Gel™ SDS Buffer Strips, die anschließende Entwicklung der Gelplatten in einem Hoefer *Automated Gel Stainer* nach einem vordefinierten *Silver Staining Protocol for Proteins* (Nachweisgrenze ~0.02 µg Protein). Sämtliche verwendeten Geräte und Materialien wurden, soweit zuvor nicht anders angegeben, von der Firma Pharmacia Biotech bezogen.

Die Abbildungen 3.1:A und 3.1:B dokumentieren die außergewöhnlich hohe Reinheit der erhaltenen Proteinproben der AmyA' sowie der AmyA''. Sind bei starker Überladung des Gels im Falle der AmyA'' noch Abbauprodukte bzw. Verunreinigungen niedrigeren Molekulargewichts zu erkennen, so deuten die Bahnen geringerer Konzentration auf eine Reinheit von mehr als 95% hin. Im Falle der AmyA' (Abb. 3.1:A) sind selbst bei hoher Überladung des Gels (3.3 µg Protein/Bahn) keine Abbauprodukte erkennbar. Die im Vergleich zu der AmyA'' bei identischer Konzentration weniger intensive Färbung des Gels deutet aber darauf hin, dass dies nicht auf eine nochmals erhöhte Reinheit des Proteins, sondern eine generell schwächere Anfärbung zurückzuführen ist.



**Abb. 3.1:** Silver stained SDS-PAGE von Proben der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A. **A:** AmyA' (535 AS), **B:** AmyA'' (505 AS) Die Werte geben die absoluten Massen der aufgetragenen Proteinproben in den jeweiligen Bahnen in  $\mu\text{g}$  an. Da die Gele unabhängig voneinander angefertigt wurden, sind die Laufhöhen der Proteine sowie die Intensitäten der Färbungen nicht direkt miteinander vergleichbar.

Da die Kristallisation der 535 Aminosäuren umfassenden AmyA' keine für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristalle ergeben sollte (vergl. Kapitel 3.3.3.1), wurde die um 30 N-terminale Aminosäuren verkürzte AmyA'' exprimiert und aufgereinigt. Als Nachweis dieser gentechnischen Modifikation des Proteins wurde ein vergleichendes SDS Polyacrylamidgel angefertigt. Abbildung 3.2 zeigt trotz der vergleichsweise unscharfen Auftrennung eindeutig, dass AmyA'' eine signifikant geringere Masse aufweist als AmyA'. Die theoretische Massendifferenz zwischen den beiden Amylase-Varianten beträgt 3.169 kDa (AmyA': 62.656 kDa, AmyA'': 59.487 kDa), ist aus diesem SDS-Polyacrylamidgel wie erwartet aber nicht abzuleiten.

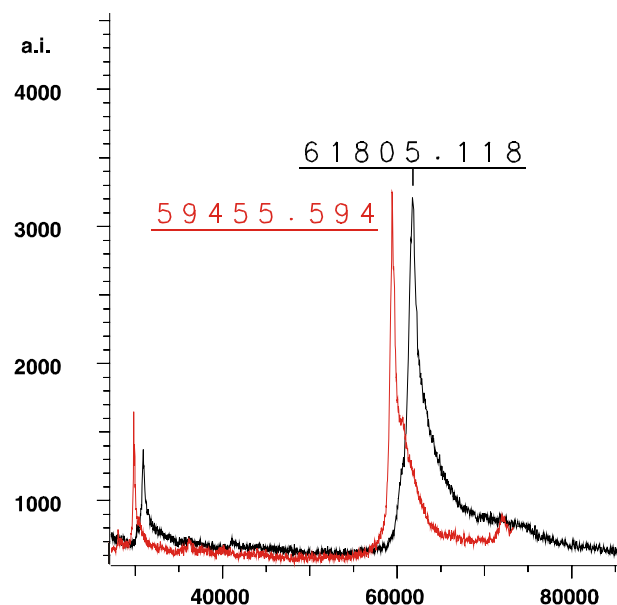


**Abb. 3.2:** Vergleichende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der zur Kristallisation eingesetzten Amylasevarianten. **A:** AmyA', 62.6 kDa, **B:** AmyA'', 59.5 kDa

### 3.2 Matrix-unterstützte Laser-Desorptions / Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-ToF-MS) von AmyA' und AmyA''

Zur Bestimmung der molekularen Massen der beiden Konstrukte AmyA' und AmyA'' (siehe Kap. *Kristallisation*) diente als Matrix Sinapinsäure, gesättigt in einer 30%igen, wässrigen Acetonitril-Lösung, die zusätzlich 0.1% TFA enthielt. Die Proteinprobe wurde im Verhältnis 1:1 mit der Matrix gemischt und auf dem *target* getrocknet. Die Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgte gegen die einfach (66.431 kDa) und zweifach (33.216 kDa) geladene Masse von BSA. Für alle Messungen wurde das Massenspektrometer im linearen Modus betrieben.

Aufgrund des hohen Auflösungsvermögens dieser Methode (etwa 1 Da auf 5 kDa) sollte es möglich sein, die molekularen Massen der AmyA' sowie der AmyA'' mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen, um Aussagen über das vorliegende Konstrukt machen zu können. Die theoretischen Massen der beiden Formen der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A liegen bei 62.656 (AmyA') bzw. 59.487 kDa (AmyA''). Diese Werte stimmen mit den spektrometrisch bestimmten Massen von 61.805 bzw. 59.455 kDa (vergl. Abb. 3.3) unterschiedlich gut überein.



**Abb. 3.3:** MALDI-TOF massenspektrometrische Aufnahme der 535 Aminosäuren umfassenden AmyA' (schwarz) und der 505 Aminosäuren umfassenden AmyA'' (rot). Beide Kurven wurden aus unabhängigen Messungen erhalten und unter Beibehaltung der Skalierung zueinander in einem Graphen kombiniert. Aufgetragen ist die relative Intensität gegen das Masse-Ladungs-Verhältnis  $m/z$ . Die Maxima im Bereich um 30000  $m/z$  entsprechen den doppelt geladenen Molekülen.

Während die Abweichung von 32 Da im Falle der AmyA'' auf das generelle Auflösungsvermögen des Massenspektrometers sowie eine eventuell nicht ganz exakte Kalibrierung zurückgeführt werden kann, ist die Differenz von ca. 850 Da (entsprechend 6 - 8 Aminosäuren) zwischen berechneter und gemessener Masse der AmyA' für eine solche Interpretation zu groß. Ob hier eventuell ein N-terminaler Abbau einiger Aminosäurereste oder eine anderweitige Degeneration des Proteins stattgefunden hat, wurde jedoch nicht weiter verfolgt. Trotz der beschriebenen Ungenauigkeiten konnte anhand der ermittelten Massen gezeigt werden, dass die Peptidsequenz der aufgereinigten AmyA'' mit dem 505 Aminosäuren umfassenden Zielkonstrukt weitestgehend übereinstimmen muss. Die Probe dieser Variante der  $\alpha$ -Amylase A unterscheidet sich somit deutlich von der ursprünglichen AmyA' und wurde im Anschluss ebenfalls in Kristallisationsversuchen eingesetzt.

### 3.3 Kristallisation

#### 3.3.1 Umgang mit Proteinlösungen

Sämtliche Proben der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A wurden von Herrn Dr. Ole Fütterer vom Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen als wässrige Lösungen zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationen variierten nach abschließender Dialyse gegen 5 l eines 10 mM Tris Puffers mit pH 7.0 zwischen 9 und 40 mg/ml, was einer Molarität von 0.15 mM bis 0.67 mM entspricht.

Zur Abtrennung eventuell präzipitierten Proteins oder sonstiger unlöslicher Verunreinigungen wurden die Proben direkt nach Erhalt für 10 min bei  $10.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und dann in zuvor autoklavierte, 500  $\mu\text{l}$  fassende Reagiergefäße der Firma Eppendorf (Hamburg) in Portionen zu je 50  $\mu\text{l}$  aufgeteilt. Auf diese Weise lassen sich einzelne Aliquots zur Kristallisation auftauen, ohne dass durch wiederholtes Erwärmen und Herunterkühlen die gesamte Probe unnötig beeinträchtigt wird. Alle erhaltenen Proben wurden zudem mit Hilfe einer *silver stained SDS* Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf mögliche Abbauprodukte oder sonstige makromolekulare Verunreinigungen überprüft (siehe auch Kapitel 3.1). Die Aufbewahrung der Proteinlösungen erfolgte generell bei  $-80^\circ\text{C}$ . Direkt vor einem Kristallisationsexperiment wurden die einzelnen Samples aufgetaut, erneut für 10 min bei  $10.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagiergefäß gleicher Größe überführt.

### 3.3.2 Ansetzen von Lösungen zur Kristallisation

Ein entscheidender Faktor für die erfolgreiche Kristallisation von biologischen Makromolekülen und insbesondere deren Reproduzierbarkeit ist der Einsatz exakt definierter Stammlösungen. Aus diesem Grunde wurden alle im Rahmen der Kristallisation der AmyA verwendeten Lösungen nach einem einheitlichen Schema angesetzt, wobei als Lösungsmittel ausschließlich doppelt destilliertes Wasser verwendet wurde. Die Konzentrationen von Salzen, Puffern und Additiven sind jeweils in mol/l angegeben, die organischer Fällungsmittel in Massenprozenten (w/w). Letzteres gilt auch für den Fall, dass die reine Ausgangssubstanz bei Raumtemperatur in flüssiger Form vorliegt (wie z. B. im Falle von MPD). Eventuellem Pilzbefall von Polyethylenglykol- und MPD-Lösungen wurde durch Zusatz von 0.03%  $\text{NaN}_3$  vorgebeugt. Zur Sterilisation wurden alle Lösungen (ausgenommen: 1M Spermin · 4HCl) über eine *Millipore Express Membrane* mit einer mittleren Porengröße von 0.22  $\mu\text{m}$  in keimfreie Aufbewahrungsgefäße filtriert. Die Aufbewahrung erfolgte bei konstant 4°C.

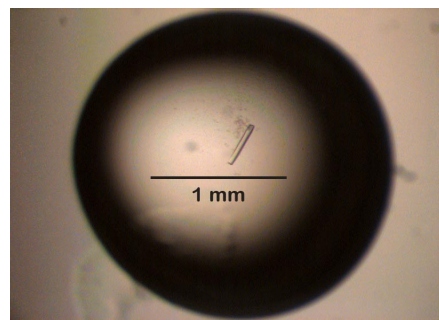
### 3.3.3 Kristallisation der *Thermotoga maritima* $\alpha$ -Amylase A

Versuche zur Kristallisation der  $\alpha$ -Amylase A von *Thermotoga maritima* erfolgten ausschließlich nach der *hanging drop* Gasdiffusionsmethode (Hampel *et al.* 1968) unter Verwendung von Gewebekulturplatten der Firma Sarstedt mit 24 Vertiefungen. Während der Suche nach möglichen Kristallisationsbedingungen wurden die Tropfen aus je 2  $\mu\text{l}$  der Proteinstammlösung und 2  $\mu\text{l}$  des Kristallisationspuffers zusammengesetzt, zur späteren Produktion größerer Kristalle wurde die Tropfengröße verdoppelt.

Ein anfängliches *screening* wurde mit Hilfe der käuflichen *Crystal Screening Kits I, II* und *cryo* der Firma Hampton Research sowie der *Wizard Kits I* und *II* der Firma Emerald Biostructures durchgeführt. Jede dieser Zusammenstellungen enthält etwa 50 vorgefertigte Lösungen, die sich zumeist aus einem Fällungsmittel, einem Puffersystem und einer Salzkomponente zusammensetzen und so einen weiten Bereich möglicher Kristallisationsbedingungen abdecken (*sparse matrix sampling*). Bedingungen, unter denen (Mikro-) Kristalle entstanden, wurden zunächst mit eigens angesetzten Lösungen reproduziert und darauf folgend sorgfältig verfeinert. Dabei wurden Parameter wie die Konzentrationen der einzelnen Komponenten, die Temperatur sowie der pH-Wert systematisch verändert, um die Kristallgröße und -qualität zu optimieren.

### 3.3.3.1 Kristallisation der AmyA' (535 AS)

Die rekombinante  $\alpha$ -Amylase A' aus *Thermotoga maritima* (535 Aminosäurereste, einschließlich der mutmaßlichen, N-terminalen Linker-Sequenz) kristallisiert bei Raumtemperatur aus einer Lösung der Konzentration 20 mg/ml, gepuffert in 10 mM Tris, pH 7.0. Der verwendete Kristallisationspuffer setzt sich aus 9% mPEG 5000, 10 mM Tris, pH 7.0 und 1 M NaCl zusammen. Erste Mikrokristalle waren nach 2 - 3 Tagen bei 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop zu erkennen und wuchsen innerhalb von etwa drei Wochen zu einer Größe von ca.  $500 \times 70 \times 70 \mu\text{m}^3$  (siehe Abb. 3.4). Trotz sorgfältiger Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen und vorsichtigem Einfrieren der Kristalle mit 30% Glycerin (siehe Kap. 3.4) war die an der Beamline BW7B des DESY / EMBL Außenstelle Hamburg detektierbare Diffraktion auf eine maximale Auflösung von ca. 7 Å beschränkt, so dass die gewonnenen Daten für eine Strukturbestimmung unzureichend waren.



**Abb. 3.4:** Kristall der 535 Aminosäurereste umfassenden  $\alpha$ -Amylase A' aus *Thermotoga maritima* (inklusive mutmaßlichem, N-terminalen Membran-Linker), aufgenommen bei 40facher Vergrößerung.

Dieses Ergebnis passt gut zu der bereits gemachten Annahme, dass die etwa 30 N-terminalen, hydrophilen Aminosäurereste keine definierte Sekundär- und Tertiärstruktur ausbilden (siehe *Einleitung*), sondern durch ihre Flexibilität einer geordneten Kristallstruktur und damit guten Streukraft der Kristalle entgegenstehen. Da auch weitere Kristallisationsversuche mit diesem Konstrukt des Enzyms trotz sorgfältiger Verfeinerung der Parameter und dem Einsatz von *micro* und *macro seeding* nicht zu den angestrebten Resultaten führten, wurde beschlossen, für die weiteren Arbeiten die N-terminale Linker-Region durch Modifikation des codierenden Gens zu entfernen.

### 3.3.3.2 Sequenzvergleich der AmyA' mit homologen Proteinen

Mit einer Übereinstimmung von 28% und einem konservativen Austausch für 45% der Aminosäuren war zum Zeitpunkt der Kristallisation die Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus*



*cereus* das nach der Peptidsequenz am nächsten verwandte Protein, von dem eine dreidimensionale Struktur existierte (Watanabe *et al.* 1997). Ein Sequenzvergleich zeigt deutlich, dass ab Position 32, bezogen auf AmyA' (Valin, siehe Abb. 3.5, gelb unterlegt), eine ausgeprägte Homologie dieser zwei Sequenzen sowie auch mit der anderer Glucosidasen besteht. Da der erste Strang des  $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels in BCOG mit einem Serin in Position neun und in den anderen verglichenen Enzymen mit dem darauf folgenden Valin beginnt (grün unterlegt), konnte davon ausgegangen werden, dass dies auch für das TIM-Barrel der AmyA zutrifft.

AmyA'	.....	
1UOK	.....	
1BVZ	MLLEAIFHEAKGSYAYPISETQLRVRLRAKKGDVVRCEVLYADRYASPEEELAHALAGKA	
1PAM	.....	
1CIU	.....	
AmyA'	.....MFQTSMSQSLVSSNPHSNSTNTDG	24
1UOK	.....	
1BVZ	GSDERFDYFEALLECSTKRVKYVFLLTGPQGEAVYFGETGFS AERSKAGVFQYAYIHRSE	
1PAM	.....APDTS	
1CIU	.....ASDTA	
AmyA'	TSSNLEEVKYPVVYEIFIRSFYDRDGN....GV.....GDLNGVSQKVD	64
1UOK	..MEKQWWKESVYQIYPRSFMSNGD....GI.....GDLRGIISKLD	
1BVZ	VFTTPEWAKEAVIYQIFPERFANGDPSNDPPGTEQWAKDARPRHDSFYGGDLKGVIDRLP	
1PAM	VSNKQNFSTD.VIYQIFTDRFSDGNPANNPTG..AAFDGSCTNLRLYCGGDWQGIINKIN	
1CIU	VSNVVNYSTD.VIYQIVTDRFVDGNTSNNPTG..DLYDPTHTSLKKYFGGDWQGIINKIN	

**Abb. 3.5:** Sequenzhomologie innerhalb der ersten 64 Aminosäuren der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase AmyA' mit verwandten Glucosidasen (Altschul *et al.* 1990). Die Bezeichnungen entsprechen (bis auf AmyA') dem jeweiligen PDB-Code der Glucosidasen: **AmyA'**: *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A', **1UOK**: *Bacillus cereus* Oligo-1,6-Glucosidase, **1BVZ**: *Thermoactinomyces vulgaris* R-47  $\alpha$ -Amylase II, **1PAM**: *Bacillus sp.* 1011 cyclodextrin glucanotransferase, **1CIU**: *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* CGtase. Weitgehend konservierte Bereiche sind farbig unterlegt. Die Nummerierung bezieht sich auf AmyA', die später entfernte Linker-Region ( $\rightarrow$  AmyA'') ist rot dargestellt. Grün unterlegt ist jeweils die erste Aminosäure des ersten Stranges in der zentralen TIM-Barrel Domäne.

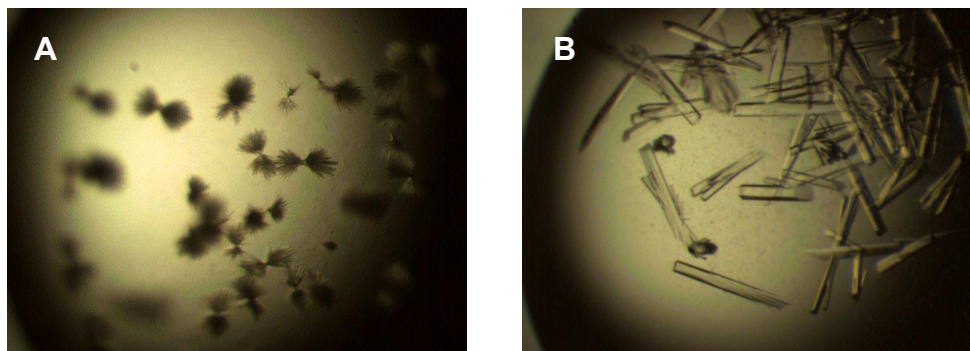
Es wurde daraufhin entschieden, das Konstrukt der AmyA' N-terminal um 30 Aminosäurereste bis einschließlich der Glutaminsäure in Position 31 zu verkürzen (in Abb. 3.5 rot eingefärbte Aminosäuren). Mit diesem Konstrukt sollte sichergestellt werden, dass der vermutlich flexible Membranlinker möglichst vollständig entfernt würde, gleichzeitig jedoch alle Reste erhalten bleiben, die innerhalb der vermuteten Domäne A des Enzyms das zentrale Barrel bilden. Die dazu notwendige Manipulation des *amyA*-Gens wurde wie auch die darauf folgende Expression und Aufreinigung des Enzyms wiederum von Herrn Dr. Ole Fütterer am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen durchgeführt (Fütterer 2001). Alle folgenden Beschreibungen, sowohl der Kristallisation als auch der

weiteren Strukturbestimmung und -diskussion beziehen sich auf dieses nun 505 Aminosäure-reste umfassende Konstrukt AmyA''.

### 3.3.3.3 Kristallisation der AmyA'' (505 AS)

Die zunächst erhaltene Proteinlösung der gentechnologisch verkürzten AmyA' war mit 40 mg/ml sehr hoch konzentriert. Da die meisten Proteine aus Lösungen mit Konzentrationen zwischen 10 und 20 mg/ml zur Kristallisation gebracht werden können und bei zu hoher Konzentration die Gefahr vorzeitiger Denaturierung oder Präzipitation besteht, wurden die Proben jeweils direkt vor den einzelnen Kristallisationsversuchen mit doppelt destilliertem Wasser auf 20 mg/ml verdünnt.

Bereits nach zwei Tagen konnten in nahezu allen Tropfen, die unter Verwendung der Kristallisationslösungen der Firma Hampton Research angesetzt worden waren und die entweder  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  Ionen enthielten, Büschel-ähnliche Ansammlungen kleiner, nadeliger Kristalle beobachtet werden. Calcium war bereits zuvor erfolgreich in der Kristallisation verschiedener Amylasen eingesetzt worden (Ramasubbu *et al.* 1996, Lee *et al.* 1991) und hatte in einem dokumentierten Fall in zu hoher Konzentration zur Bildung von Kristallen mit der hier beobachteten Morphologie geführt (McPherson 1999). Durch eine Verfeinerung der Bedingungen konnten schließlich Stäbchen-förmige Kristalle mit einer maximalen Größe von  $400 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$  erhalten werden (vergl. Abb. 3.6).

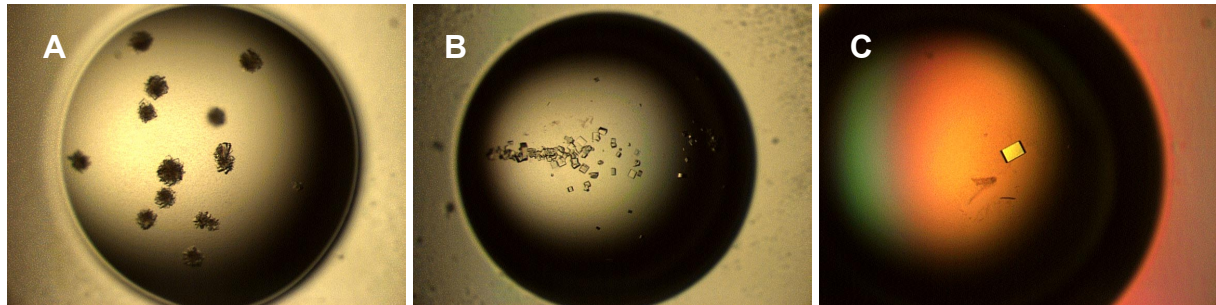


**Abb. 3.6:** Kristallisation der 505 Aminosäurereste umfassenden Form der  $\alpha$ -Amylase A von *Thermotoga maritima* mit  $\text{Ca}^{2+}$ , aufgenommen bei 80facher Vergrößerung; **A:** erste Kristalle, erhalten nach *screening* mit Hampton Kit; **B:** Stäbchen-förmige Kristalle nach Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen.

Bei genauerer Betrachtung der Stirnflächen ist jedoch zu erkennen, dass es sich nicht um Einkristalle handelt, sondern dass jeder Kristall aus einer Vielzahl kleiner, gegeneinander versetzter Nadeln aufgebaut ist. Versuche, die Kristallqualität mit Hilfe verschiedener Arten

von *micro seeding* zu verbessern, schlugen fehl, so dass stattdessen nach weiteren Bedingungen gesucht wurde.

Zur Datensammlung geeignete Kristalle der AmyA'' konnten schließlich bei 20°C in einem Inkubator aus einer Lösung der Konzentration 12 mg/ml mit einem Kristallisationspuffer aus 3 - 4% PEG 6000, 25 mM Cacodylat Puffer, pH 6.5 und 10 mM Spermin · 4 HCl erhalten werden. Innerhalb von etwa einer Woche entstanden zunächst orangefarbene Spherulite, an deren Oberfläche sich eine Vielzahl sehr feiner Kristallplättchen bildete. Durch *streak seeding* mit einem Katzenschnurrhaar in zuvor äquilibrierte Tropfen (2 + 2 µl, Kristallisationspuffer: 2% PEG 6000, 40 mM Cacodylat Puffer, pH 6.5, 20 mM Spermin · 4 HCl) gelang es, Kristallisationskeime soweit zu vereinzeln, dass sich daraus kleine, nicht verwachsene Einkristalle bildeten. In einem zweiten Schritt wurden diese Kristalle dann mit einer Kapillare in ebenfalls äquilibrierte Tropfen identischer Zusammensetzung, jetzt aber doppeltem Volumen, transferiert (*macro seeding*), in denen sie sich bis zu einer Größe von 300 x 300 x 100 µm entwickelten. Den Gang der erfolgreichen Kristallisation zeigt Abbildung 3.7.



**Abb. 3.7:** Kristallisation des 505 Aminosäurereste umfassenden Konstrukts der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A, aufgenommen jeweils bei 40facher Vergrößerung; **A:** Spherulite, aus deren Oberfläche sehr feine Kristallplättchen wachsen, ca. 1 Woche alt; **B:** erste Einkristalle ca. 1 Woche nach *streak seeding*, gut zu erkennen ist die horizontale Streichrichtung mit dem Katzenhaar (*streak line*); **C:** zur Diffraction geeigneter Einkristall, ca. 3 Wochen nach *macro seeding*, Dimensionen: 300 x 200 x 80 µm.

### 3.3.4 Einbau von Heteroatomen in die Kristallstruktur der AmyA''

Sowohl zur Lösung der Struktur relevante Quecksilberionen als auch der Inhibitor Acarbose konnten durch Tränkung der jeweiligen Kristalle in einer entsprechenden Lösung in das Protein integriert werden. Zum Einbau der Schwermetallionen wurden einzelne Kristalle für die Dauer von 24 Stunden in *hanging drops* übertragen, die neben der eigentlichen, zuvor äquilibrierten Kristallisationslösung Quecksilberdichlorid der Konzentration 1 mM enthielten.

Im Falle von Raumtemperaturmessungen wurden die Kristalle direkt aus dieser Lösung montiert, für Tieftemperaturdatensammlungen wurde dem Kryoprotektanden ebenfalls 1mM  $\text{HgCl}_2$  zugesetzt. Die jeweiligen Kristalle wurden dann direkt vor dem Schockgefrieren kurzzeitig in eine Quecksilber-freie Lösung transferiert, um die Metallionen aus dem Lösungsmittel zu entfernen (*back soaking*). Acarbose konnte in die Molekülstruktur der AmyA'' eingebunden werden, indem es der Lösung des Kryoprotektanden in einer Konzentration von ebenfalls 1 mM zugesetzt wurde. Die Dauer des *soakings* betrug in diesem Fall etwa 1 Stunde.

### 3.4 Kryoprotektion

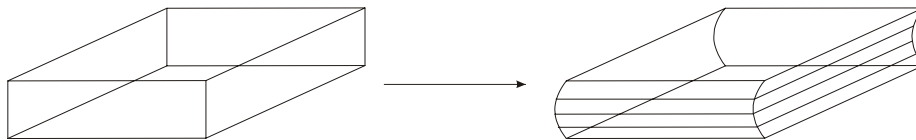
In ersten Versuchen wurden Kristalle zum Zwecke der Kryoprotektion mit Hilfe einer Kapillare direkt in eine Lösung transferiert, die neben dem ursprünglichen Kristallisationspuffer einen der Kryoprotektanden aus Tabelle 3.1 in der angegebenen Konzentration enthielt.

**Tab. 3.1:** Zur Kryoprotektion der Kristalle von AmyA'' getestete Reagenzien. Die eingesetzten Konzentrationen sind als Massenprozent (w/w) zu verstehen.

Kryoprotektand	eingesetzte Konzentration
Glycerin	30%
PEG 400	30%
PEG 4000	25%
Glucose	25%
MPD	25%
Erythritol	25%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50% gesättigt
PFP Öl	100%

Unabhängig von dem eingesetzten Kryopuffer brachen jedoch alle Kristalle innerhalb kürzester Zeit auseinander, so dass sie zur Datensammlung nicht mehr zu verwenden waren. In späteren Versuchen wurde die Konzentration des Kryoprotektanden deshalb langsam schrittweise erhöht. Hierzu wurden geringe Volumina einer Lösung, die zunehmende Konzentrationen des Kryoprotektanden enthielten, über ca. 1 Stunde vorsichtig zu dem Kristallisationstropfen hinzugegeben und wieder entfernt (Garman & Schneider 1997). Auf diese Weise war es möglich, die Konzentrationen von MPD und PEG 4000 auf bis zu 25 bzw. 30% zu erhöhen, ohne dass es dabei zur Auflösung oder Zersetzung der Kristalle kam.

Während die Zugabe von MPD zu keiner Veränderung in der Kristallmorphologie zu führen schien (40fache Vergrößerung), traten ab einer Konzentration von ca. 15% PEG 4000 konvexe bzw. konkave Wölbungen an gegenüberliegenden Oberflächen des Kristalls auf (siehe Abb. 3.8). Zwischen zwei senkrecht zueinander stehenden Polarisationsfiltern betrachtet, zeigte der Kristall nun zudem eine Struktur, die auf einen Aufbau aus mehreren Schichten hindeutete, die relativ zueinander verschoben waren. Obwohl derartige, unregelmäßige Veränderungen der Kristallmorphologie in der Regel auf eine entstehende Unordnung bzw. Stapelfehler hindeuten, konnten später sowohl von der mit MPD als auch der mit PEG 4000 behandelten Kristalle Tieftemperaturdaten gesammelt werden (siehe Kapitel 3.6).



**Abb. 3.8:** Veränderung der Morphologie von Kristallen der AmyA'' bei schrittweiser Zugabe von PEG 4000 als Kryoprotektand.

### 3.5 Kristallmontage

Entgegen früheren Techniken, die Kristalle im Stickstoffstrom des Kryostats einzufrieren, wurden im Rahmen dieses Projektes alle Kristalle, von denen Tieftemperaturdaten gesammelt werden sollten, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dies hat den Vorteil, dass die Zeit zwischen der Entnahme des Kristalls aus der ihn schützenden Lösung und dem Gefrieren und somit die Verweildauer an der Luft auf ein Minimum reduziert werden kann. Zudem verläuft das eigentliche Einfrieren schneller und gleichmäßiger, so dass die Gefahr der Eisbildung reduziert wird. Die Montage im Kaltgasstrom des Diffraktometers konnte dann ohne weitere Beeinträchtigung der tiefgefrorenen Kristalle mit Hilfe eines *cryo vials* und eines *arcs* durchgeführt werden.

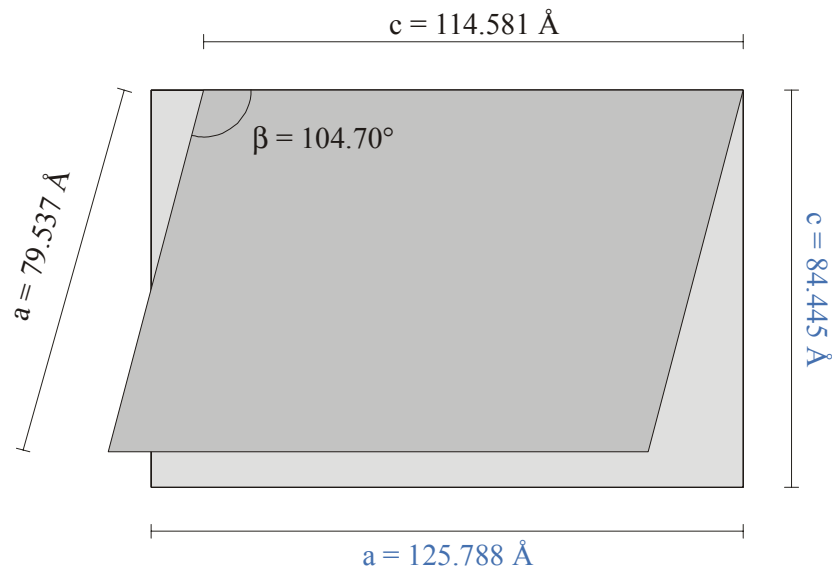
Zwei Datensätze, die sich zur späteren Strukturlösung als entscheidend erweisen sollten, wurden bei Raumtemperatur gesammelt. Der Kristall wurde dazu in eine Glaskapillare transferiert und beidseitig mit etwas Kristallisationslösung gegen eventuelle Austrocknung geschützt. Die Kapillare wurde an beiden Enden mit je einem Tropfen Bienenwachs verschlossen, in einen Kunststoffpin geklebt und in der Spindel des Diffraktometers fixiert.

### 3.6 Datensammlung und -prozessierung

Die Sammlung der Datensätze **1** und **8** fand an der *multipole wiggler beamline* BW7B am Speicherring DORIS der Außenstelle Hamburg des EMBL c/o DESY statt. Als Detektor kam ein *imaging plate* System MAR345 zum Einsatz. Alle weiteren Datensätze wurden an einem Einkreisdiffraktometer der Arbeitsgruppe Sheldrick in Göttingen gesammelt, das sich aus einer Kupfer-Drehanode der Firma Bruker, einem Spiegelsystem *max flux* der Firma Osmic sowie ebenfalls einem MAR345 *imaging plate* Detektor zusammensetzt. Während alle *in-house* Daten bei nur einem Kristall-Detektor-Abstand gesammelt werden konnten, war es für die Messungen am Synchrotron notwendig, niedrig und hoch aufgelöste Daten getrennt aufzunehmen, um einerseits die bestmögliche Auflösung zu erreichen, andererseits den Zähler bei niedriger Auflösung aber nicht zu übersättigen. Die Integration und Skalierung aller Daten erfolgte mit den Programmen DENZO und SCALEPACK bzw. HKL2000 (Otwinowski & Minor 1997), für die Bestimmung der Raumgruppe wurde XPREP (Sheldrick 1997) verwendet. Sämtliche relevanten Daten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

#### 3.6.1 Transformation der Elementarzelle

Obwohl alle Kristalle unter identischen Bedingungen gezüchtet wurden und sich optisch zunächst nicht voneinander unterschieden, konnten in Abhängigkeit von dem eingesetzten Kryoprotektanden drei verschiedene Zellen und Raumgruppen gefunden werden. Während die bei Raumtemperatur vermessenen Kristalle (Datensätze **4** und **5**) eine relativ kleine, orthorhombische Zelle aufwiesen, wurden bei Tieftemperaturmessungen entweder eine größere orthorhombische (Datensatz **6**) oder eine kleinere monokline Zelle gefunden (Datensätze **1**, **2**, **3**, **7** und **8**). Beide sind jedoch von der Zelle der Raumtemperaturdatensätze nicht gänzlich unabhängig. So variiert die Länge der b-Achse in allen nativen Modifikationen lediglich zwischen 127.69 und 128.53 Å und die Tieftemperaturdaten mit MPD als Kryoprotektand (Datensatz **6**) zeigten relativ zu den bei Raumtemperatur bestimmten Einheitszellen eine ungefähre Verdopplung der c-Achse. Auch die Achsen a und c der monoklinen Modifikation, die bei Tieftemperaturmessungen nach der Kryoprotektion mit PEG 4000 gefunden wurden, sind mit den Achsen c und a der orthorhombischen Zelle verwandt. Abbildung 3.9 illustriert dies in einer Projektion entlang der monoklinen b-Achse.



**Abb. 3.9:** Projektion der ursprünglichen, mit Raumtemperaturmessungen gefundenen, orthorhombischen (hellgrau) und der bei Tieftemperaturmessungen mit PEG 4000 gefundenen, monoklinen Zelle (dunkelgrau) entlang der kristallographischen  $b$ -Achse ( $\sim 128 \text{ \AA}$ ). Die Längen der Kanten  $a$  und  $c$  sowie der Winkel  $\beta$  der monoklinen Kristallform sind in schwarz angegeben, die Kantenlängen der orthorhombischen Kristallform in blau.

Es ist ersichtlich, dass die monokline Zelle generell der orthorhombischen Zelle ähnelt, insgesamt aber mit  $1\,133\,015 \text{ \AA}^3$  gegenüber  $1\,358\,240 \text{ \AA}^3$  ein um ca. 16.5% geringeres Volumen aufweist. Da die monokline Form reproduzierbar bei der Sammlung von Tieftemperaturdaten nach der Behandlung mit PEG 4000 auftritt, muss entweder durch den Austausch von Wasser gegen die Lösung des Kryoprotektanden oder aber während des Schockgefrierens ein Phasenübergang stattgefunden haben, der mit einer Schrumpfung der Einheitszelle einhergeht (Esnouf *et al.* 1998, Weiss & Hilgenfeld 1999).

Zur weiteren Untersuchung des Phänomens wurde ein Kristall zunächst ohne Kryopuffer in einer Kapillare montiert und die Zelle bestimmt. Der Kristall wurde daraufhin der Kapillare wieder entnommen und gemäß des zuvor etablierten Kryo-Protokolls mit PEG 4000 behandelt, dann aber nicht eingefroren, sondern erneut bei Raumtemperatur vermessen. Während zunächst die orthorhombische Zelle entsprechend der Datensätze **4** und **5** gefunden wurde, hatte diese sich nach der Behandlung mit PEG 4000 in die monokline Zelle analog der Datensätze **1**, **2**, **3**, **7** und **8** umgewandelt. Verantwortlich für den Übergang von der orthorhombischen in die monokline Zelle ist also der Entzug von Kristallwasser durch eine Veränderung des osmotischen Potentials mit der Zugabe von PEG 4000 und nicht etwa die plötzliche Temperaturänderung während des Schockgefrierens. Diese Schlussfolgerung steht im Einvernehmen mit der beobachteten Änderung der Kristallmorphologie während des *cryo*

*soakings* mit PEG 4000 und erklärt auch das sofortige Zerfallen der Kristalle beim direkten Transfer in höher konzentrierte Lösungen dieses Kryoprotektanden (vergl. Kapitel 3.4). Gleichwohl läuft der beobachtete Phasenübergang nicht gänzlich homogen bzw. vollständig ab. Neben den Reflexen der monoklinen Zelle waren bei Tieftemperaturmessungen eine Reihe nicht indizierter Reflexe beobachtbar und die Mosaizität des Kristalls erhöhte sich von ca.  $0.4^\circ$  auf über  $1^\circ$  (vergl. auch die bei Raum- bzw. Tieftemperatur gesammelten Datensätze 4 / 5 und 2 / 7). Beide Probleme traten generell bei allen Tieftemperaturdatensammlungen auf, konnten aber durch vorsichtiges *cryo soaking* und gezielte Kristallauswahl auf ein vertretbares Maß reduziert werden.

Es ist festzuhalten, dass die maximale Auflösung der monoklinen Tieftemperaturdatensätze um ca.  $0.5 \text{ \AA}$  über der Auflösung der bei Raumtemperatur gemessenen Daten liegt, so dass letztlich mehr Informationen über den dreidimensionalen Aufbau des Proteins erhalten werden konnten. Ferner konnten durch das Frieren der Kristalle sekundäre Strahlenschäden weitgehend reduziert werden (Garman & Schneider 1997, Burmeister 2000), so dass auch bei längeren Messungen mit hochintensiver Strahlung lediglich eine geringe Zersetzung der Kristalle auftrat.

Die Vollständigkeit von 8 ist mit 91.3% für den gesamten Auflösungsbereich und 67.3% für die äußere Auflösungsschale wesentlich geringer als für die restlichen Datensätze. Dies resultiert aus einer ausgeprägten Anisotropie des verwendeten Kristalls, aufgrund derer nur Daten relativ schmaler Bereiche des reziproken Raumes eine befriedigende Qualität aufwiesen. Der Versuch, alle gemessenen Daten in die Integration und Skalierung mit einzubeziehen, führte zu einer Zunahme des mittleren  $R_{\text{merge}}$  von 8.5 auf mehr als 30%.



**Tab. 3.2:** Statistiken der von *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A'' gesammelten Datensätze. Werte in Klammern stehen jeweils für die äußerste Auflösungsschale der Stärke 0.1 Å.

	<u>1</u> TMA_HH	<u>2</u> TMA_spermin	<u>3</u> TMA_hg	<u>4</u> TMA_rt	<u>5</u> rt_hg2	<u>6</u> mpd_soak	<u>7</u> acr_may02	<u>8</u> acr_hh
Kristallisationsbedingungen	2-3% PEG 6000, 40 mM Cacodylat Puffer, pH 6.5							
Schweratom / Inhibitor	-	-	HgAc <sub>2</sub> , 24 h, 2 mM	-	HgCl <sub>2</sub> , 24 h, 2 mM	-	Acarbose, 1 h, 1 mM	Acarbose, 1 h, 1 mM
Temperatur [K]	100	100	100	293	293	100	100	100
Kryoprotektand	30% PEG 4000							
Gerät	in-house, Bruker Rotierende Anode, $\lambda = 1.54178$ Å, Osmic max flux Spiegelsystem, MAR345 Imaging Plate Detektor							
Zelle [Å, °]	79.537 128.529 104.70 114.581	79.703 128.272 104.69 114.843	79.099 126.579 104.66 117.440	125.788 127.923 84.445	125.815 127.896 84.560	125.571 127.692 163.848	79.403 128.773 104.92 114.907	79.205 128.889 104.92 114.558
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> ,2 <sub>1</sub> ,2	P2 <sub>1</sub> ,2 <sub>1</sub> ,2	P2 <sub>1</sub> ,2 <sub>1</sub> ,2	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Auflösung [Å]	35 - 1.75	15 - 2.7	20 - 3.0	99 - 3.2	99 - 3.5	99 - 2.7	20 - 3.0	18 - 1.9
R <sub>merge</sub>	0.071 (0.654)	0.084 (0.253)	0.116 (0.350)	0.150 (0.687)	0.185 (0.745)	0.096 (0.519)	0.203 (0.785)	0.085 (0.237)
Mosaizität [°]	0.55	0.96	0.85	0.38	0.32	0.98	0.70	0.74 - 1.01
Vollständigkeit [%]	99.9 (99.6)	100.0 (99.5)	98.1 (96.6)	99.4 (100.0)	99.5 (100.0)	94.5 (86.7)	85.8 (86.4)	91.3 (67.3)
<Redundanz>	4.09 (2.97)	2.37 (2.27)	7.61 (7.20)	1.66 (1.60)	3.34 (3.11)	7.82 (7.25)	1.97 (1.88)	2.35 (1.26)
<I/ $\sigma$ (I)>	9.81 (1.99)	10.72 (4.81)	13.57 (6.05)	9.07 (2.84)	7.77 (2.91)	11.69 (4.21)	4.28 (1.13)	9.77 (3.67)
Bemerkungen	identischer Kristall							

### 3.7 Lösung der Struktur der unkomplexierten AmyA''

#### 3.7.1 Molecular Replacement

Angesichts der hohen Sequenzhomologie mit der Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus cereus* (28% Identität, 45% konservierter Austausch) war davon auszugehen, dass mit dem oben genannten Protein ein geeignetes Suchmodell für eine Lösung der Struktur der AmyA'' nach der Methode des Molekularen Ersatzes (Rossmann & Blow 1962) generiert werden könnte. Auf der Grundlage eines Sequenzvergleiches (vergl. Kap. 3.3.3.2) wurden durch Entfernen von Bereichen geringer Homologie oder zusätzlicher Strukturelemente in BCOG unterschiedliche Modelle erzeugt, die dann als Suchfragment in verschiedenen MR-Programmen eingesetzt wurden. Zusätzlich wurden Parameter wie die verwendete Auflösung, die zu berechnenden Generationen und die Größe der Population (EPMR (Kissinger *et al.* 1999)) oder Angaben zur Ähnlichkeit und Vollständigkeit des Modells (MOLREP (Vagin & Teplyakov 1997)) variiert. Trotz der mutmaßlichen Ähnlichkeit der dreidimensionalen Strukturen der AmyA'' und der Oligo-1,6-Glucosidase (Holm & Sander 1993) gelang es nicht, die Struktur zu lösen. Im Nachhinein kann dieser Misserfolg auf zwei Ursachen zurückgeführt werden:

1. Die Streumasse des Suchmodells betrug aufgrund der vier unabhängigen Moleküle der AmyA'' weniger als 20% der in der asymmetrischen Einheit vorhandenen molekularen Masse. Dies hat zur Folge, dass sich die für die Rotationsfunktion berechneten und die beobachteten *self vectors* in der Pattersonfunktion selbst bei einem sehr ähnlichen Modell durch Überlagerung der vier Monomere stark voneinander unterscheiden, so dass ein Auffinden der korrekten Orientierung erschwert wird. Dies gilt analog auch für die berechneten und beobachteten Strukturfaktoren, die von dem Programm EPMR direkt in Beziehung gesetzt werden.
2. Ausgehend von dem erstellten Sequenzvergleich gelang es trotz der weitgehenden Übereinstimmung nicht, ein adäquates Suchmodell zu generieren. Ein im Nachhinein durchgeführter Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von AmyA'' und BCOG ließ erkennen, dass einige Bereiche des Proteins trotz hoher Sequenzhomologie unterschiedliche Positionen einnehmen, während andere Abschnitte, die sich in ihrer Sequenz nicht ähneln, mit geringen Abweichungen der C $\alpha$ -Atome zueinander superpositioniert werden können. Mit einem aus dieser Superposition erstellten

Suchfragment war es im Nachhinein möglich, mit dem Programm EPMR eine korrekte Platzierung der vier unabhängigen Monomere vorzunehmen.

### 3.7.2 Strukturlösung mit isomorphen und anomalen Differenzen

Die native Struktur der *T. maritima*  $\alpha$ -Amylase konnte schließlich durch eine Kombination von *single isomorphous replacement anomalous scattering* (SIRAS), *non-crystallographic symmetry averaging* unterstütztem *solvent flattening* und *molecular replacement* gelöst werden. Dazu wurde mit Hilfe der orthorhombischen Raumtemperaturdatensätze **4** und **5** zunächst eine Elektronendichtekarte bei niedriger Auflösung ( $d_{\min} = 3.2 \text{ \AA}$ ) berechnet. Die Qualität dieser Elektronendichte war ausreichend, um ein einfaches poly-Alaninmodell für etwa 80% der AmyA'' zu generieren, welches dann als Suchfragment zum *molecular replacement* in den monoklinen Daten von **1** diente. Unter Ausnutzung nicht-kristallographischer Symmetrie ließen sich schließlich die Phasen bis zur vollen Auflösung von  $1.75 \text{ \AA}$  erweitern. Die so erhaltene Elektronendichte konnte dann problemlos automatisch interpretiert werden. Da die Kombination der erwähnten Methoden und mehrerer Kristallformen nicht dem typischen Gang einer Proteinstrukturlösung entspricht und sich vergleichsweise kompliziert gestaltete, sollen die einzelnen Schritte hier näher beschrieben werden.

Mit den Datensätzen **1** und **3** liegen ein hochaufgelöster, nativer Datensatz in der monoklinen Raumgruppe  $P2_1$  sowie Daten eines Quecksilberderivates in der gleichen Raumgruppe und ähnlicher Zelle vor (vergl. Tab. 3.2). Allerdings differieren die Längen der Zellkanten b und c zwischen den beiden Datensätzen um ungefähr 2 bzw. 3  $\text{\AA}$  (entsprechend 1.5 bzw. 2.5%), so dass zwischen ihnen kein ausreichender Isomorphismus besteht, der eine Strukturlösung mit SIR oder SIRAS erlauben würde. Die vergleichsweise hohe Redundanz des Datensatzes **3** (7.61 ohne Berücksichtigung der Friedel-Gegenteile) erlaubt jedoch allein aus dem anomalen Signal des Quecksilbers die Bestimmung der Schweratompositionen. Aufgrund unzureichender Phaseninformationen und des fehlenden Isomorphismus zu den nativen Daten aus **1**, gelang es aber nicht, mit Hilfe der gefundenen Positionen eine interpretierbare Elektronendichte zu berechnen. Aus diesem Grund wurde bei der Strukturlösung zunächst von den Datensätzen **4** und **5** ausgegangen.

### 3.7.2.1 Betrachtung der orthorhombischen Kristallform

Aus den Zellkonstanten der Datensätze **4** bzw. **5** berechnet sich ein Zellvolumen von ca.  $1\,358\,240\ \text{\AA}^3$ , was unter Berücksichtigung der kristallographischen Symmetrie in  $P2_12_12$  ein Volumen von  $339\,560\ \text{\AA}^3$  für die asymmetrische Einheit ergibt. Aus diesen Werten lässt sich auf Basis des Matthews Koeffizienten  $V_M$  der Lösungsmittelanteil und somit auch die Anzahl der Moleküle pro Zelle bzw. asymmetrische Einheit abschätzen (Matthews 1968).

$$V_M = \frac{V}{M \cdot Z} \quad (3.1)$$

$V_M$  : Matthews Koeffizient [ $\text{\AA}^3/\text{Da}$ ]       $V$  : Zellvolumen [ $\text{\AA}^3$ ]  
 $M$  : Masse des Proteins [Da]                       $Z$  : Anzahl der Moleküle pro Einheitszelle

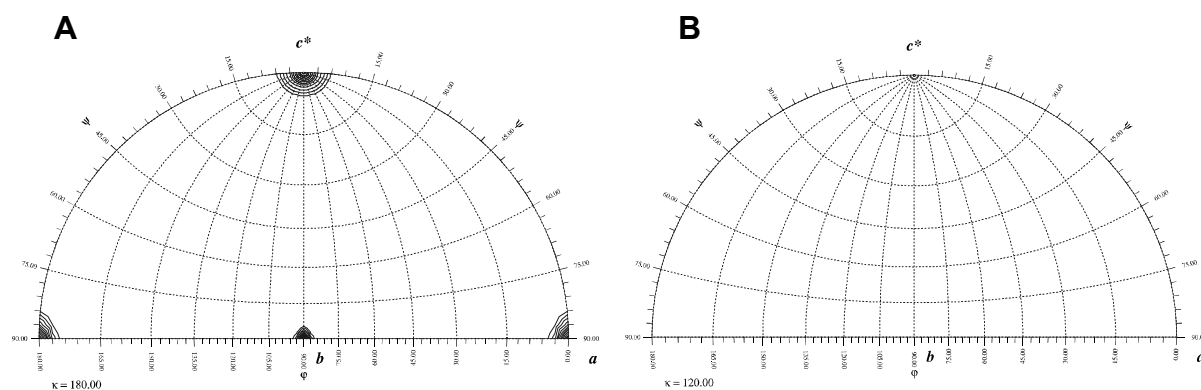
Statistische Untersuchungen haben gezeigt, dass der Matthews Koeffizient für die meisten Proteinkristalle einen Wert zwischen 1.66 und  $4.00\ \text{\AA}^3/\text{Da}$  annimmt; das Verteilungsmaximum liegt bei  $2.15\ \text{\AA}^3/\text{Da}$  (Drenth 1994). Auf der Grundlage einer Dichte von  $1.35\ \text{g/cm}^3$  für ein typisches Protein lässt sich daraus direkt der Lösungsmittelanteil berechnen. Für 1 bis 4 Moleküle AmyA'' pro asymmetrische Einheit der orthorhombischen Kristallform sind die zugehörigen Matthews Koeffizienten und Lösungsmittelanteile in Tabelle 3.3 aufgelistet. Für die Masse des Proteins wurde der gerundete Wert von 60 000 Da eingesetzt.

**Tab. 3.3:** Zusammenhang des Matthews Koeffizienten und des Lösungsmittelanteils mit der Anzahl der Moleküle der AmyA'' je asymmetrischer Einheit für die orthorhombische Kristallform (Raumtemperaturdaten).

Anzahl Moleküle / asym. Einheit	Matthews Koeffizient [ $\text{\AA}^3/\text{Da}$ ]	Lösungsmittelanteil im Kristall [%]
1	5.66	78.3
2	2.83	56.5
3	1.89	34.1
4	1.41	12.8

Mit einem Lösungsmittelanteil von 56.5 bzw. 34.1% erscheinen 2 bis 3 Moleküle pro asymmetrische Einheit sinnvoll. Die beobachtete Schrumpfung der Elementarzelle während der Kryoprotektion mit PEG 4000 (vergl. Kapitel 3.6.1) deutet eher auf den höheren Lösungsmittelanteil und somit das Vorhandensein von 2 unabhängigen Molekülen hin.

Hinweise auf mögliche nicht-kristallographische Symmetrie lassen sich unter bestimmten Bedingungen aus der nativen Patterson-Funktion oder einer Selbstrotationsfunktion ableiten. Eine diesbezügliche Untersuchung der Daten mit den Programmen XPREP (Sheldrick 1997) und GLRF (Tong & Rossmann 1990) deutete jedoch weder auf das Vorhandensein von nicht-kristallographischer Translations- noch Rotationssymmetrie hin, so dass auch ein Molekül pro asymmetrischer Einheit möglich wäre. In diesem Falle wäre der Lösungsmittelgehalt mit ungefähr 78% jedoch extrem hoch. Denkbar wäre auch eine nicht-kristallographische Symmetrie, die keiner Punktgruppe folgt (*improper* NCS) oder eine zweizählige nicht-kristallographische Rotationssymmetrie, deren Achse parallel zu einer der kristallographischen zweizähligen Achsen verläuft. Letzteres sollte allerdings zu einem Translationsmaximum in der nativen Patterson-Funktion führen, das aber nicht beobachtet wird. Abbildung 3.10 zeigt die Selbstrotationsfunktionen der Sektionen  $\kappa = 180^\circ$  und  $\kappa = 120^\circ$ .



**Abb. 3.10:** Selbstrotationsfunktionen der orthorhombischen Kristallform der AmyA<sup>9</sup>. Beide Berechnungen wurden mit einer Auflösung von 3.5 Å und einem Integrationsradius von 35 Å durchgeführt. Die niedrigste Konturierungsstufe beträgt 40% des höchsten Maximums, die Schrittweite jeweils 5 Prozentpunkte. **A:**  $\kappa$ -Sektion  $180^\circ$ , die Maxima repräsentieren die drei senkrecht aufeinander stehenden, kristallographischen zweizähligen Achsen, zusätzliche NCS ist nicht ableitbar. **B:**  $\kappa$ -Sektion  $120^\circ$ . Es existiert kein Hinweis auf dreizählige NCS.

### 3.7.2.2 Datenanalyse und -bearbeitung

Die Einheitszellen der Datensätze **4** und **5** besitzen mit einer maximalen Differenz von 0.12 Å entlang der c-Achse ( $\approx 0.14\%$ ) eine hinreichende Isomorphie, um aus ihnen  $\Delta F$ - bzw.  $F_A$ -Werte zu berechnen, mit deren Hilfe die Substruktur der im Kristall gebundenen Quecksilberionen bestimmt werden kann. Eine entsprechende Statistik aus XPREP zeigt, dass ein anomales Signal zwar vorhanden, aufgrund der geringen Redundanz der Daten (3.34 über den gesamten Auflösungsbereich) aber nur sehr schwach ausgeprägt ist. Dennoch wurde entschieden, diese Information mit auszunutzen und  $F_A$ -Daten für eine Strukturlösung mit SIRAS zu generieren.

Anomalous signal/noise ratios (1.0 is random). The first line is based on input sigmas, the second on variances of F+ and F- (if not already averaged):

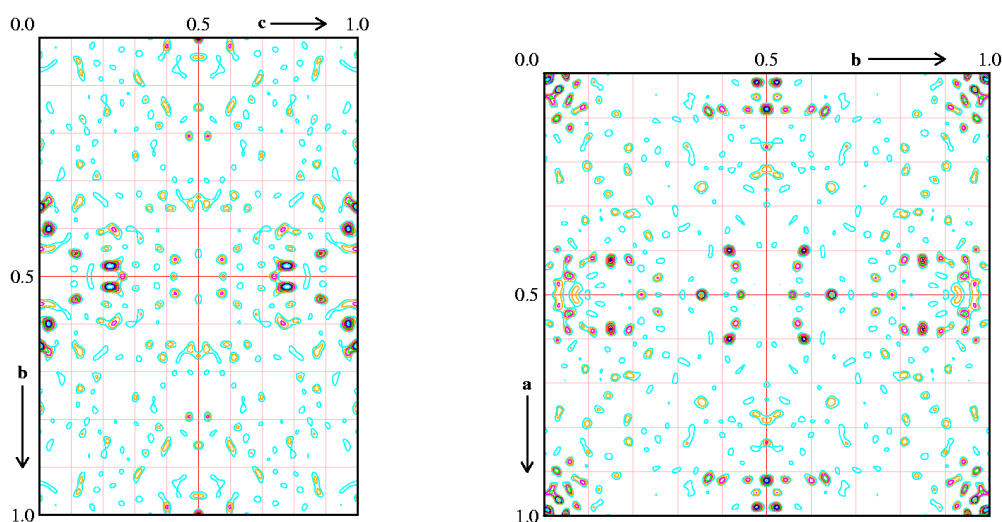
```
Inf - 8.0 - 6.0 - 5.3 - 5.1 - 4.9 - 4.7 - 4.5 - 4.3 - 4.1 - 3.9 - 3.7 - 3.5 A
      1.32  1.33  1.28  1.25  1.19  1.22  1.23  1.16  1.12  1.14  1.09  1.09
```

```
86.6 Neighbors used on average for F+/F- local scaling
Rint(anom) = 0.1530 before and 0.1521 after local scaling
```

```
92.9 Neighbors used on average for local scaling to native/remote dataset
Rint = 0.3680 before and 0.3602 after local scaling
```

**Abb. 3.11:** Auszug einer XPREP-Protokolldatei. Das geringe Verhältnis des anomalen Signals zum Rauschen, belegt, dass aus den anomalen  $\Delta F$ -Werten lediglich ungenaue Informationen erhalten werden können.

Der  $R_{\text{int}} > 0.36$  für die Skalierung der beiden Datensätze zueinander deutet auf eine generell mäßige Qualität oder aber auf große Differenzen zwischen den gemessenen Struktur Faktoren hin. Eine Betrachtung der Harker-Schnitte der SIRAS  $F_A$ -Daten in  $x = \frac{1}{2}$ ,  $y = \frac{1}{2}$  und  $z = 0$  bestätigt gleichwohl das Vorhandensein eines systematischen Signals (exemplarisch für  $x = 0.5$  und  $z = 0$  siehe Abb. 3.12).

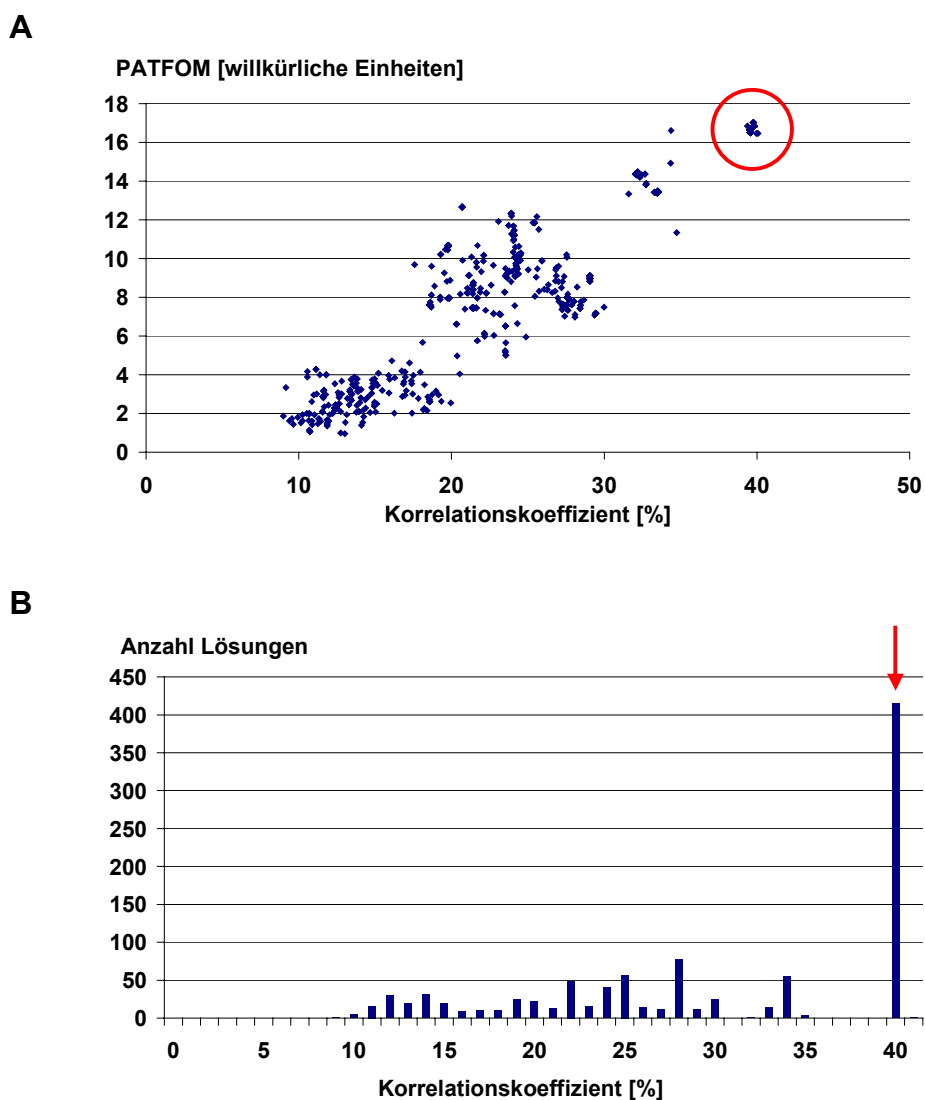


**Abb. 3.12:** Harker-Schnitte der Patterson-Funktion mit  $x = \frac{1}{2}$  bzw.  $z = 0$  (Raumgruppe  $P2_12_12$ ) der aus den Datensätzen **4** und **5** berechneten SIRAS  $F_A$ -Werte. Das Ursprungsmaximum wurde entfernt, die Konturierung erfolgt in Schritten von  $1\sigma$ .

### 3.7.2.3 Lokalisierung der Schweratompositionen

Die Lösung der Substruktur der Quecksilberionen aus den berechneten  $F_A$ -Daten wurde mit dem Programm SHELXD durchgeführt. Unter der Annahme von zwei bis drei Molekülen pro asymmetrische Einheit wurde zunächst von 6 unabhängigen Positionen ausgegangen (**FIND 6**). Für alle weiteren Parameter wurden Standardwerte übernommen, lediglich die Anzahl der zu berechnenden Versuche wurde auf 1000 begrenzt (**NTRY 1000**). Mit einem

erhaltenen Korrelationskoeffizienten von maximal 40.07% für alle und 30.12% für die schwachen Daten (PATFOM 17.03) war die Struktur mit hoher Wahrscheinlichkeit gelöst. Anhand der Auftragung des Korrelationskoeffizienten für alle Daten gegen den zugehörigen PATFOM kann eine klare Unterscheidung zwischen korrekten und Pseudo-Lösungen der Substruktur getroffen werden. Überdies zeigt ein Histogramm der erhaltenen Korrelationskoeffizienten eine quasi-bimodale Verteilung, die ebenfalls darauf hindeutet, dass die Struktur der Schweratome gelöst ist (siehe Abb. 3.13).



**Abb. 3.13:** Auftragungen der von SHELXD berechneten Korrelationskoeffizienten bzw. PATFOM-Werte. Die korrekten Lösungen sind jeweils rot markiert. **A:** Scatterplot des PATFOM gegen den Korrelationskoeffizienten für alle Daten. **B:** Histogramm der Korrelationskoeffizienten.

Die mutmaßlich korrekten Lösungen ( $CC_{(\text{alle Daten})} > 38\%$ ) wurden anschließend mit einem zu Versuchszwecken geschriebenen Programm (Sheldrick 2001) verglichen, gemittelt und eine Kreuzworttabelle berechnet. Dabei variierte die mittlere Phasendifferenz der meisten

Lösungen relativ zu einer gemittelten Lösung um lediglich  $5^\circ$ , so dass davon auszugehen war, dass diese Lösungen alle korrekt waren. Aus der unten gezeigten Kreuzworttabelle für die acht höchsten Maxima der gemittelten Lösung lässt sich ablesen, dass tatsächlich sechs Quecksilberatome pro asymmetrische Einheit gebunden sind. Erstens fällt die Intensität vom sechsten zum siebten Maximum von  $48.76 \sigma$  auf  $10.10 \sigma$  drastisch ab, zweitens ist die *Patterson minimum function* für die Mehrzahl der Kreuzvektoren ab dem siebten Atom deutlich niedriger als für die ersten sechs Atome (vergl. Abb. 3.14).

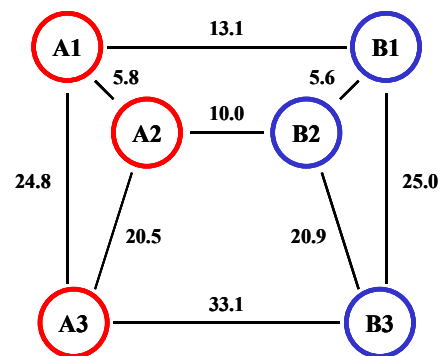
Number of reference peaks for PSFOM [3]:

Peak#	x	y	z	1/mult	h(sigma)	PSFOM
1	0.781075	0.924583	0.234863	1.0000	56.45	54.53
2	0.289474	0.447388	0.013420	1.0000	58.56	49.64
3	0.789574	0.097183	0.999092	1.0000	51.80	46.76
4	0.731041	0.023567	0.052650	1.0000	59.69	45.55
5	0.308853	0.969604	0.024651	1.0000	44.71	41.21
6	0.604210	0.452057	0.115364	1.0000	48.76	33.22
7	0.240341	0.966835	0.008743	1.0000	10.10	10.37
8	0.790016	0.000412	0.030510	1.0000	10.26	10.04

Number of columns for crossword table (<21, 0 to skip) [0]: 8

Peak# Self Cross-vectors (minimum distance/PSMF)

1	58.4							
	20.6	<b>B3</b>						
2	54.7	26.6						
	33.6	21.3	<b>A2</b>					
3	58.5	29.8	5.8					
	17.1	21.3	31.2	<b>A1</b>				
4	58.4	20.9	10.0	12.8				
	17.0	25.4	16.5	14.5	<b>B2</b>			
5	48.7	25.0	13.1	15.2	5.6			
	16.2	14.4	24.3	19.1	23.8	<b>B1</b>		
6	28.9	33.1	20.5	24.8	26.7	30.1		
	20.3	11.0	15.7	18.0	16.3	13.3	<b>A3</b>	
-----								
7	61.1	23.8	4.9	9.0	5.3	8.7	22.6	
	0.8	1.4	9.3	3.2	6.1	8.2	3.2	
8	52.8	19.8	7.6	12.7	8.2	13.0	19.2	6.0
	0.0	4.9	14.0	0.0	1.5	19.7	7.1	0.0



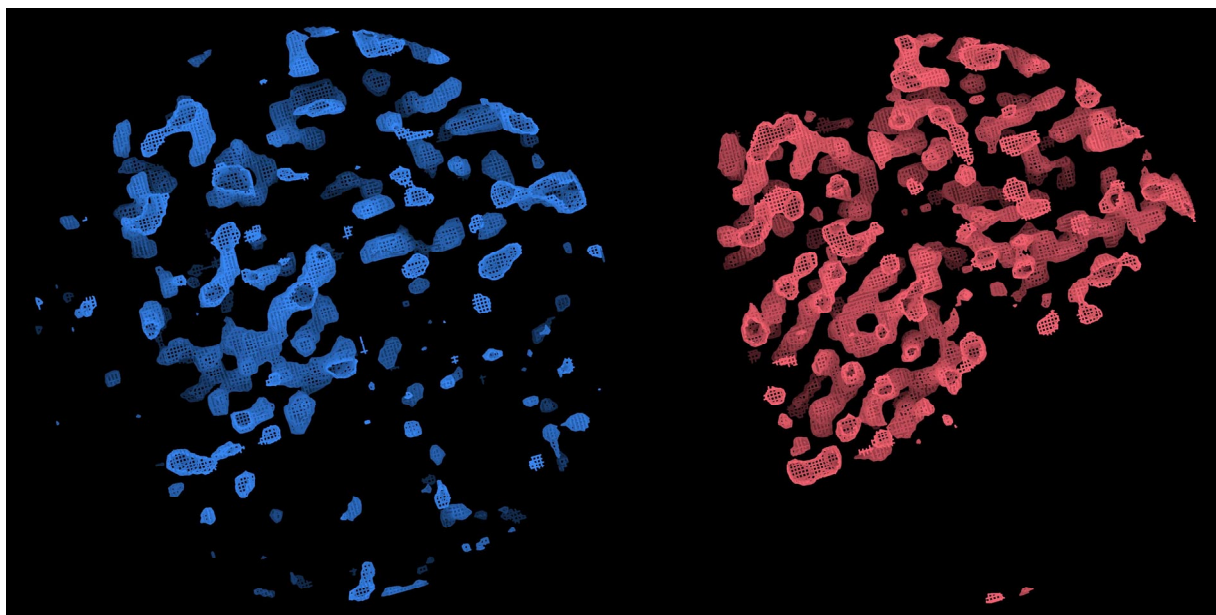
**Abb. 3.14:** Auszug aus der während der Phasenberechnung erstellten Protokolldatei und Schema zur Verdeutlichung der Anordnung der sechs gefundenen Quecksilber-Positionen in zwei Gruppen. Die Positionen eines Monomers sind jeweils in einer Farbe markiert.



Eine genauere Betrachtung der Abstandsvektoren zwischen den einzelnen Atomen erlaubt Rückschlüsse auf ähnliche Anordnungen von Atomgruppen und damit auch auf die nicht-kristallographische Symmetrie innerhalb der asymmetrischen Einheit. Mit Hilfe der obigen Kreuzworttabelle lässt sich zeigen, dass je drei Quecksilberatome in zwei nahezu identischen Gruppen angeordnet sind, folglich also zwei Moleküle pro asymmetrischer Einheit vorliegen müssen. Diese Symmetrie innerhalb der Atompositionen bestätigt die Annahme, dass die gefundene Lösung korrekt ist. Der zuvor abgeschätzte Lösungsmittelgehalt liegt mit zwei Molekülen pro asymmetrischer Einheit bei 56.5%, der Matthews Koeffizient bei  $2.83 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ .

#### 3.7.2.4 Phasenberechnung und Dichtemodifikation

Aus den gefundenen Quecksilberatompositionen, den zuvor berechneten  $F_A$ -Werten und den nativen Struktur Faktoren konnte nun ebenfalls über eine Harker-Konstruktion (Harker 1956) eine erste Elektronendichtekarte des Proteins berechnet werden. Diese Elektronendichte erlaubte eine relativ sichere Unterscheidung zwischen Protein- und Lösungsmittelbereichen, ließ aber noch keine sekundären Strukturelemente erkennen. Die Anwendung von *solvent flattening* in Kombination mit *histogram matching* (Cowtan 1994) führte aber zu einer deutlichen Verbesserung der Elektronendichte, die dann auch bereits für einige Regionen des Enzyms  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter erahnen ließ (siehe Abb. 3.15). Eine Interpretation der Dichte bezüglich des Verlaufs der Hauptkette war jedoch nur sehr eingeschränkt möglich.



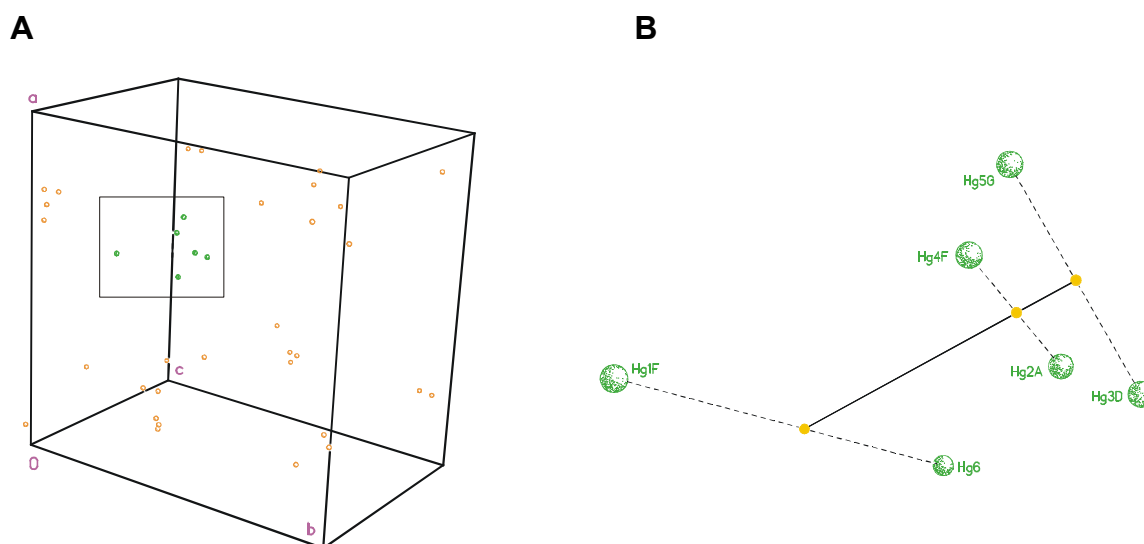
**Abb. 3.15:**  $3.2 \text{ \AA}$   $F_o \cdot f_o$  m Elektronendichtekarte von *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A'' in der Raumgruppe  $P2_12_12$ , konturiert bei  $1.5 \sigma$ , dargestellt mit dem Programm XtalView (McRee 1999). Beide Abbildungen zeigen die gleiche Region des Proteins (Durchmesser:  $45 \text{ \AA}$ ); blau: experimentelle Elektronendichte, berechnet über eine Harker-Konstruktion mit Hilfe der Quecksilber-SIRAS  $F_A$ -Daten; rot: Elektronendichte nach Verbesserung der Phasen durch *solvent flattening* und *histogram matching* mit dem Programm DM (Cowtan 1994).

### 3.7.2.5 Mittelung über nicht-kristallographische Symmetrie

Wie durch die Auswertung der Kreuzwortttabelle gezeigt werden konnte, existieren in der asymmetrischen Einheit dieser Kristallform zwei unabhängige Moleküle der AmyA<sup>''</sup>. Diese nicht-kristallographische Symmetrie kann in die Dichtemodifikation einbezogen werden und so zu einer erheblichen Verbesserung der erhaltenen Phasen und der daraus resultierenden Elektronendichte führen. Als Informationen werden dazu die Matrix benötigt, die eine unabhängige Domäne in die verwandte Domäne überführt, sowie eine Maske, die beschreibt in welchem Volumen die Elektronendichte als äquivalent anzusehen ist.

#### 3.7.2.5.1 Bestimmung der NCS-Matrix

Die von SHELXD gefundenen Quecksilberatome waren nicht so in der asymmetrischen Einheit angeordnet, dass die NCS direkt zu erkennen gewesen wäre. Aus diesem Grund wurden mit dem Programm XP (Sheldrick 1997) zunächst die Symmetrieäquivalente erzeugt, die untereinander die kürzesten Abstände aufwiesen. Die erhaltenen sechs Atompositionen bestätigen die bereits aus der Kreuzwortttabelle abgeleitete Anordnung von zwei Gruppen mit jeweils drei Quecksilberionen und lassen die zweizählige Achse erkennen, über die diese miteinander verknüpft sind (vergl. Abb 3.16).



**Abb. 3.16:** Aus den SIRAS Daten gefundene Quecksilberpositionen in der orthorhombischen Kristallform der AmyA<sup>''</sup>; **A** zeigt die äquivalenten Atomlagen in der gesamten Elementarzelle; die zur Berechnung der NCS-Matrix verwendeten Metallionen sind grün eingefärbt; **B**: Vergrößerung der unabhängigen Positionen aus **A**, identische Orientierung. Durch Zentrierung der jeweils verwandten Quecksilberlagen (gelb dargestellt) und Verbindung dieser Positionen lässt sich die nicht-kristallographische zweizählige Achse sichtbar machen.

Mit dem Programm LSQKAB (Kabsch 1976) wurden nun die drei unabhängigen Atompositionen einer Gruppe nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate auf den ihnen

äquivalenten Atomen der zweiten Gruppe superpositioniert. Das Programm liefert als Ergebnis die Differenzen der Lagen äquivalenter Atome nach der Überlagerung sowie die in eine Rotations- und eine Translationskomponente aufgetrennte NCS-Matrix zur Überführung von Gruppe 1 in Gruppe 2.

Im polaren System ergeben sich für die Rotationskomponente Winkel von  $\omega = 78.67^\circ$ ,  $\varphi = -126.93^\circ$  und  $\chi = 177.79^\circ$ , der Translationsvektor entlang der orthonormalen Achsen setzt sich zusammen aus  $x = -1.025 \text{ \AA}$ ,  $y = 49.433 \text{ \AA}$ ,  $z = 194.559 \text{ \AA}$ . Daraus lässt sich zweierlei ableiten: Der nahe an  $180^\circ$  liegende Wert für  $\chi$  zeigt an, dass die beiden unabhängigen Moleküle durch eine (annähernd) zweizählige Achse ineinander überführt werden können. Eine erneut berechnete Selbstrotationsfunktion der Sektion  $\kappa = 177.79^\circ$  mit den auch zuvor verwendeten Parametern lässt diese Symmetrie jedoch nicht erkennen. Gleichzeitig belegen die ‚schiefen‘ Winkel  $\omega$  und  $\varphi$ , dass diese Achse nicht parallel zu einer der kristallographischen zweizähligen Achsen verläuft. Ein Translationspeak in einer der Harker-Ebenen der nativen Patterson-Funktion wäre also nicht zu erwarten gewesen.

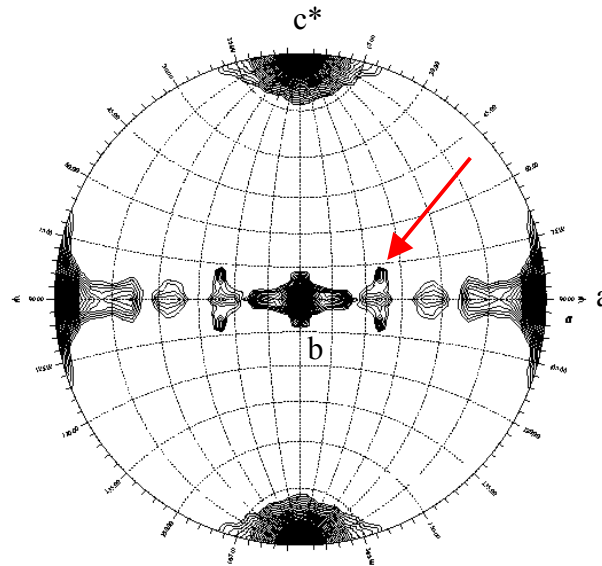
Die maximale Abweichung äquivalenter Atomlagen ist mit  $0.172 \text{ \AA}$  für das Atompaar A3 - B3 relativ gering, so dass von einer weitgehenden Einhaltung der nicht-kristallographischen Symmetrie ausgegangen werden kann.

**Tab. 3.4:** Differenzen zwischen den Positionen äquivalenter Schweratome nach der Superposition mit dem Programm LSQKAB (Kabsch 1976).

Atompaar	Differenz [ $\text{\AA}$ ]
A1 - B1	0.038
A2 - B2	0.143
A3 - B3	0.172

Nach Anpassung der Parameter der Selbstrotationsfunktion gelang es schließlich, die oben beschriebene, zweizählige Achse in der Sektion  $\kappa = 178^\circ$  zu detektieren. Dazu wurde die verwendete Auflösung auf den Bereich von  $10 - 4 \text{ \AA}$  begrenzt, der Integrationsradius von  $35$  auf  $30 \text{ \AA}$  reduziert und die Konturierung in sehr kleinen Schritten von  $10$  relativen Einheiten (Maximum:  $999$ ) mit einem Schwellenwert von  $200$  durchgeführt. Abbildung 3.17 zeigt, dass in der  $ab$ -Ebene der erhaltenen Selbstrotationsfunktion mehrere Maxima mit geringer Intensität auftreten, während dies für die Ebenen  $ac^*$  und  $bc^*$  nicht der Fall ist. Die nicht-kristallographische zweizählige Achse weicht mit einem Winkel von  $\omega = 78.67^\circ$  lediglich

$11.33^\circ$  aus der ab-Ebene ab und liegt mit  $\varphi = -126.93^\circ$  ( $= 53.07^\circ$ ) ungefähr mittig zwischen den kristallographischen zweizähligen Achsen entlang a und b. Es ist zu vermuten, dass die ab-Ebene so stark von der Symmetrie der kristallographischen zweizähligen Achsen dominiert wird, so dass die wesentlich schwächer ausgeprägte nicht-kristallographische Achse nur als sehr schwaches Maximum auftritt und im Rauschen nahezu verschwindet.

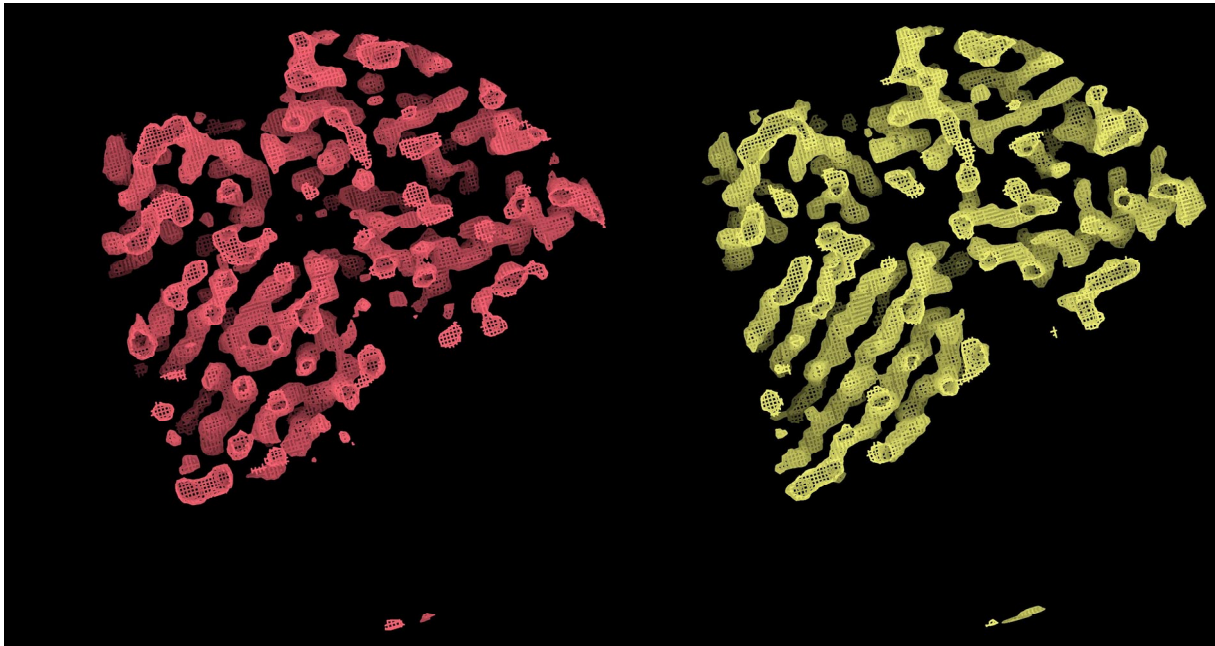


**Abb. 3.17:** Selbstrotationsfunktion der Sektion  $\kappa = 178^\circ$ , minimaler Konturlevel: 200, Schritte von 10 relativen Einheiten (Maximum: 999), Auflösungsbereich 10 - 4 Å, Integrationsradius 30 Å. Der Pfeil zeigt das Maximum für die aus den Schweratompositionen abgeleitete nicht-kristallographische Rotation mit den Winkeln  $\omega = 78.67^\circ$  und  $\varphi = -126.93^\circ$ .

#### 3.7.2.5.2 Berechnung der modifizierten Dichte

Eine weitere Verbesserung der experimentellen Phasen konnte nun mit dem Programm DM (Cowtan 1994) erreicht werden, indem das zuvor bereits eingesetzte *solvent flattening* nicht nur mit *histogram matching*, sondern zusätzlich mit *NCS averaging* kombiniert wurde. Neben der NCS-Matrix ist dazu die Maske erforderlich, die das zu mittelnde Volumen innerhalb der asymmetrischen Einheit definiert. Diese wurde aus der vorliegenden Elektronendichte von einem in DM implementierten *local-correlation-masking* Algorithmus automatisch generiert und während der Dichtemodifikation alle zwei Zyklen aktualisiert. Als Startwerte der Phasen wurden wiederum die zuvor mit der Harker-Konstruktion berechneten Werte verwendet.

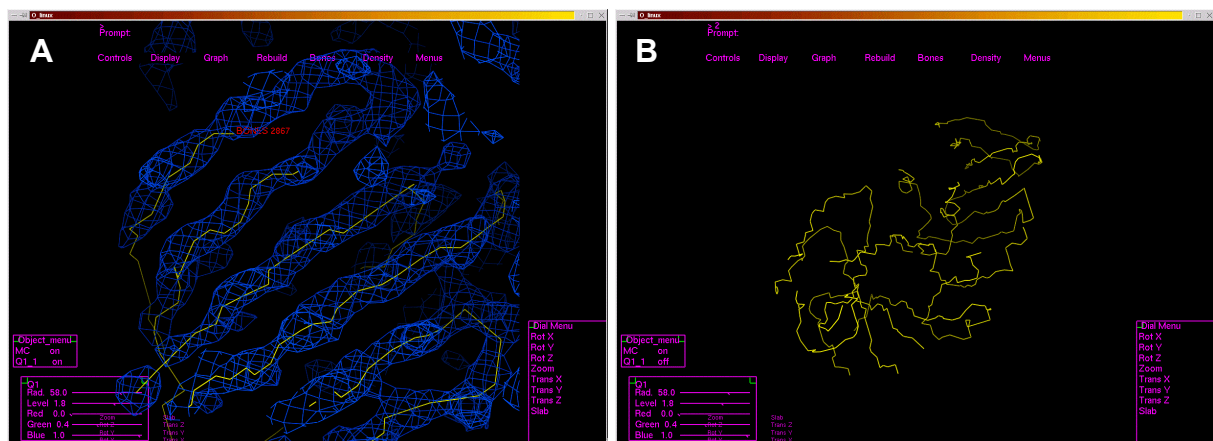
Die nach 100 Zyklen erhaltene Dichte lässt für weite Bereiche des Proteins den Verlauf der Hauptkette eindeutig erkennen, Strukturelemente wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter treten deutlich hervor (vergl. Abb. 3.18).



**Abb. 3.18:**  $3.2 \text{ \AA}$   $F_0 \cdot f_{\text{om}}$  Elektronendichtekarte von *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A'' in der Raumgruppe  $P2_12_12$ , konturiert bei  $1.5 \sigma$ , dargestellt mit dem Programm XtalView (McRee 1999). Beide Abbildungen zeigen die gleiche Region des Proteins wie Abb. 3.15 (Durchmesser:  $45 \text{ \AA}$ ); rot: Elektronendichte nach Verbesserung der Phasen ohne *NCS averaging* (identisch mit Abb. 3.15); gelb: Elektronendichte nach Modifikation mit zweifachem *NCS averaging*. Links unten ist ein  $\beta$ -Faltblatt zu sehen, schräg rechts darüber verläuft eine  $\alpha$ -Helix, die bereits die Ausrichtung von Seitenketten erkennen lässt.

### 3.7.2.6 Erstellung eines ersten Modells

Mit dem Programm BONES (Jones *et al.* 1991) konnte nun ein einfaches Proteingerüst automatisch in die erhaltene Elektronendichte gelegt werden, das nach einigen manuellen Korrekturen und Erweiterungen mit dem Grafikpaket O (Jones *et al.* 1991) den Verlauf der Hauptkette von etwa 80% der AmyA'' eindeutig beschreibt. Abbildung 3.19 zeigt das generierte, noch nicht manipulierte Skelett in der Elektronendichte sowie eine Übersicht der soweit erkennbaren Tertiärstruktur der AmyA''.



**Abb. 3.19:** Screenshots des Programms O (Jones *et al.* 1991) **A:** Elektronendichte nach Modifikation mit *solvent flattening*, *histogram matching* und *NCS averaging*,  $F_0 \cdot f_{\text{om}}$ , konturiert bei  $1.8 \sigma$ , Auflösung  $3.2 \text{ \AA}$ . **B:** Überblick über die mit BONES automatisch generierte Tertiärstruktur der AmyA''.

Nach Umwandlung des korrigierten Proteinskeletts in eine pdb-Datei (CCP4 1994) wurden mit dem Programm Xfit (McRee 1999) manuell  $C_{\alpha}$ -Positionen entlang der Kette platziert. Diese wurden dann wieder in O (Jones *et al.* 1991) eingelesen und automatisch zu einem poly-Alaninmodell des soweit erkennbaren Monomers ergänzt. Da die Anordnung der zwei Monomere zueinander in der orthorhombischen Kristallform aus den äquivalenten Quecksilberpositionen bekannt war, konnte aus diesem Monomer schließlich das in der asymmetrischen Einheit vorliegende Dimer generiert werden (Kabsch 1976). Eine eventuell mögliche Erweiterung dieses Modells bezüglich der Seitenketten oder gar Verfeinerung der Atompositionen und Auslenkungsparameter wurde aufgrund der geringen Auflösung von 3.2 Å nicht vorgenommen. Stattdessen wurde das erhaltene Modell in die monoklinen Daten übertragen und dort weiter verfeinert.

### 3.7.2.7 Betrachtung der monoklinen Kristallform

Wie in Kapitel 3.4 angesprochen, kommt es durch die Zugabe eines PEG 4000 enthaltenden Kryoprotektanden zu Kristallen der AmyA'' zu einem Phasenübergang von der orthorhombischen in eine monokline Kristallform, die mit einer Schrumpfung der Elementarzelle einhergeht (vergl. Kap. 3.6.1). Durch diesen Prozess nimmt die Streukraft der Kristalle erheblich zu, so dass hochaufgelöste Daten nur von dieser Kristallform gesammelt werden konnten (vergl. Tab. 3.2, Datensätze **1** und **8**). Bei einem Zellvolumen von 1 133 015 Å<sup>3</sup> ergeben sich abhängig von der Anzahl der Moleküle pro asymmetrischer Einheit folgende Matthews-Koeffizienten und Lösungsmittelanteile im Kristall:

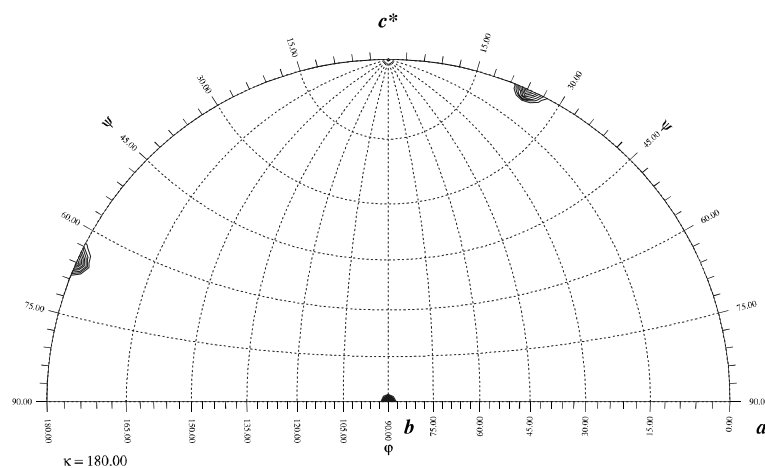
**Tab. 3.5:** Zusammenhang des Matthews Koeffizienten und des Lösungsmittelanteils mit der Anzahl der Moleküle je asymmetrischer Einheit für die monokline Kristallform der AmyA''.

Anzahl Moleküle / asym. Einheit	Matthews Koeffizient [Å <sup>3</sup> /Da]	Lösungsmittelanteil im Kristall [%]
2	4.72	73.9
3	3.15	61.0
4	2.36	47.9
5	1.89	34.9

Bedenkt man, dass in der orthorhombischen Kristallform mit zwei Molekülen pro asymmetrischer Einheit der Lösungsmittelgehalt bei 56.5% liegt und diese monokline Modifikation durch Schrumpfung und Verschiebung der Elementarzelle daraus hervorgeht, so liegt die Vermutung nahe, dass vier Moleküle der Amylase pro asymmetrische Einheit existieren. Ist dies der Fall, so hätte der Lösungsmittelgehalt im Kristall durch die Kryo-

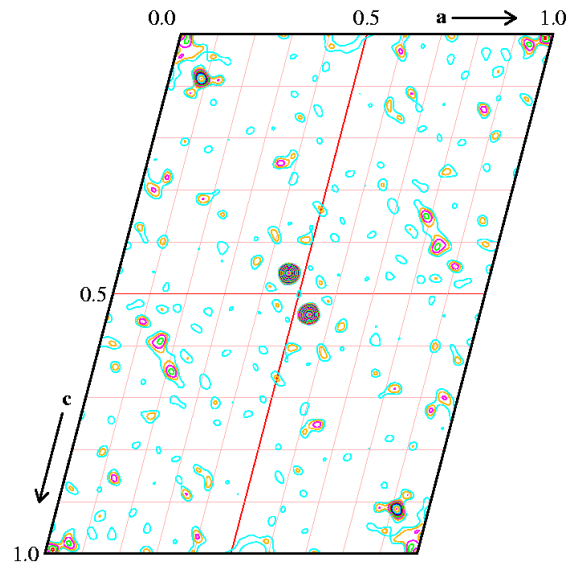
Behandlung mit PEG 4000 um nahezu neun Prozentpunkte abgenommen. Diese Annahme ist konsistent mit der beobachteten Veränderung der Kristallmorphologie während der Kryrotektion (vergl. Kap. 3.4) und erklärt gleichzeitig die höhere Streukraft der monoklinen Kristalle gegenüber der orthorhombischen Form.

Die Selbstrotationsfunktion der Sektion  $\kappa = 180^\circ$  zeigt zwei starke Maxima mit den Koordinaten  $\varphi = 0^\circ$ ,  $\psi = 24^\circ$  und  $\varphi = 180^\circ$ ,  $\psi = 66^\circ$  mit einer Höhe von jeweils  $20.56\sigma$  (siehe Abb. 3.20). Diese Maxima lassen sich durch eine zweizählige nicht-kristallographische Achse erklären, die senkrecht auf der kristallographischen  $2_1$ -Schraubenachse ( $\varphi = 90^\circ$ ,  $\psi = 90^\circ$ ) steht, die ihrerseits die zweite, nicht-kristallographische zweizählige Achse erzeugt.



**Abb. 3.20:** Selbstrotationsfunktion der monoklinen Kristallform der AmyA'' mit  $\kappa = 180^\circ$ . Die Berechnung wurde mit einer Auflösung von  $3.5 \text{ \AA}$  und einem Integrationsradius von  $35 \text{ \AA}$  durchgeführt. Die niedrigste Konturierungsstufe beträgt 40% des höchsten Maximums, die Schrittweite 5 Prozentpunkte. Das Maximum auf  $\varphi = 90^\circ$  und  $\psi = 90^\circ$  (unten mittig) repräsentiert die kristallographische  $2_1$ -Schraubenachse, die Maxima mit  $\varphi = 0^\circ$  und  $\varphi = 180^\circ$  zwei äquivalente, nicht-kristallographische zweizählige Achsen.

Einen Hinweis auf weitere nicht-kristallographische Symmetrie liefert die native Patterson-Funktion in der Ebene  $y = 0$ . Wie in Abbildung 3.21 ersichtlich, existiert auf den Koordinaten  $x = 0.458$ ,  $y = 0$ ,  $z = 0.461$  ein starkes Maximum mit einer Höhe von  $28.48 \sigma$ . Da es sich in  $P2_1$  bei der Ebene mit  $y = 0$  nicht um einen Harker-Schnitt handelt, in dem Maxima auftreten, die sich aus kristallographisch äquivalenten Atomlagen ergeben (dies wäre bei  $y = 0.5$  der Fall), muss der angesprochene *peak* das Resultat einer nicht-kristallographischen Symmetrie sein.



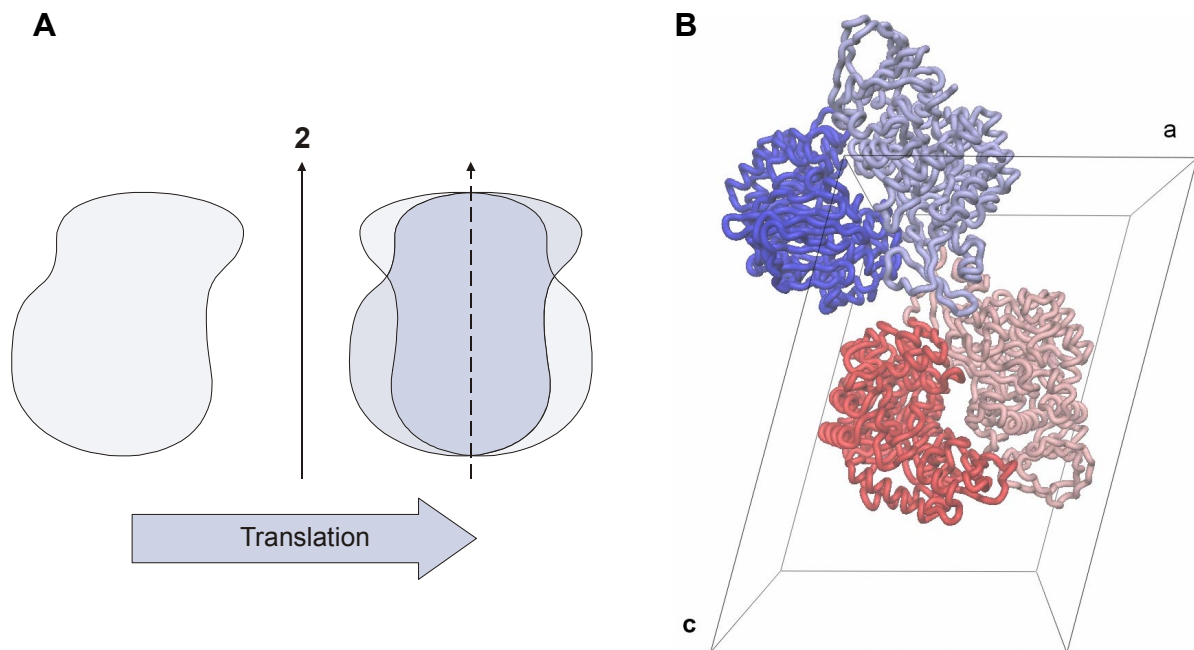
**Abb. 3.21:** Patterson-Sektion der AmyA' mit  $y = 0$  in der Raumgruppe  $P2_1$ . In die Berechnung wurden Daten bis zu einer Auflösung von  $3 \text{ \AA}$  einbezogen, das Kontur-Intervall beträgt  $1\sigma$ , der Ursprungspik wurde entfernt. Das Maximum auf den Koordinaten  $x = 0.458$ ,  $y = 0$ ,  $z = 0.461$  hat eine Höhe von  $28.48\sigma$ .

Aufgrund der Höhe und Schärfe des Maximums wurde anfänglich davon ausgegangen, dass es sich hier um eine reine Translation eines Moleküls bzw. Dimers mit  $\Delta y = 0$  handeln müsse. In Kombination mit der zweizähligen nicht-kristallographischen Achse, die aus der Selbstrotationsfunktion abgeleitet werden konnte, ergäben sich so zwei Dimere pro Zelle. Damit würde sich die nach Berechnung des Matthews-Koeffizienten gemachte Annahme von vier unabhängigen Molekülen bestätigen.

Bei genauerer Betrachtung der nativen Patterson-Funktion fällt jedoch auf, dass eine Verbindungslinie vom Ursprung der Zelle zu dem beobachteten Maximum mit der Zellkante  $a$  einen Winkel von exakt  $66^\circ$  aufspannt, eine in der Ebene darauf senkrechte stehende Gerade dementsprechend von  $24^\circ$ . Diese Werte gleichen den aus der Selbstrotationsfunktion erhaltenen Winkeln für  $\psi$  und deuten damit an, dass obiges Maximum nicht aus einer Translation, sondern der beobachteten Rotation resultieren könnte. Dies ist indes aber nur möglich, wenn zwei weitere Bedingungen erfüllt sind: Damit der *peak* in  $y = 0$  erscheint, muss die zweizählige NCS-Achse annähernd in der  $xz$ -Ebene verlaufen, in der auch die Massenschwerpunkte der unabhängigen Monomere bzw. Dimere liegen. Andernfalls träte eine Verschiebung des Maximums in  $y$ -Richtung um den Faktor  $2(y_{\text{Achse}} - y_{\text{Massenschwerpunkt}})$  ein. Weiterhin muss die Form des „unabhängigen“ Monomers bzw. Dimers ungefähr einer zweizähligen Symmetrie gehorchen, deren Achse parallel der betrachteten nicht-kristallographischen zweizähligen Achse verläuft. Diese Bedingung sollte für globuläre Proteine bei niedriger Auflösung zumindest soweit erfüllt sein, dass ein kleiner Pseudotranslationspeak



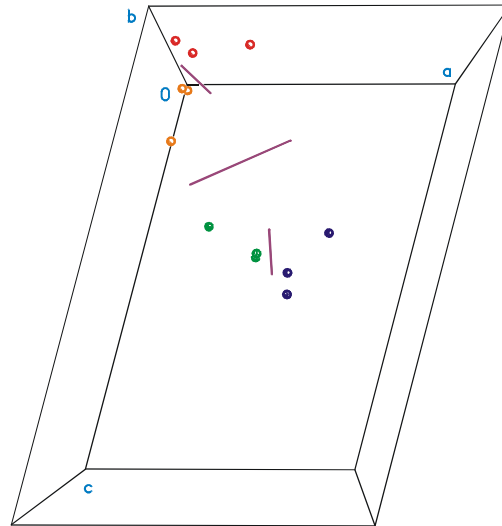
entstehen kann. Abbildung 3.22:A verdeutlicht den beschriebenen Zusammenhang zwischen Translation und Rotation in zwei Dimensionen, Abbildung 3.22:B zeigt die tatsächliche, später gefundene Lage der Proteinmoleküle in der Elementarzelle. Es ist klar zu erkennen, dass sich das blau eingefärbte Dimer über die beschriebene zweizählige NCS-Achse auf dem roten Dimer abbilden lässt. Ebenso würde aber auch eine Translation zu einer weitgehenden Deckung der Dimere führen.



**Abb. 3.22:** A: Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Translation und zweizähliger, nicht-kristallographischer Rotationsymmetrie. Die hellen Bereiche lassen sich durch die zweizählige NCS-Achse ineinander überführen, das translatierte Molekül ist mittelblau eingefärbt. Der dunkelblaue Bereich markiert den Teil des Moleküls, der durch eine Rotation und eine Translation superpositioniert werden würde. B: Tatsächliche Anordnung der vier kristallographisch unabhängigen Moleküle in der Elementarzelle. Die y-Koordinate des Massenschwerpunktes der zwei Dimere ist nahezu identisch.

Die Bildung des Maximums in der nativen Patterson-Funktion durch eine Rotation bedeutet jedoch auch, dass nicht die nach Berechnung des Matthews-Koeffizienten vermutete vierfache, sondern lediglich zweifache NCS gefunden werden konnte. Da aber die in der orthorhombischen Kristallform vorliegende nicht-kristallographische, zweizählige Achse kein starkes Maximum in der Rotationsfunktion erzeugt, ist anzunehmen, dass diese Achse auch in der monoklinen Kristallform nicht deutlich hervortritt. Die Möglichkeit, dass nur zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit vorliegen, konnte aufgrund des damit verbundenen hohen Lösungsmittelgehaltes von 73.9% ausgeschlossen werden.

Die Existenz der beschriebenen zweizähligen Achse konnte schließlich anhand von Quecksilberatomen nachgewiesen werden, deren Positionen aus dem anomalen Signal des Datensatzes **3** bestimmt wurden. Abbildung 3.23 zeigt die Lage dieser Schweratome in der monoklinen Elementarzelle sowie die zweizähligen nicht-kristallographischen Achsen, die sie ineinander überführen. Die beschriebene Pseudotranslation ist anhand dieser Skizze hingegen nicht nachzuvollziehen.



**Abb. 3.23:** Quecksilberpositionen und nicht-kristallographische, zweizählige Symmetrieachsen in der monoklinen Zelle der AmyA'', bestimmt anhand der anomalen  $\Delta F$ -Werte aus Datensatz **3**.

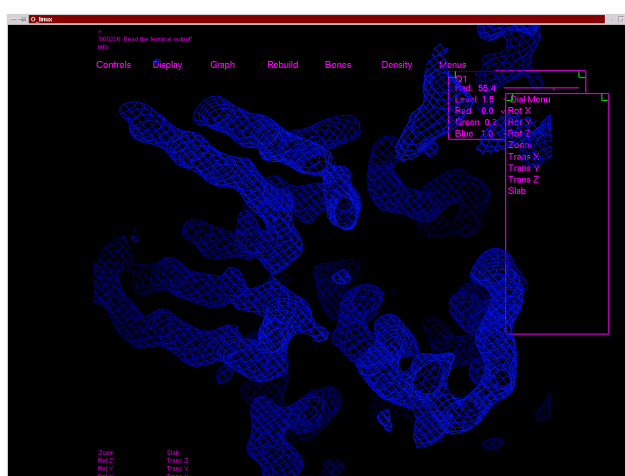
#### 3.7.2.8 *Molecular Replacement*

Das in der orthorhombischen Zelle generierte poly-Alaninmodell eines Dimers der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A'' wurde nun als Suchfragment für eine Strukturlösung nach der Methode des *molecular replacement* in den monoklinen Daten verwendet. Mit dem Programm EPMR (Kissinger *et al.* 1999) wurde eine sechsdimensionale Suche durchgeführt, in der die Rotation und Translation des eingesetzten Modells gleichzeitig variiert werden. Die Auflösung der Daten wurde dabei auf den Bereich zwischen 12.0 und 4.0 Å beschränkt, die Populationsgröße von dem Standardwert 300 auf 1000 und die Anzahl der zu berechnenden Generationen von 50 auf 100 angehoben. Da das Suchmodell bereits aus zwei Monomeren zusammengesetzt war, wurde lediglich nach zwei und nicht nach vier unabhängigen Lösungen gesucht. Für alle weiteren Parameter wurden die in der Version 2.5 vorgegebenen Standardwerte verwendet.

Die Suche ergab einen maximalen Korrelationskoeffizienten von 11.2% für das erste und 20.6% für beide Dimere zusammen, die dazugehörigen R-Werte lagen bei 67.6% bzw. 65.7%.

Diese extrem schlechten Werte deuteten eher auf eine zufällige denn eine tatsächlich korrekte Orientierung der Dimere hin. Da die obigen Lösungen aber in nahezu jedem Versuch erhalten wurden und die zuvor gefundene, zweizählige NCS-Achse erkennen ließen, konnte davon ausgegangen werden, dass die Platzierung der Moleküle korrekt war. Eine Überprüfung der Lösungen war zudem mit Hilfe der 12 Schweratompositionen möglich, die aus den anomalen Differenzen des Datensatzes **3** bestimmt werden konnten (vergl. Abb. 3.23). Diese erlaubten ebenfalls die Orientierung des in der orthorhombischen Zelle generierten Strukturmodells in der monoklinen Zelle, wurden aber lediglich zur Verifizierung verwendet, da die Genauigkeit der Quecksilberpositionen aufgrund der mäßigen Datenqualität von **3** als relativ gering eingestuft wurde. Ferner wurde davon ausgegangen, dass möglichen Unterschieden zwischen der orthorhombischen und der monoklinen Kristallform, die beispielsweise während der Kryo-Behandlung aufgetreten sein könnten, mit einer MR-Lösung besser Rechnung getragen werden könnte.

Im Anschluss an die Positionierung des Suchmodells wurde mit dem Programm REFMAC (Murshudov *et al.* 1997) eine erste Verfeinerung mit je einem poly-Alanin Monomer als starre Gruppe bei einer Auflösung von  $d \geq 4.0 \text{ \AA}$  durchgeführt, die jedoch keine signifikante Verbesserung des kristallographischen R-Faktors zur Folge hatte. Die erhaltene Elektronendichte ist in Abbildung 3.24 dargestellt. Die Sekundär- und Tertiärstruktur des Modells ist deutlich erkennbar, eine Identifikation einzelner Aminosäuren ist bei dieser Auflösung jedoch nicht möglich.



**Abb. 3.24:** Elektronendichte ( $F_o \cdot f_{om}$ , konturiert bei  $1.5\sigma$ ) in der monoklinen Raumgruppe  $P2_1$  nach Verfeinerung der vier Monomere als starre Gruppen. Die Auflösung während der Verfeinerung wurde auf  $4.0 \text{ \AA}$  begrenzt, für die Berechnung der Phasen wurden jedoch alle Reflexe bis  $1.75 \text{ \AA}$  in die Fouriertransformation einbezogen. Auf der linken Seite ist ein  $\beta$ -Faltblatt erkennbar, rechts unten eine  $\alpha$ -Helix.

Zur Zuweisung der Peptidsequenz und anschließenden Verfeinerung der individuellen Atompositionen und Auslenkungsparameter war es also notwendig, die Auflösung möglichst effektiv bis zu den gemessenen 1.75 Å zu erweitern. Eine einfache Phasenerweiterung in Kombination mit *solvent flattening* und *histogram matching* führte zu keiner sichtbaren Verbesserung der Elektronendichte, so dass wiederum die nicht-kristallographische Symmetrie ausgenutzt wurde. Da in der monoklinen Raumgruppe  $P2_1$  vier unabhängige Moleküle existieren, konnte dementsprechend mit vierfacher NCS gearbeitet werden, was in Kombination mit der höheren Auflösung die Resultate im Vergleich zu der zweifachen NCS in  $P2_12_12$  deutlich verbessern sollte.

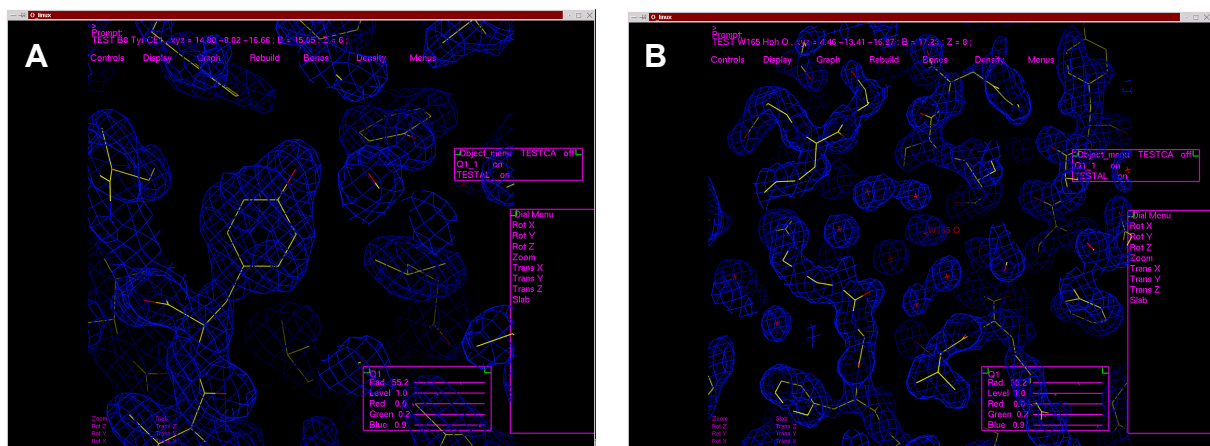
#### 3.7.2.9 Mittelung über vierfache nicht-kristallographische Symmetrie

Zunächst wurden mit dem Programm LSQKAB (Kabsch 1976) erneut die Matrizen berechnet, mit denen eines der vier Moleküle (im weiteren Verlauf als Molekül A bezeichnet) auf sich selbst sowie auf die anderen drei Monomere abgebildet werden kann (vergl. Kap. 3.7.2.5). Die eigentliche Dichtemodifikation wurde dann wie auch im orthorhombischen Fall mit dem Programm DM (Cowtan 1994) durchgeführt, wobei das verwendete Protokoll aber in drei entscheidenden Punkten verändert wurde:

1. Anstatt die Maske, innerhalb derer die Elektronendichte gemittelt wird, von DM automatisch berechnen und verfeinern zu lassen, wurde mit dem Programm NCSMASK (CCP4 1994) eine starre Maske generiert und anschließend in DM eingelesen. Als Vorlage diente dazu das Strukturgerüst aus Molekül A. Der Abstand der Maske um dieses Modell wurde auf 5 Å festgesetzt.
2. Für die Dichtemodifikation in  $P2_12_12$  wurden von Beginn an sämtliche gemessenen Reflexe in die Berechnungen einbezogen. Dies war insofern sinnvoll, als dass hier keine ausgeprägte Erweiterung der Phasen zu hoher Auflösung angestrebt wurde und auf diese Weise mehr Informationen in die Kalkulationen einfließen konnten. In der monoklinen Raumgruppe ist nutzbare Phaseninformation jedoch nur bis zu einer Auflösung von etwa 4 Å vorhanden, infolge des noch äußerst einfachen Proteinmodells aber bereits mit großen Ungenauigkeiten behaftet. Aus diesem Grund wurde die Auflösung der Daten zu Beginn der Dichtemodifikation auf 8.0 Å beschränkt und mit jedem Zyklus langsam bis zu 1.75 Å erweitert (*keyword scheme res from 8.0*).
3. Da die Phasenerweiterung über einen Auflösungsbereich von mehr als 6 Å stattfinden sollte, wurde die Anzahl der zu rechnenden Zyklen auf 500 erhöht (**NCYCLe 500**). Dies

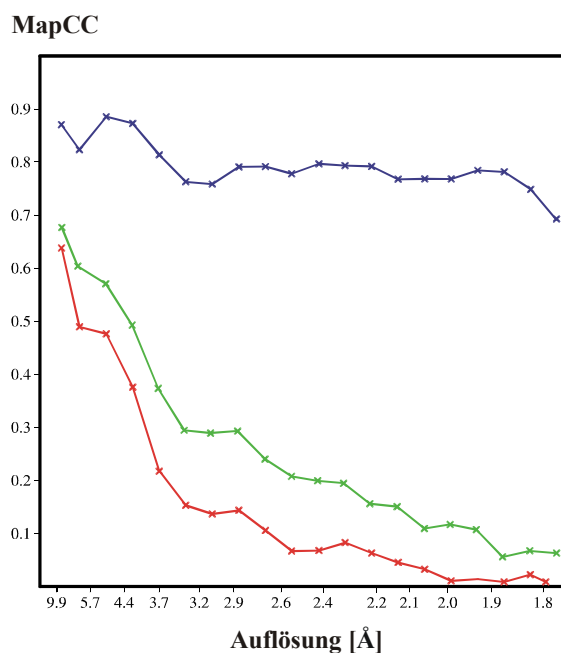
garantiert, dass in jedem einzelnen Schritt nur relativ wenig neue Reflexe zu dem bestehenden Satz hinzukommen und so eine langsame, aber damit auch exaktere Erweiterung der Phasen stattfindet.

Sämtliche Versuche, einzelne der besprochenen Parameter zu optimieren, etwa um die Berechnungen zu beschleunigen, führten zu weniger klaren Ergebnissen und wurden demzufolge wieder verworfen. Die letztlich erhaltene Elektronendichte ist für große Bereiche des Enzyms eindeutig und erlaubt bei einem  $\sigma$ -Level von 1.0 die Identifikation von Seitenketten und sogar die Zuweisung gut fixierter Wassermoleküle in inneren Regionen des Proteins (vergl. Abb. 3.25).



**Abb. 3.25:** Aus Dichtemodifikation mit DM (Cowtan 1994) nach *solvent flattening*, *histogram matching* und 4-fachem *NCS averaging* resultierende Elektronendichte ( $F_o \cdot \text{fom}$ ,  $d_{\min} = 1.75 \text{ \AA}$ , konturiert bei  $1.0\sigma$ , dargestellt mit O (Jones *et al.* 1991)). Das gezeigte Modell entspricht der finalen Verfeinerung. **A:** Tyrosin-Seitenkette **B:** präzise definierte Wassermoleküle in inneren Bereichen des Proteins.

Die Güte der berechneten Phasen und das Potential der Dichtemodifikation in Kombination mit vierfacher Mittelung über nicht-kristallographische Symmetrie lassen sich zudem anhand des Elektronendichte-Korrelationskoeffizienten ausdrücken, der relativ zu der fertig verfeinerten Struktur berechnet werden kann. Abbildung 3.26 zeigt, dass die Phasen vor der Dichtemodifikation (grün dargestellt) bei niedriger Auflösung zwar noch akzeptabel sind, jedoch bereits ab ca.  $3.5 \text{ \AA}$  kaum noch signifikante Information enthalten. Während eine Phasenerweiterung ohne *NCS averaging* (rote Kurve) noch zu einer Verschlechterung des *map correlation coefficient* über den gesamten Auflösungsbereich führt, kann dieser mit Hilfe der NCS deutlich verbessert werden (blaue Kurve). Bemerkenswert ist dabei, dass der Korrelationskoeffizient selbst bei hoher Auflösung, für die anfangs praktisch keine Phaseninformation vorhanden war, kaum abfällt.



**Abb. 3.26:** Elektronendichte-Korrelationskoeffizient zwischen den experimentellen und den aus der finalen Verfeinerung erhaltenen Phasen in Abhängigkeit der Auflösung. grün: CC nach *rigid body* Verfeinerung bei 4.0 Å, jedoch ohne anschließende Phasenerweiterung in DM; blau: CC nach beschriebener Phasenerweiterung mit DM (*solvent flattenig*, *histogram matching*, 4-faches *NCS averaging*); rot: identisch mit blau, lediglich die vierfache NCS wurde nicht berücksichtigt.

### 3.8 Generierung eines ersten Strukturmodells

Ein erstes atomares Modell der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A'' konnte ausgehend von der sehr klaren, aus DM (Cowtan 1994) für Datensatz 1 erhaltenen Elektronendichte automatisch mit dem Programm ARP/wARP 5.1 (Perrakis *et al.* 1999) generiert werden. Innerhalb von 300 Zyklen wurden so 1880 aus insgesamt 2020 Aminosäuren in 23 Fragmenten erstellt, was einem Konnektivitätsindex von 0.97 entspricht und einen R-Faktor von 18.9% ergab. Einschränkend muss aber gesagt werden, dass dieses Modell nach wie vor eine Vielzahl „freier“ Atome enthielt, so dass der berechnete R-Wert dem  $R_{\text{work}}$  einer Strukturverfeinerung nicht vergleichbar ist. Seitenketten konnten anschließend ebenfalls mit dem Programm ARP/wARP (Skript *sidedock.sh*) unter Angabe der Peptidsequenz und Spezifizierung der zusammengehörenden Fragmente dem Modell hinzu gefügt werden.

Fehlende Abschnitte der Hauptkette wurden nun mit Hilfe des Programms XtalView (McRee 1999) unter Berücksichtigung der nicht-kristallographischen Symmetrie manuell eingefügt. Das entstandene Modell war bis auf einige terminale Aminosäuren bezüglich der Hauptkette komplett und konnte im Anschluss mit dem Programm Refmac5 (Murshudov *et al.* 1997) verfeinert werden.

### 3.9 Lösung der Struktur der AmyA'' im Komplex mit Acarbose

Mit der Struktur der unkomplexierten AmyA'' existiert ein sehr präzises Suchmodell, so dass die Lösung des Inhibitor-Komplexes mit der Methode des Molekularen Ersatzes erfolgen konnte und keine weiteren Datensätze erforderlich waren. Da auch die Zelle sowie die Raumgruppe der beiden Datensätze (nahezu) identisch sind, wäre es möglich, ein vereinfachtes Modell der AmyA'' nach Entfernen aller Wassermoleküle direkt als Startmodell in der Verfeinerung zu benutzen. Darauf wurde jedoch verzichtet, um eventuell existierende Unterschiede zwischen den Strukturen nicht als Fehler in das neue Modell zu übernehmen.

Aus der verfeinerten Struktur der AmyA'' ohne Inhibitor wurde ein Dimer (Moleküle A + B) erstellt, das an den Termini um jeweils 10 Aminosäuren verkürzt wurde. Sämtliche Wassermoleküle, Ionen und alle Atome mit Auslenkungsparametern  $\geq 30 \text{ \AA}^2$  wurden entfernt, das generierte Suchmodell umfasste schließlich 7475 Atome. Zur Lokalisierung der zwei unabhängigen Dimere wurde mit dem Programm EPMR (Kissinger *et al.* 1999) eine sechsdimensionale Suche durchgeführt (vergl. Kap. 2.2.1.4.3). Die verwendeten Daten wurden auf einen Auflösungsbereich von 12 bis 4  $\text{\AA}$  beschränkt, die Population wurde auf 1000 und die Anzahl der zu berechnenden Generationen auf 100 festgesetzt.

Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten bzw. R-Werte betragen 33.4 bzw. 49.2% für das erste Dimer und 68.1 bzw. 34.0% für beide Dimere. Damit war eindeutig von einer korrekten Platzierung der Dimere auszugehen, die auch anhand ihrer relativen Lage zueinander mit einem Grafikprogramm bestätigt werden konnte.

### 3.10 Strukturverfeinerung

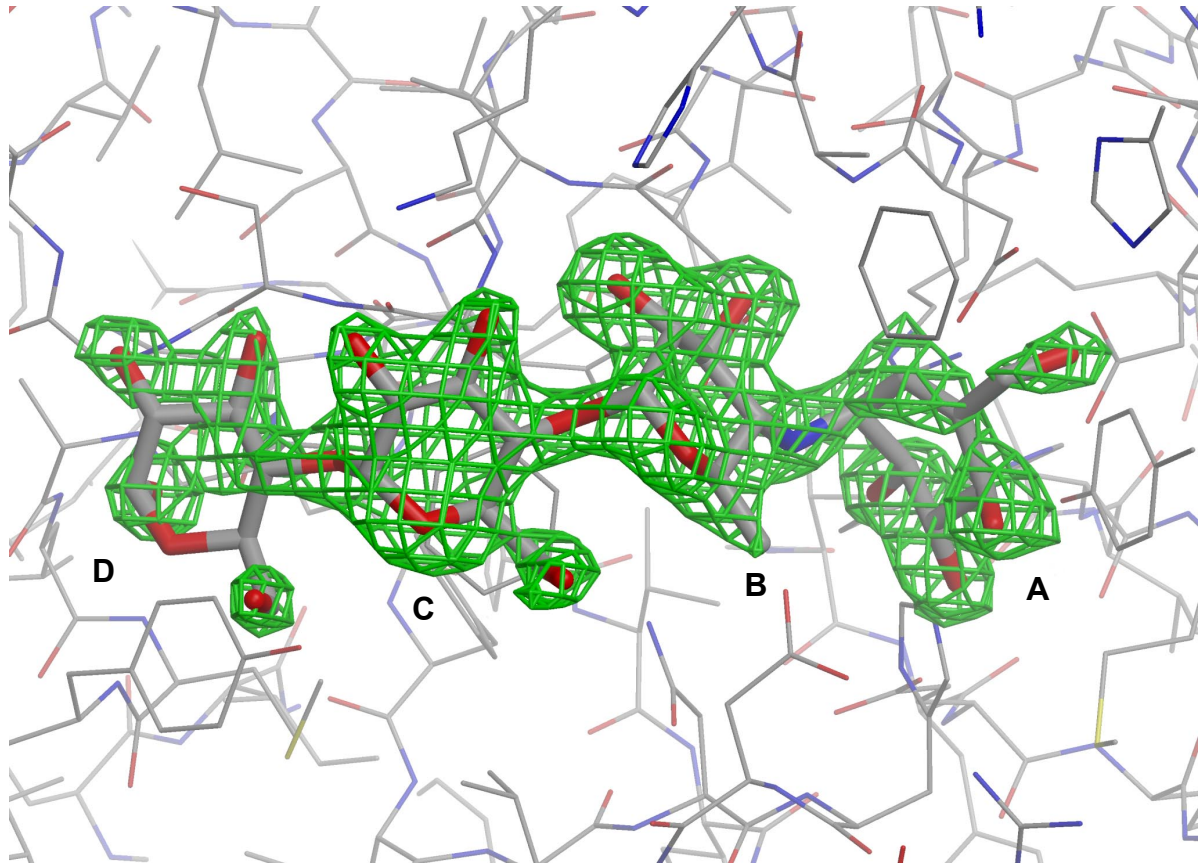
Die unbeladene Struktur der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A'' (Datensatz **1**) wurde ausschließlich mit dem Programm Refmac5 (Murshudov *et al.* 1997) unter Verwendung einer *maximum likelihood* Zielfunktion und eines *conjugate gradient* Algorithmus gegen  $|F|$  verfeinert. Dabei wurden alle Daten zwischen 20 und 1.75  $\text{\AA}$  verwendet, nachdem zuvor 5% der Reflexe mit dem Programm XPREP (Sheldrick 1997) in dünnen Schalen zur Berechnung des freien Residualwertes  $R_{\text{free}}$  markiert worden waren (Brünger 1992). Die weitere Anpassung des Modells wurde mit dem Programm XtalView (McRee 1999) manuell in einer bei  $+1\sigma$  konturierten, SigmaA-gewichteten  $2mF_o - DF_c$  sowie einer bei  $\pm 3\sigma$  konturierten  $F_o - F_c$ -Elektronendichte durchgeführt. Wassermoleküle wurden zunächst automatisch mit dem in

ARP/wARP implementierten Skript (*mode solvent*) eingefügt, jedoch im Anschluss wieder gelöscht, wenn ihr Auslenkungsparameter einen Wert von  $50 \text{ \AA}^2$  überstieg. Mit Erhalt eines nahezu vollständigen Modells wurden Wasserstoffatome in die Berechnung der Strukturfaktoren einbezogen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen konnten anhand ihrer Koordinationsgeometrie sowie der vorliegenden Elektronendichte identifiziert werden. Im Falle von Met79 wurden für das Atom  $\text{S}_8$  in allen vier Monomeren zwei alternative Positionen gefunden und mit Besetzungsfaktoren zwischen 0.4 und 0.6 verfeinert. Schließlich wurde für die beiden Dimere der asymmetrischen Einheit ein TLS-Modell angepasst (Winn *et al.* 2001). Das endgültige Modell besteht aus 2019 Aminosäuren in vier unabhängigen Polypeptidketten, 2264 vollständig besetzten Wassermolekülen und 19  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. In der Elektronendichte ist lediglich das n-terminale Met1 in der Polypeptidkette von Molekül B nicht zu erkennen. Verfeinerungsdetails sind in Tabelle 3.6 gegeben.

Da der Komplex der AmyA'' mit Acarbose (Datensatz **8**) mit der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst werden konnte, wurde in der Verfeinerung zunächst anders vorgegangen als bei der unkomplexierten Amylase. Nach Übertragung der zur Berechnung des  $R_{\text{free}}$  markierten Reflexe aus **1** auf die Daten von **8** wurden die vier unabhängigen Monomere zunächst als starre Gruppen mit dem Programm Refmac5 (Murshudov *et al.* 1997) bei einer Auflösung von  $4.0 \text{ \AA}$  verfeinert. Da das Suchmodell ein Dimer war (vergl. Strukturlösung), sollte so eine Entkopplung der einzelnen Moleküle voneinander vorgenommen werden. Eine anschließende Verfeinerung mit *torsion angle dynamics* über einen *simulated annealing* Algorithmus in CNS (Brünger *et al.* 1998) diente dazu, eventuelle Fehler des Suchmodells wie beispielsweise falsch orientierte Seitenketten oder einen unterschiedlichen Verlauf der Peptidkette zu korrigieren. Dazu wurden Daten in einem Auflösungsbereich von  $10 - 1.9 \text{ \AA}$  verwendet und die Temperatur von 2500 K in Schritten von 25 K bis auf 300 K abgekühlt. Die anschließende Verfeinerung der Atompositionen und Auslenkungsparameter in kartesischen Koordinaten wurde analog der Verfeinerung der unkomplexierten AmyA'' mit Refmac5 (Murshudov *et al.* 1997) durchgeführt. Allerdings wurden die Kriterien zur Beibehaltung automatisch platzierter Wassermoleküle in diesem Fall nicht so streng gehandhabt, da die Auslenkungsparameter innerhalb dieser Struktur generell über denen der unkomplexierten AmyA'' liegen. Die zuvor beobachtete Fehlordnung des Atoms  $\text{S}_8$  in Met79 wurde aufgrund der weniger klaren Elektronendichte nicht modelliert.



Zur Integration der Acarbose in das Strukturmodell der AmyA'' wurde eine  $F_o-F_c$ -Differenzelektronendichte berechnet, nachdem Haupt- und Seitenkettenatome sowie gut lokalisierbare Wassermoleküle in die Verfeinerung einbezogen worden waren. Abbildung 3.27 zeigt diese *omit map* für den in Molekül C komplexierten Inhibitor.



**Abb. 3.27:** Differenzelektronendichte  $F_o-F_c$  für die in Monomer C komplexierte Acarbose konturiert bei  $+2.5\sigma$ . Die Orientierung entspricht ungefähr Abb. 4.13. Die dargestellten Modelle der Acarbose sowie des Proteins sind der endgültigen Verfeinerung entnommen. Die Nummerierung der Saccharid-Einheiten entspricht der in Kapitel 4.2 vorgestellten Form. Die Glucose-Einheit D konnte nur in dem dargestellten Monomer C lokalisiert werden.

Es wird deutlich, dass die Ringe B und C am präzisesten bestimmt sind, während die Elektronendichte der Ringe A und D von sich aus keine eindeutige Identifikation der zyklischen Zuckerreste erlaubt. Die dargestellte Situation unterscheidet sich insofern von der in den Monomeren A, B und D, als dass die Lage des Valienamin-Ringes (A) in diesen Molekülen besser definiert ist, die Glucose-Einheit D jedoch in keinem der anderen Moleküle gefunden werden konnte (siehe Kap. 4.2.2.1). Die schrittweise und unabhängige Modellierung der Acarbose in die Differenzelektronendichte der vier Monomere führte jedoch zu weitestgehend identischen Modellen, so dass die Konformation des Inhibitors als korrekt angenommen werden kann. Details zu der Verfeinerung sind ebenfalls in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6: Details der Strukturverfeinerung der unbeladenen AmyA'' (**1**) sowie des Acarbose-Komplexes (**8**). Die B-Faktoren wurden mit Hilfe des Programms TLSANL (Howlin *et al.* 1993) aus den Werten der individuellen B-Faktoren sowie der TLS-Komponente kombiniert.

	AmyA'' ( <b>1</b> )	AmyA'' + ACR ( <b>8</b> )
Auflösungsbereich [Å]	20 - 1.75	20 - 1.9
R <sub>work</sub> [%]	15.56	19.10
R <sub>free</sub> [%]	19.32	25.45
Anzahl nicht-H Atome		
insgesamt	19036	18742
Protein	16787	16745
Wasser / Ionen / ACR	2230 / 19 / -	1841 / 16 / 140
Abweichung von idealer Geometrie		
Bindungslänge [Å]	0.023	0.022
Winkel [°]	1.847	1.839
mittlere B-Faktoren [Å <sup>2</sup> ]		
alle Atome	22.14	27.45
Protein	23.53	26.632
Wasser / Ionen / ACR	33.61 / 25.05 / -	35.08 / 20.82 / 25.77

### 3.11 Beurteilung der Proteinstrukturen

Die Güte der Strukturmodelle der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -amylase A'' wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.* 1993) überprüft. Die web-basierte Version von WHAT-IF (Rodriguez *et al.* 1998) diente neben der Überprüfung der korrekten Orientierung der Seitenketten auch der Analyse von Wasserstoff- (Hooft *et al.* 1996) und Salzbrücken innerhalb des Modells. Zur Unterscheidung rigider und flexibler Regionen der unabhängigen Monomere wurde das Programm ESCET (Schneider 2002) verwendet. Die Größe molekularer Oberflächen und Volumina wurde mit den Programmen SURFACE (Lee & Richards 1971) und VOLUME (CCP4 1994) aus dem CCP4 Paket berechnet. Einzelheiten sind an entsprechender Stelle beschrieben.

### 3.12 Generierung von Abbildungen

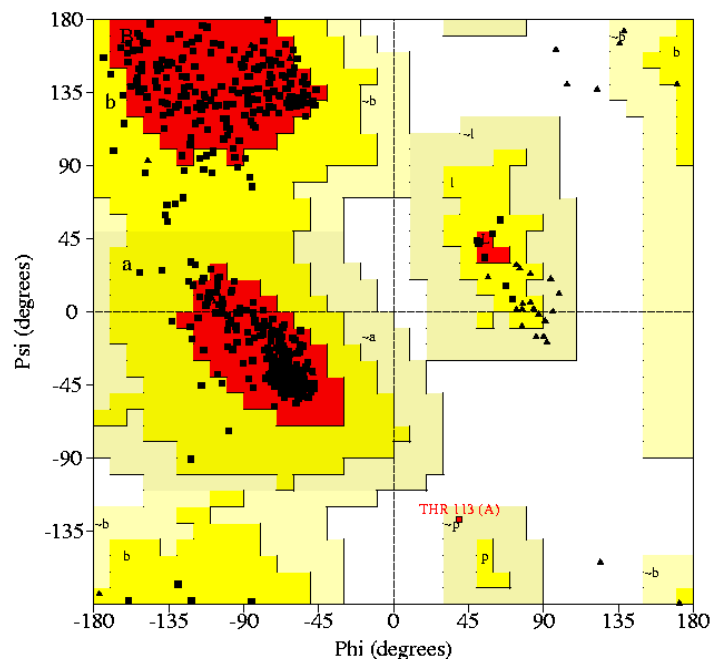
Die Erstellung dreidimensionaler Strukturabbildungen erfolgte mit Hilfe der Programme MolScript (Kraulis 1991), BobScript (Esnouf 1997), Dino (Dino 2001), Raster3D (Merrit & Bacon 1997) und PovRay (Povray). Für die Berechnung des elektrostatischen Potentials in Abbildung 4.13 wurde das Programme MEAD (Bashford 1997) verwendet, zur Berechnung der Oberflächen wurde MSMS (Sanner *et al.* 1996) benutzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Struktur der unkomplexierten AmyA''

#### 4.1.1 Qualität des Strukturmodells

Nach Abschluss der Verfeinerung ist die Elektronendichte ( $2mF_o-DF_c$ ) für die Hauptkette aller vier unabhängigen Moleküle bei einem  $\sigma$ -Level von 1 durchgängig. Die einzige Ausnahme bildet das N-terminale Methionin in Molekül B, das nicht eindeutig lokalisiert werden konnte. Da Seitenketten nur so weit modelliert wurden, wie die Elektronendichte ihre Lage eindeutig erkennen ließ, verbleiben in dem finalen Modell 33 unvollständige Aminosäurereste, die gleichmäßig über die Proteinoberfläche verteilt sind. All diese Reste zeichnen sich durch hydrophile Seitenketten aus (hauptsächlich Glu, Gln, Lys), lediglich Ile428 in Monomer B stellt eine hydrophobe Aminosäure dar.

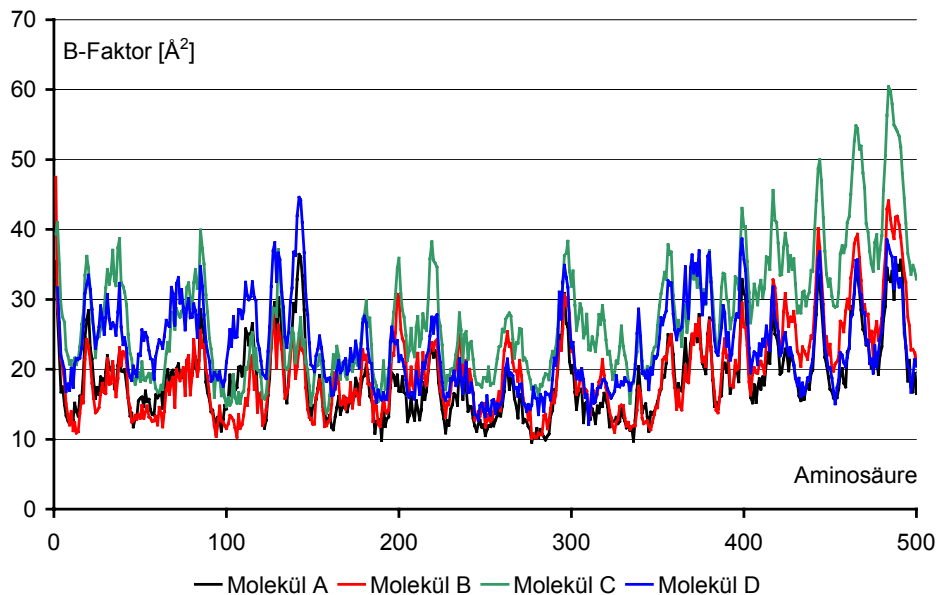


**Abb. 4.1:** Ramachandran-Diagramm der dihedralen Winkel innerhalb der Peptidkette der AmyA''. Stellvertretend für die vier Monomere ist nur der Plot für Molekül A dargestellt.

Die Statistiken der Ramachandran-Diagramme (vergl. Abb. 4.1) sind für die vier unabhängigen Moleküle nahezu identisch (Ramachandran & Sassiexharan 1968). Zwischen 88.2% (Molekül C) und 89.8% (Molekül B) aller Reste zeigen  $\phi$  und  $\psi$ -Winkel an, die innerhalb der bevorzugtesten Region liegen, alle weiteren liegen in zusätzlich erlaubten

Regionen. Davon weicht lediglich Thr113 ab, das in den zwei Molekülen A und D eine gerade noch erlaubte Konformation einnimmt, in den Molekülen B und C aber nicht erlaubte dihedrale Winkel aufweist, wobei die Unterschiede zu den erstgenannten Molekülen gleichwohl gering sind. In allen vier Fällen jedoch ist die Elektronendichte sowohl für die Haupt- als auch die Seitenkette eindeutig und auch die Auslenkungsparameter der Atome liegen im Bereich der benachbarten Aminosäuren.

Der mittlere Temperaturfaktor für alle Proteinatome liegt bei  $23.5 \text{ \AA}^2$  und bei  $23.4 \text{ \AA}^2$  für die Atome der Hauptkette, variiert aber signifikant zwischen den unabhängigen Molekülen sowie entlang der Peptidkette (siehe Abb. 4.2). Dabei ist erkennbar, dass insbesondere das C-terminale  $\beta$ -Faltblatt in Molekül C höhere B-Faktoren aufweist.

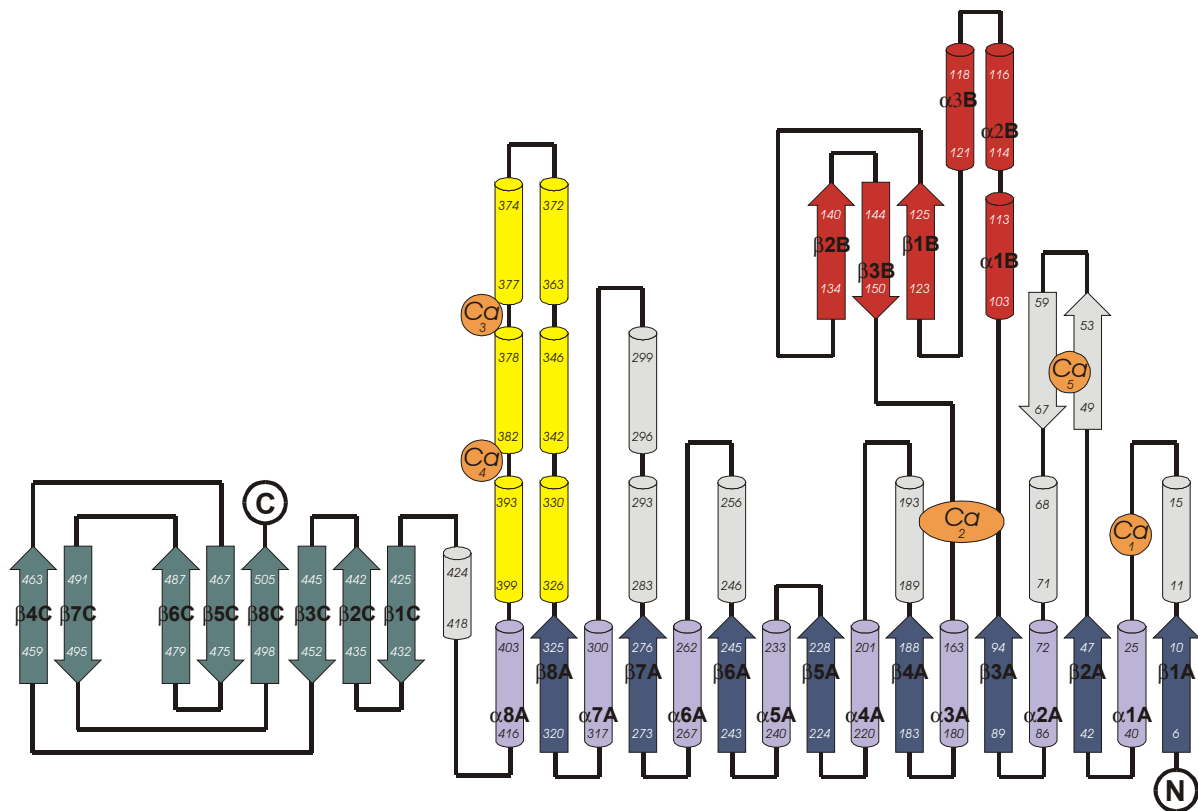


**Abb. 4.2:** Verlauf der Auslenkungsparameter der  $C_{\alpha}$ -Atome entlang der Polypeptidkette für die vier unabhängigen Moleküle.

#### 4.1.2 Beschreibung der Struktur

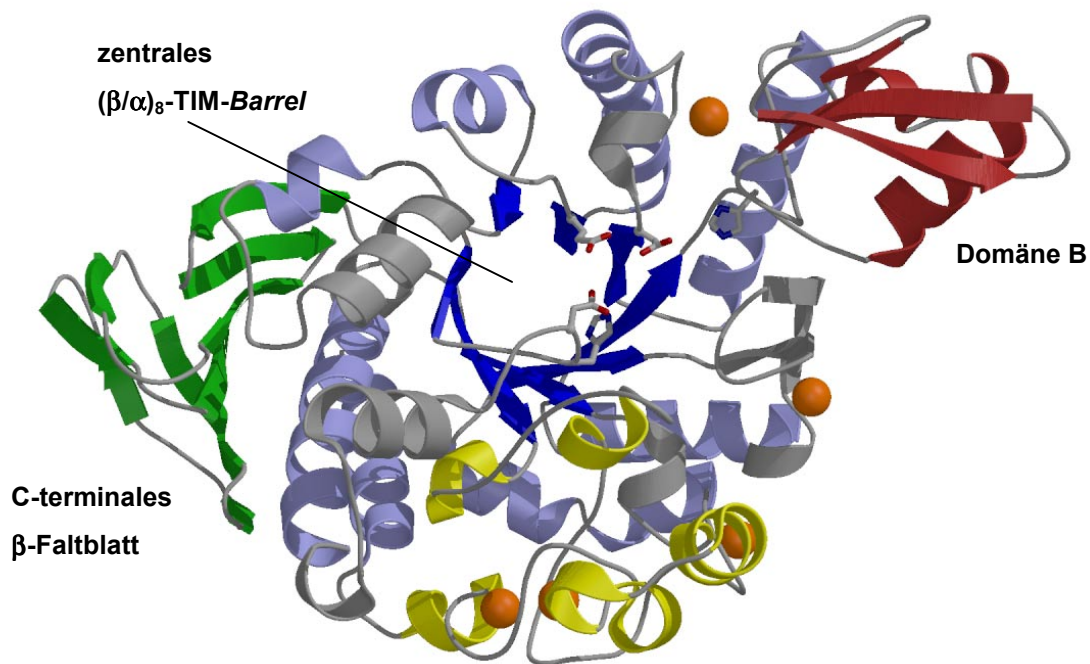
Die Dimensionen eines Monomers der AmyA'' betragen  $86 \times 54 \times 52 \text{ \AA}^3$ . Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm DSSP (Kabsch & Sander 1983) zugewiesen und zeigen eine Domänenstruktur, die typisch ist für die meisten bekannten  $\alpha$ -Amylasen. Die zentrale Domäne des Enzyms besteht aus einem  $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel (Reste 6 - 94, 163 - 416; Domäne A), mit einer charakteristischen  $\beta_3$ -Extrusion (Reste 103 - 150; Domäne B) zwischen dem dritten  $\beta$ -Strang und der daran anschließenden  $\alpha$ -Helix auf der carboxyterminalen Seite des Barrels.

Diese Domäne beinhaltet auch eine längere (Reste 103 - 113) und zwei sehr kurze Helices (3 - 4 Reste). Die C-terminale Domäne (Reste 425 - 505; Domäne C) wird von einem großen, 8-strängigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt geformt, das ein *greek key* Motiv enthält. Die Stränge  $\beta_4$  und  $\beta_7$  dieses Faltblattes sind dabei so angeordnet, dass sie mit den Strängen  $\beta_6$  bzw.  $\beta_5$  eine Sandwich Struktur ausbilden (vergl. Abb. 4.3 und Abb. 4.4). Außerdem existiert zwischen dem siebten Strang und der siebten Helix des TIM-Barrels ein relativ großer Einschub, der reich an *loops* und helikalen Elementen ist (Reste 326 - 399). Eine ähnliche Insertion dieser Größe und an dieser Position wurde bisher nur in der Oligo-1,6-Glucosidase von *Bacillus cereus* gefunden (Watanabe *et al.* 1997), zeigt dort aber eine der AmyA verschiedene Sequenz und räumliche Anordnung.



**Abb. 4.3:** Topologie-Diagramm der AmyA''. Das  $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel ist in hell- bzw. dunkelblau dargestellt, die eingeschobene Domäne B in rot und das C-terminale  $\beta$ -Faltblatt in grün. Die gelb gefärbten Helices bilden einen *loop*-reichen Einschub, der in den meisten anderen Amylasen in dieser Form und Größe nicht vorkommt.

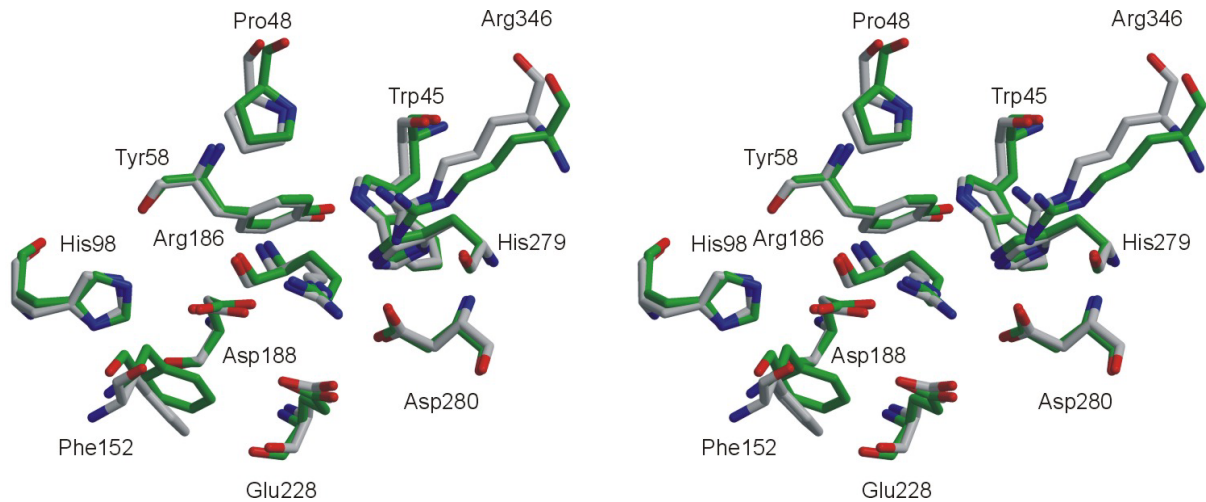
Trotz der vermuteten extrazellulären Lage der AmyA (Fütterer 2001) beinhaltet ihre Aminosäuresequenz lediglich ein Cystein, so dass die Ausbildung von Disulfidbrücken, die der Stabilisierung des Enzyms dienen oder seine Faltung unterstützen könnten, nicht möglich ist. Dies ist insofern ungewöhnlich, als dass Cystinbrücken auch mit einer erhöhten Thermostabilität in Zusammenhang gebracht worden sind (Matsumura *et al.* 1989 ).



**Abb. 4.4:** Tertiärstruktur der AmyA<sup>''</sup>. Die Domänen sind analog Abb. 4.3 eingefärbt. Calcium(II)-Ionen sind als orangefarbene Kugeln dargestellt. Die Aminosäurereste der aktiven Tasche (Asp188, Glu228, Asp280, His98 und His279) wurden als Stabmodell eingefügt.

#### 4.1.2.1 Das aktive Zentrum

Aus Sequenzanalysen und Strukturvergleichen mit verwandten Enzymen konnten die drei Aminosäuren Asp188, Glu228 und Asp280 als die katalytische Triade identifiziert werden. Die zwei Histidine His98 und His279 sind ebenfalls konserviert in der Familie der  $\alpha$ -Amylasen und dienen der Substratbindung. Eine Superposition der Seitenkettenatome dieser fünf Aminosäurereste mit den korrespondierenden Atomen des nach der Peptidsequenz und dreidimensionalen Struktur sehr ähnlichen Proteins *Bacillus cereus* Oligo-1,6-Glucosidase (Watanabe *et al.* 1997) ergibt eine mittlere r.m.s. Abweichung von nur 0.32 Å mit einem Maximum von 0.50 Å für das C <sub>$\gamma$</sub> -Paar in Glu228 (siehe Abb. 4.5). Bei einer Auflösung der beiden Strukturen von 1.75 bzw. 2.0 Å kann die räumliche Anordnung der katalytischen Zentren der beiden Enzyme somit als identisch angesehen werden. Sechs weitere Aminosäuren, die das aktive Zentrum flankieren (Trp45, Pro48, Tyr58, Phe152, Arg186 und Arg346 in AmyA), liegen auf ebenfalls nahezu identischen Positionen in den beiden Strukturen. Dies ist insofern ungewöhnlich, als dass die BCOG die Hydrolyse von  $\alpha$ -1,6-glucosidischen Bindungen katalysiert, während AmyA eine starke Präferenz für  $\alpha$ -1,4-glucosidische Verknüpfungen hat. Konkrete Aussagen zur Bindung des Substrates sind jedoch nicht möglich, da von BCOG kein Enzym-Inhibitor-Komplex existiert.



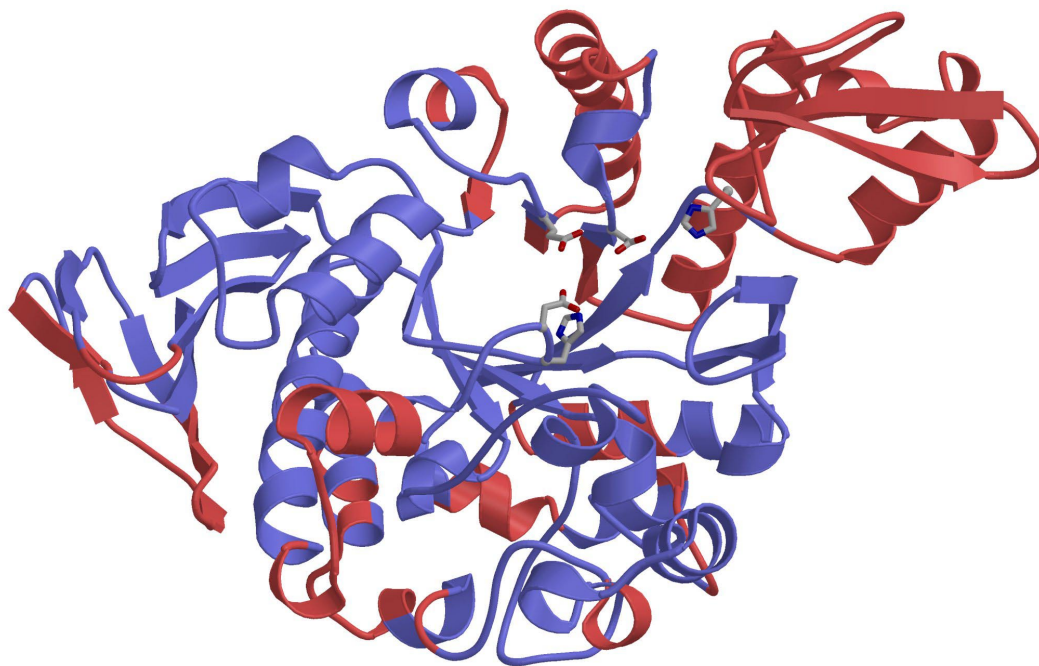
**Abb. 4.5:** Stereographische Darstellung (*cross eye*) der Superposition der aktiven Taschen aus *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A (grau) und *Bacillus cereus* Oligo-1,6-Glucosidase (grün). Die Beschriftung der Aminosäuren entspricht der AmyA''.

#### 4.1.2.2 Ähnlichkeit der Monomere

Obwohl Gelfiltrationsexperimente darauf hinweisen, dass *T. maritima*  $\alpha$ -Amylase A in Lösung als Monomer existiert, kristallisiert das Enzym als Dimer in der orthorhombischen Raumgruppe  $P2_12_12$ . In der monoklinen Form liegen schließlich zwei dieser Dimere vor (die Molekülpaare AB und CD), die ihrerseits über eine nicht-kristallographische zweizählige Achse miteinander verknüpft sind. Letztere geht während der Kryoprotektion aus der kristallographischen zweizähligen Achse hervor, die parallel der c-Achse in der Raumgruppe  $P2_12_12$  liegt (vergl. Kap. 3.4 und 3.7). Eine Analyse der  $C_\alpha$ -Positionen 2 - 505 mit dem Programm ESCET (Schneider 2002) zeigt, dass die zwei Monomere A und D sowie die Monomere B und C konformationell identisch sind, während sich diese zwei Gruppen signifikant unterscheiden. Da zwischen den Molekülen A und B die größten konformationellen Unterschiede bestehen und die Strukturverfeinerung für ihre  $C_\alpha$ -Atome gleichzeitig kleinere Positionsfehler ergeben hat, wird in weiteren Diskussionen immer das Dimer AB behandelt.

ESCET identifiziert bei einem  $\sigma$ -Level von 2.0 356 aus 504 (entsprechend 70.6%)  $C_\alpha$ -Positionen als konformationell invariant. Die größte zusammenhängende, flexible Region umfasst Domäne B und die darauf folgenden Helices und Faltblätter  $\alpha 3A$  -  $\beta 5A$  des zentralen *Barrels* (Reste 106 - 226), die sich aber nicht als starre Gruppe bewegen, sondern generell flexibler sind. Unterbrochen wird dieser Bereich nur von den Resten 188 - 198, die von  $Ca_2$  in Position gehalten werden (siehe Abb. 4.6). Die größte Differenz zwischen äquivalenten

$C_{\alpha}$ -Atomen besteht für das in der Domäne B lokalisierte Gly143 mit 2.21 Å, innerhalb der Stränge des *Barrels* ist die maximale räumliche Abweichung der Atome eines  $C_{\alpha}$ -Paares mit 0.57 Å für Ile224 deutlich geringer. Diese Flexibilität passt gut zu der Notwendigkeit konformationeller Variabilität während der Substratbindung und unterstreicht gleichzeitig die erhöhte Rigidität des zentralen TIM-*Barrels*. Ferner nehmen Teile zweier Helices sowie der sie verbindende *loop* zwischen  $\beta 7A$  und  $\alpha 7A$  (Reste 286 - 299) leicht unterschiedliche Konformationen in Molekül A und B ein. Relativ zur B-Domäne befindet sich dieser Einschub auf der gegenüberliegenden Seite des  $(\beta/\alpha)_8$ -*Barrels*, die Amplitude der Differenzen ist aber mit maximal 0.76 Å für das  $C_{\alpha}$ -Atompaar Lys293 vergleichsweise gering. Interessanterweise liegen die katalytisch aktiven Aminosäuren Asp188, Glu228 und Asp280 sowie die sie begleitenden Histidine His98 und His279 alle in räumlicher Nähe zu den angesprochenen flexiblen Regionen, sind selbst aber bezüglich ihrer Positionen invariant.



**Abb. 4.6:** Flexible und rigide Proteinregionen in AmyA<sup>77</sup>. Regionen, die bei einem  $\sigma$ -Level von 2.0 zwischen den Monomeren A und B unterschiedliche Positionen einnehmen, sind rot eingefärbt, invariante Bereiche blau. Die Orientierung sowie die generelle Darstellung des Moleküls sind mit der in Abb. 4.4 identisch.

Die Monomere A und B sind durch acht symmetrische und zwei asymmetrische Wasserstoffbrückenbindungen, zwei Salzbrücken (Glu290:OE2 - His337:NE2) und schwache van-der-Waals Wechselwirkungen miteinander verknüpft. Das Dimer-Interface hat dabei mit ca. 1602 Å<sup>2</sup> (entsprechend 8.6% der Proteinoberfläche) eine vergleichsweise große Kontaktfläche, was als Hinweis auf ein dimeres Vorliegen der AmyA in Lösung betrachtet werden kann. Die meisten Wechselwirkungen treten auf zwischen Resten, die in *loops* der



Domäne A sowie dem etwa 75 Aminosäuren umfassenden Einschub nach dem Strang  $\beta$ 8A lokalisiert sind. Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Trp457:NE1 und Asp200:OD1 fixiert das C-terminale Faltblatt eines Moleküls an der Domäne A des anderen Monomers eines Dimers.

#### 4.1.2.3 Bindung von Calciumionen

Die katalytische Aktivität der AmyA ist abhängig von der Verfügbarkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Obwohl weder die zur Dialyse noch zur Kristallisation eingesetzten Lösungen entsprechende Salze enthielten, sind in den Strukturen aller vier Monomere jeweils vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von identischen Aminosäuren koordiniert. Mit einem mittleren Koordinatenfehler von 0.11 Å (Cruickshank 1999) können Distanzen zwischen den koordinierenden Atomen und dem jeweiligen Calciumion, die um weniger als 0.3 Å zwischen den einzelnen Monomeren differieren, als identisch betrachtet werden. Dementsprechend beobachtet man für Ca2, Ca3 und Ca4 zwischen den einzelnen Monomeren keine Unterschiede bezüglich ihrer Koordinationsgeometrie. Drei der vier Monomere (A, B und D) koordinieren ein weiteres Calciumion an ihrer Oberfläche. Die relativ lockere Bindung dieses Ions spiegelt sich in den verfeinerten B-Faktoren dieser Ionen wider, die signifikant höher sind als die der anderen Metallionen. Die Abstände der fünf Calciumionen zu den koordinierenden Aminosäuren sind in Tab. 4.1 aufgelistet.

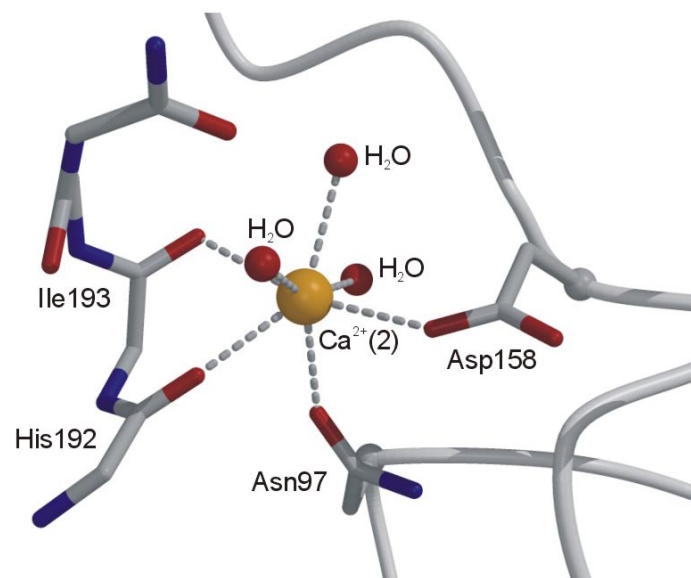
Ca2, das in einer Reihe verwandter Hydrolasen konserviert und an deren Aktivierung beteiligt ist (Liebl *et al.* 1997, Machius *et al.* 1998), liegt in einer tiefen Spalte zwischen den Domänen A und B. Es wird koordiniert von zwei Aspartatseitenketten, die in *loops* lokalisiert sind (Asp97, Asp158), die diese zwei Domänen verbinden, von den Carbonylsauerstoffatomen zweier Aminosäuren in einer Helix, die dem Strang  $\beta$ 4A des zentralen *Barrels* folgt (His192, Ile193) sowie drei Wassermolekülen (siehe Abb. 4.7). Die Geometrie kann insgesamt als verzerrt pentagonal bipyramidal beschrieben werden.

**Tab. 4.1:** Bindungsabstände der Ca<sup>2+</sup> koordinierenden Aminosäuren; erste Zeile: minimaler Abstand in den vier Monomeren, zweite Zeile: mittlerer Abstand, dritte Zeile: maximaler Abstand. Alle Werte sind in Å angegeben.

Ca1		Ca2		Ca3		Ca4		Ca5	
Asp17:OD1	2.17	Asn97:OD1	2.35	Gly376:O	2.06	Asp386:OD1	2.40	Glu51:OE2	2.08
	2.28		2.41		2.17		2.48		2.35
	2.36		2.45		2.26		2.52		2.55
Asp19:OD	2.28	Asp158:OD2	2.26	Asp381:OD1	2.41	Asp386:OD2	2.38	Ala52:O	2.43
	2.39		2.33		2.51		2.47		2.50
	2.52		2.43		2.62		2.56		2.62
Asn21:OD1	2.10	His192:O	2.39	Asp381:OD2	2.35	Asp387:O	2.23	Glu67:OE1	2.40
	2.25		2.42		2.44		2.36		2.46
	2.42		2.45		2.64		2.49		2.50
Val23:O	2.19	Ile193:O	2.43	Cys383:O	2.33	Asp390:OD1	2.30	Glu67:OE2	2.45
	2.30		2.48		2.37		2.38		2.50
	2.38		2.52		2.44		2.47		2.56
Asp25:OD2	1.99	H <sub>2</sub> O1	2.32	Asp386:O	2.13	Phe392:O	2.17	H <sub>2</sub> O1	2.33
	2.22		2.39		2.22		2.46		2.35
	2.39		2.45		2.26		2.36		2.36
H <sub>2</sub> O1	2.29	H <sub>2</sub> O2	2.40	Asp387:OD1	2.22	H <sub>2</sub> O1	2.30	H <sub>2</sub> O2	2.32
	2.35		2.44		2.35		2.41		2.38
	2.41		2.48		2.48		2.47		2.41
		H <sub>2</sub> O3	2.39	H <sub>2</sub> O1	2.46	H <sub>2</sub> O2	2.34	H <sub>2</sub> O3	2.52
			2.44		2.51		2.40		2.70
			2.47		2.55		2.52		2.87

Die weiteren drei, in allen Monomeren vorhandenen, Calciumionen sind innerhalb der Familie der Hydrolasen bzw. Amylasen nicht konserviert und spielen deshalb wahrscheinlich keine direkte Rolle bei der Katalyse. Zwei von ihnen (Ca3 und Ca4) werden ausschließlich von Aminosäuren koordiniert, die innerhalb der Insertion zwischen dem siebten Strang und der siebten Helix des ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrels lokalisiert sind. Mit hoher Wahrscheinlichkeit tragen sie dort zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur dieser Region bei, die zum größten Teil aus *loops* besteht. Ca1 wird quadratisch pyramidal von fünf Aminosäuren koordiniert, die in der Peptidsequenz alle direkt vor der ersten Helix des TIM-Barrels liegen. In den beiden

identischen Monomeren B und C bindet zusätzlich ein Wassermolekül in einer sechsten Position und formt so einen fast regelmäßigen Oktaeder. In den Molekülen A und D bleibt diese Lage unbesetzt. Eine nahezu identische Calciumbindungsstelle an äquivalenter Position im Protein wurde kürzlich in der 4- $\alpha$ -Glucanotransferase aus *Thermotoga maritima* gefunden (Roujenikova *et al.* 2002). Die Koordination erfolgt über identische Aminosäuren, die lediglich in ihrer Reihenfolge an zwei Positionen vertauscht sind. Da zur Kristallisation dieses Enzyms - wie auch für AmyA'' - keine Calcium-Salze verwendet wurden, gehen die Autoren von einer hohen Bindungsaffinität aus und vermuten, dass das Calcium-Ion zur Stabilisierung der Konformation des Enzyms beiträgt.



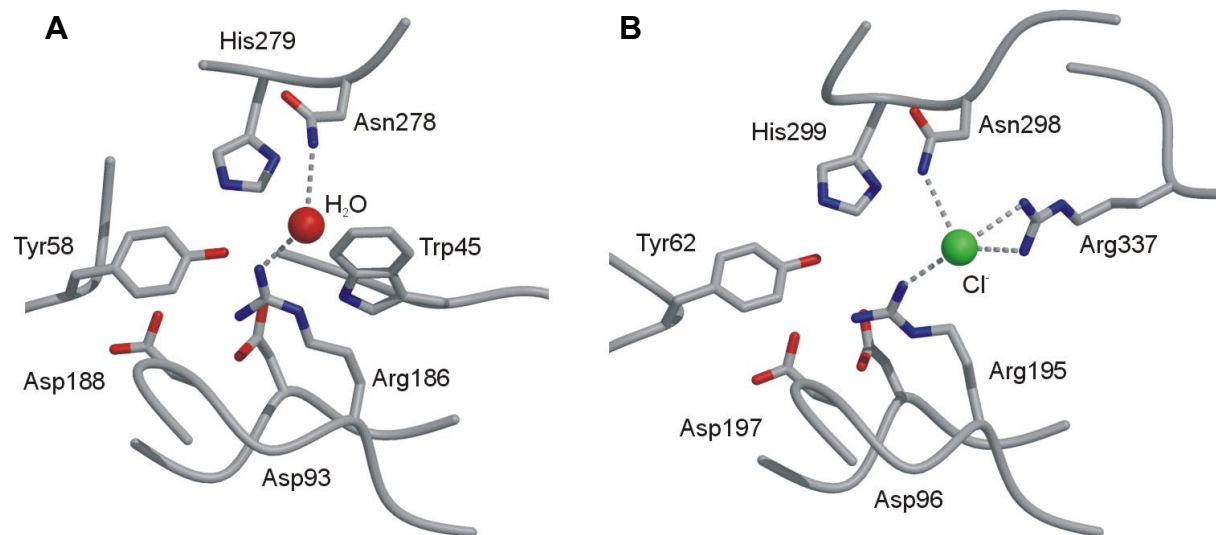
**Abb. 4.7:** Koordination des katalytisch relevanten Calciumions in AmyA.

Die Temperaturfaktoren der Calciumionen variieren innerhalb der vier unabhängigen Monomere analog den mittleren B-Werten aller Atome. Entsprechend sind die Temperaturfaktoren sämtlicher Ionen jeweils in den Molekülen A und B am niedrigsten und in Molekül C am höchsten. (vergl. B-Werte der  $C_{\alpha}$ -Atome entlang der Polypeptidkette, Abb. 4.2). Innerhalb eines Moleküls weist jeweils Ca2 die geringsten Auslenkungsparameter auf, Ca5, soweit vorhanden, ist vermutlich aufgrund seiner Bindung an der Oberfläche des Moleküls das flexibelste der Ionen.

#### 4.1.2.4 Chloridbindungsstelle

In einer Reihe von Amylasestrukturen konnten Chloridionen nachgewiesen werden und kinetische Experimente haben gezeigt, dass durch den Zusatz von Chloridionen bis zu einer Konzentration von etwa 150 mM die katalytische Aktivität der AmyA gesteigert werden kann

(Fütterer 2001). In der Elektronendichte der AmyA'' konnten jedoch keine Cl<sup>-</sup>-Ionen identifiziert werden. Diese Anionen werden in anderen Amylasen gewöhnlich von einer Triade bestehend aus einem Arginin, einem Asparagin und einem zweiten Arginin oder Lysin auf der C-terminalen Seite des TIM-Barrels in der Nähe der aktiven Tasche gebunden (Aghajari *et al.* 1998, Wiegand *et al.* 1995). Strukturelle Vergleiche zeigen, dass der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A das zweite Arginin/Lysin in der entsprechenden Position fehlt (siehe Abb. 4.8), so dass Chlorid nicht mehr in der regulären Weise koordiniert werden kann. Statt dessen ist ein Wassermolekül an die Seitenketten der Aminosäuren Arg186 und Asn278 gebunden. Eine eventuelle Bindung eines Anions bei höheren Chloridkonzentrationen erscheint in dieser Position unwahrscheinlich, da die Seitenkette des Trp45 für das im Vergleich zu Wasser größere Chloridion nicht ausreichend Raum bietet.

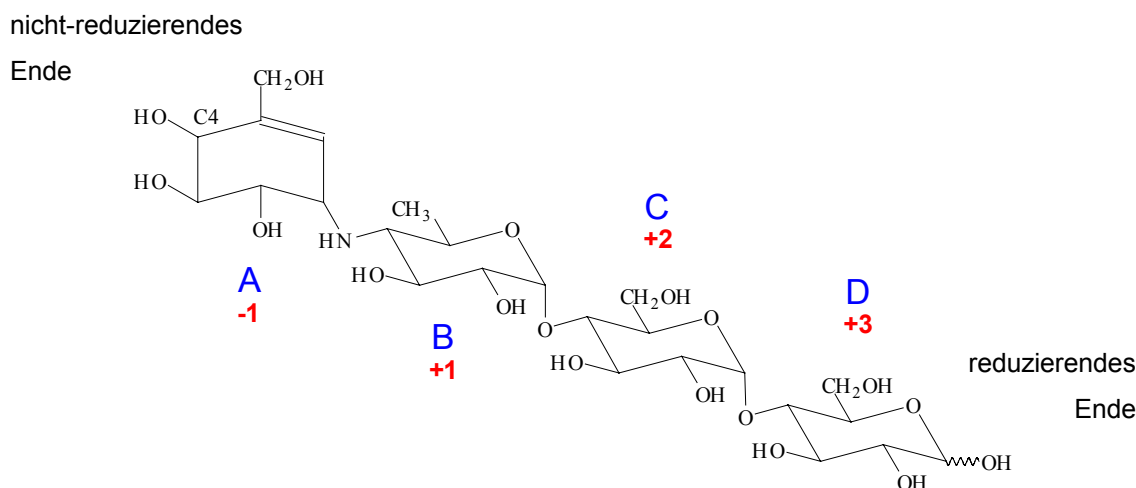


**Abb. 4.8:** Geometrie der mutmaßlichen Chloridbindungsstelle in AmyA (A) und des homologen Enzyms aus dem Schweinepankreas (B, PDB-Code: 1OSE). Während das Chloridanion in letzterem Enzym durch die Seitenketten Arg195, Asn298 und Arg337 koordiniert wird, fehlt in AmyA eine dem Arg337 äquivalente Aminosäure. Trp45 besetzt in AmyA teilweise die Position des Arg337.

## 4.2 Struktur der AmyA'' im Komplex mit dem Inhibitor Acarbose

Acarbose ist ein Pseudotetrasaccharid, das  $\alpha$ -Glucosidasen kompetitiv inhibiert, indem es einen Oxocarbenium-ähnlichen Übergangszustand der Hydrolyse simuliert und mit hoher Affinität an das jeweilige Enzym bindet (Brzozowski & Davies 1997). Das Molekül wird aus der Fermentation von Bakterien der Spezies *Actinoplanes utahensis* gewonnen und begleitend im Rahmen der Behandlung der Typ2 Diabetes mellitus zur Senkung des Blutzuckerspiegels eingesetzt (Josse 1995). Die Struktur-Formel des Moleküls ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

Acarbose hat sich in der Proteinbiochemie als Inhibitor von  $\alpha$ -Glucosidasen bewährt und in einer Reihe von Fällen zur Identifizierung der katalytisch aktiven Zentren und zur Untersuchung des Spaltungsmechanismus beigetragen (Alkazaz *et al.* 1996, Kadziola *et al.* 1998, Roujeinikova *et al.* 2002).

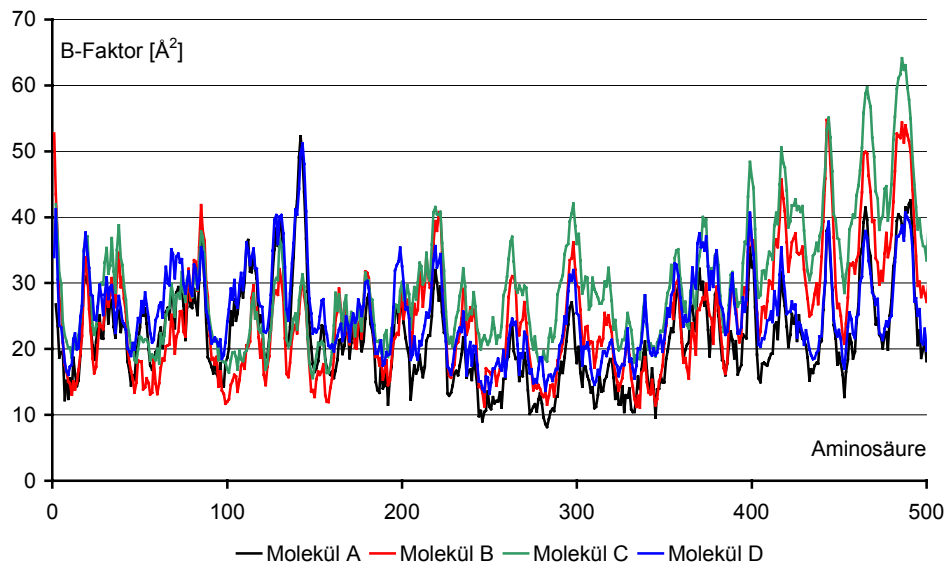


**Abb. 4.9:** Lewis-Formel des  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitors Acarbose (*O*-4,6-Dideoxy-4-[[*(1S,4R,5S,6S)*-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl]amino]- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucose). Bezeichnung der Ringe (blau): **A:** Valienamin-Ring, nicht-reduzierendes Ende des Pseudoooligosaccharids. **B:** 6-Deoxyglucosid, **C + D:** Glucose-Einheiten mit dem reduzierenden Ende an Ring D. Die Benennung der Ringe von -1 bis +3 bezieht sich auf die Bindung der Acarbose an die Glucosidase nach dem von Davies *et al.* (1997) etablierten Schema.

#### 4.2.1 Qualität des Strukturmodells

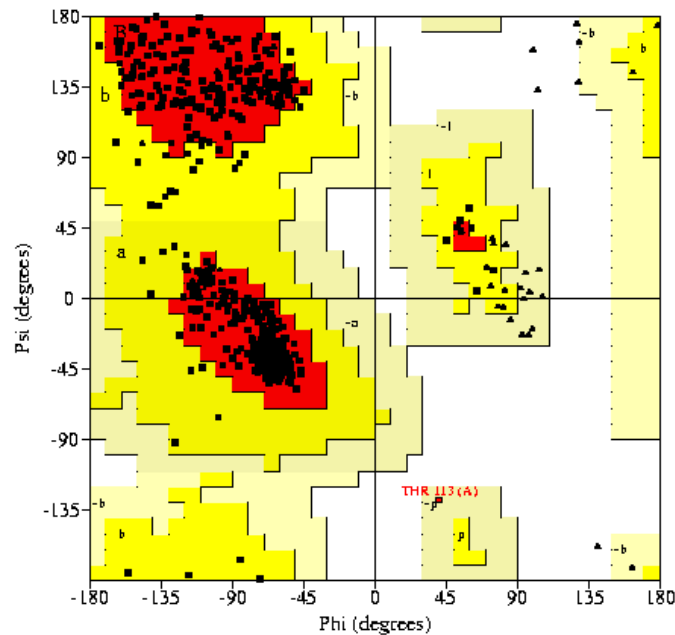
Wie aus Tabelle 3.2 ersichtlich, ist die Vollständigkeit der Daten dieser Messung (Datensatz **8**) mit 91.3% (67.3% für die äußere Auflösungsschale) gegenüber der unkomplexierten Struktur deutlich reduziert. Dies ergibt sich aus dem sehr anisotropen Streuverhalten des verwendeten Kristalls, das zur Folge hatte, dass nicht alle gesammelten Daten in die Strukturverfeinerung einbezogen werden konnten. Aus diesem Grund war es notwendig, einen Kompromiss aus Datenvollständigkeit und der Güte der einbezogenen Daten zu schließen. Dennoch liegt der  $R_{\text{merge}}$  für alle Daten mit 8.5% höher als der der unkomplexierten Struktur mit 7.1%, obwohl die maximale Auflösung mit 1.9 Å um 0.15 Å niedriger ist. Entsprechend ist die Elektronendichte für das verfeinerte Modell in einigen Regionen teilweise verzerrt, wenngleich aber doch eindeutig. Damit einher gehen die Werte der isotropen Auslenkungsparameter, die teilweise um mehr als 10 Å<sup>2</sup> über denen der Inhibitorfreien Struktur liegen. Ihr prinzipieller Verlauf entlang der Hauptkette zeigt aber nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Strukturen (vergl. Abb. 4.2 und Abb. 4.10). Dies gilt auch für die mittleren Auslenkungsparameter der einzelnen Moleküle. Analog der unkomplexierten

Struktur ist Molekül C am flexibelsten, während die Monomere A, B und D im Mittel etwas niedrigere Temperaturfaktoren aufweisen. Monomer B zeigt jedoch insbesondere im Bereich des C-terminalen  $\beta$ -Faltblattes größere Auslenkungsparameter als in der unkomplexierten Struktur.



**Abb. 4.10:** Verlauf der Auslenkungsparameter der  $C_{\alpha}$ -Atome der vier kristallographisch unabhängigen Moleküle der AmyA'' im Komplex mit Acarbose. Der B-Faktor setzt sich zusammen aus dem individuellen Auslenkungsparameter sowie der TLS-Komponente.

Die Ramachandran-Diagramme für die vier Monomere gleichen bis auf wenige Abweichungen ebenfalls denen der AmyA'' ohne Acarbose und zeigen auch untereinander nur geringe Differenzen. Zusätzlich zu Thr113, dessen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel in allen vier unabhängigen Molekülen in bzw. nahe an einer nichterlaubten Region liegen, sind die Kombinationen der dihedralen Winkel in Molekül B des Komplexes für Tyr341, in Molekül C für Tyr389 und in Molekül D für Val2 nach Ramachandran gerade noch erlaubt. In allen drei Fällen ist die Elektronendichte aber eindeutig und die Werte für  $\phi$  und  $\psi$  weichen nicht stark von den entsprechenden Werten in den anderen Monomeren sowie der Struktur der unkomplexierten AmyA'' ab. Abbildung 4.11 zeigt aus Gründen der Vergleichbarkeit mit Abbildung 4.1 exemplarisch den Ramachandran-Plot des Monomers A der mit Acarbose komplexierten AmyA''.



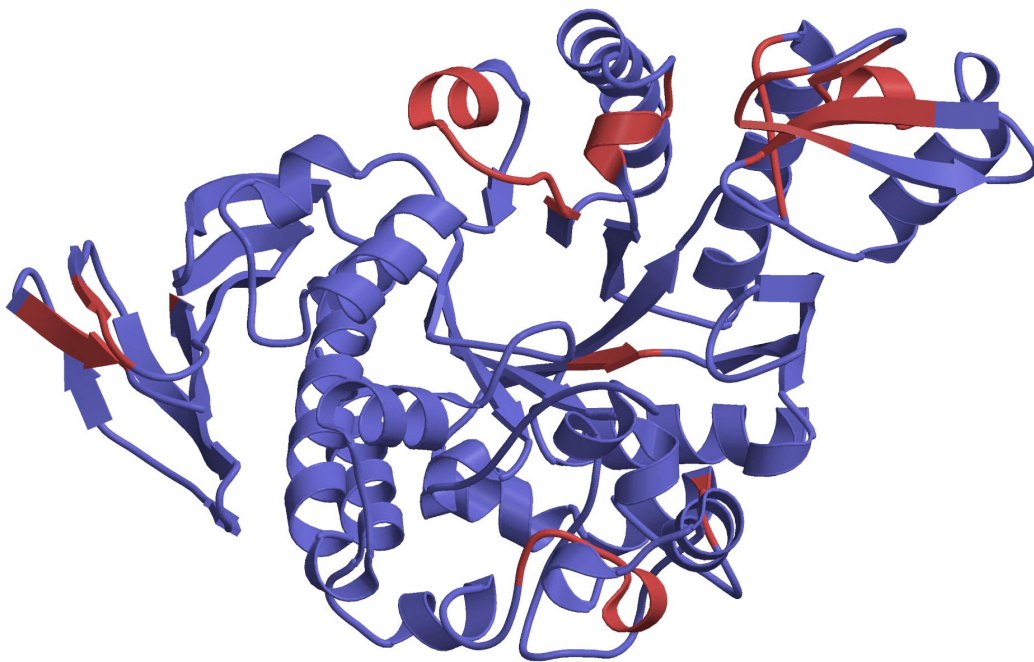
**Abb. 4.11:** Ramachandran-Diagramm der dihedralen Winkel innerhalb der Peptidkette der mit Acarbose komplexierten AmyA<sup>''</sup>. Stellvertretend für die vier Monomere ist nur der Plot für Molekül A dargestellt.

#### 4.2.2 Beschreibung der Struktur

Wie zu erwarten, ergibt sich bezüglich der generellen Topologie der AmyA durch Bindung des Inhibitors Acarbose keine Änderung. Eine genauere Betrachtung des Verlaufs der Hauptkette mit Hilfe des Programms ESCET (Schneider 2002) zeigt deutlich, dass zwischen den Molekülen A der leeren Amylasestruktur und des Inhibitor-Komplexes praktisch keine Unterschiede bestehen (siehe Abb. 4.12). Entsprechendes gilt auch für die Monomere B bis D. Da aber Monomer A sowohl in der leeren Struktur als auch dem Inhibitor-Komplex am genauesten definiert ist und die detaillierteste Elektronendichte aufweist, beschränkt sich die folgende Diskussion, soweit nicht anders angegeben, auf dieses Molekülpaar.

Als konformationell flexibel wurden bei einem  $\sigma$ -Level von 2.0 Teile der Domäne B und der anschließenden *Barrel*-Struktur sowie zwei Stränge des C-terminalen  $\beta$ -Faltblattes identifiziert. Insbesondere die Bewegung der Domäne B könnte bezüglich des Katalysemechanismus der Amylase von Bedeutung sein, da in diesem Bereich das Substrat bindet (vergl. Kap. 4.2.2.1) und auch das katalytisch essentielle Calcium-Ion lokalisiert ist. Allerdings ist die maximale Bewegung mit 0.51 Å für das C $_{\alpha}$ -Paar His129 wesentlich geringer als die maximale Differenz zweier C $_{\alpha}$ -Atome zwischen den Molekülen A und B des leeren Enzyms (2.21 Å für das C $_{\alpha}$ -Atompaar Gly143). Zudem sind die hier als signifikant

unterschiedlich charakterisierten Atompaaire zum größten Teil in den Regionen lokalisiert, die bereits in der unkomplexierten Struktur als konformationell flexibel identifiziert werden konnten (vergl. Abb. 4.6). Es ist daher zu vermuten, dass die beobachteten Unterschiede nicht auf die Bindung der Acarbose zurück zu führen sind, sondern eher Bereiche widerspiegeln, die von sich aus eine höhere Flexibilität besitzen. Diese Vermutung wird gestützt durch die Tatsache, dass die meisten dieser Regionen an der Proteinoberfläche lokalisiert sind und überdurchschnittlich hohe Auslenkungsparameter aufweisen (vergl. Abb. 4.10).

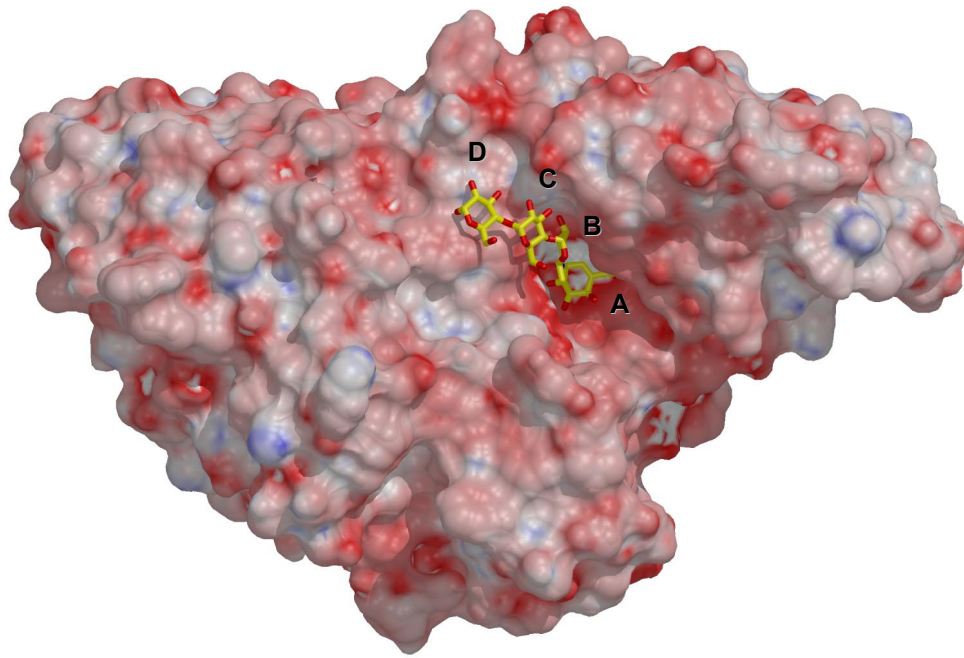


**Abb. 4.12:** Flexible und invariante Regionen in der Proteinstruktur der AmyA''. Bereiche, die bei einem  $\sigma$ -Level von 2.0 zwischen den Monomeren A des unbeladenen Moleküls und des Acarbose-Komplexes unterschiedliche Positionen einnehmen, sind rot eingefärbt, invariante Bereiche blau. Die Orientierung sowie die generelle Darstellung des Moleküls sind mit der in den Abbildungen 4.4 und 4.6 identisch.

#### 4.2.2.1 Bindung der Acarbose im aktiven Zentrum der AmyA''

Der Inhibitor Acarbose wird von der  $\alpha$ -Amylase A in einer tiefen Furche gebunden, die das carboxyterminale Ende des  $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels von der Domäne B abgrenzt. Wie zuvor bereits in verwandten Enzym-Inhibitor-Komplexen beobachtet (Brzozowski & Davies 1997), wird die Acarbose entlang der Positionen +1 bis +3 leicht gekrümmt und knickt an der Bindung zum Valienamin-Ring (-1) scharf ab (vergl. Abb. 4.16 und 4.18). Die in der leeren Enzymstruktur getroffene Zuordnung der Aminosäuren Asp188, Glu228 und Asp280 als das aktive Zentrum der Amylase ließ sich anhand der Bindung der Acarbose nun eindeutig verifizieren. Selbiges gilt auch für die Histidinreste 98 und 279, die den Valienamin-Ring in der Bindungstasche fixieren.





**Abb. 4.13:** Bindung der Acarbose in der Furche zwischen den Domänen A und B. Die Orientierung ist mit der in den Abbildungen 4.4, 4.6 und 4.12 identisch. Die Orientierung des Inhibitors ist relativ zu Abb. 4.9 um ca.  $180^\circ$  in der Bildebene gedreht, die Bezeichnung der Ringe erfolgt entsprechend jener Abbildung. Die Färbung der molekularen Oberfläche entspricht dem elektrostatischen Potential des Moleküls; rot: negativ, blau: positiv.

Die Bindung des Inhibitors an die Amylase erfolgt insgesamt über 21 - 22 Wasserstoffbrückenbindungen. Die exakten Werte bezüglich der Abstände zwischen Wasserstoffdonor und -akzeptor für die einzelnen Monomere sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Größere Unterschiede zwischen den kristallographisch unabhängigen Molekülen sind in erster Linie auf die schlechte Modellierbarkeit einiger Seitenketten in der Elektronendichte zurückzuführen. Lys293 ist in Monomer B lediglich bis einschließlich seines  $C_\beta$ -Atoms lokalisierbar und Trp198 scheint um den Torsionswinkel  $\chi_2$  ( $C_\beta$ - $C_\gamma$ ) weitgehend frei zu rotieren.

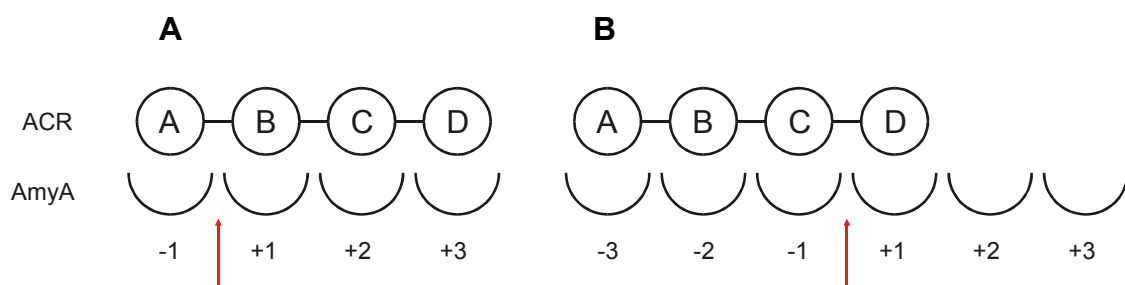
Wie bereits kurz erwähnt war es in drei der vier Monomere nur möglich, die Saccharid-Untereinheiten A bis C (entsprechend den *subsites* -1 bis +2 (Davies *et al.* 1997)) anhand der Differenzelektronendichte zuzuordnen. Der vierte Ring des Inhibitors (Ring D, *subsite* +3) konnte dagegen lediglich in Molekül C gefunden werden, zeigte bei Verfeinerung mit einer Besetzung von 1 jedoch überdurchschnittlich hohe Auslenkungsparameter. Für diese Beobachtungen existieren prinzipiell zwei mögliche Erklärungen:

**Tab. 4.2:** Wasserstoffbrückenbindungen zwischen *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A'' und dem Inhibitor Acarbose. Alle Abstände sind in Å angegeben. Lys293, Asn255 und Tyr256 gehören zu dem zweiten Monomer des Dimers und sind deshalb mit Apostroph gekennzeichnet.

ACR	Protein	Mol A	Mol B	Mol C	Mol D
O2a	His279:NE2	2.92	2.70	2.87	2.90
O2a	Asp280:OD2	3.06	2.37	2.55	2.74
O2a	Arg186:NH2	3.02	3.12	2.96	3.13
O3a	Asp280:OD1	2.72	2.73	2.77	2.88
O6a	His98:NE2	2.95	2.93	3.05	3.09
O6a	Asp188:OD2	3.00	2.52	3.11	2.80
N4b	Asp280:OD2	2.94	3.35	3.42	3.44
N4b	Glu228:OE2	3.02	3.02	3.08	2.99
O2b	His192:NE2	2.68	2.66	2.52	2.60
O3b	Glu228:OE1	2.69	2.89	2.69	2.72
O3b	Glu228:OE2	3.31	3.31	3.25	3.20
O5b	Lys293':NZ	-	2.92	3.37	3.05
O2c	Lys191:NZ	3.34	3.12	3.10	3.23
O3c	Lys191:NZ	3.18	2.70	2.99	2.84
O3c	Trp198:NE1	3.10	-	-	-
O6c	Lys293':NZ	-	3.08	3.12	2.93
O1d	Gly232:N			3.07	
O2d	Gly232:N			2.70	
O2d	Tyr256':OH			2.84	
O3d	Phe230:O			2.98	
O5d	Asn255':OD1			2.95	
O6d	Asn255':OD1			2.82	

Der Inhibitor wurde über einen Zeitraum von etwa einer Stunde durch *soaking* in einer Acarbose-Lösung der Konzentration 1 mM bei Raumtemperatur in den Kristall eingeführt. Geht man davon aus, dass das Enzym selbst bei dieser vergleichsweise niedrigen Temperatur noch eine signifikante Restaktivität besitzt, so besteht die Möglichkeit, dass nach ‚inkorrekt‘er Bindung der Acarbose zunächst eine hydrolytische Abspaltung des vierten, ungeschützten Glucose-Ringes D stattgefunden hat. Vergleichbare Spaltungen aber auch Transglyco-

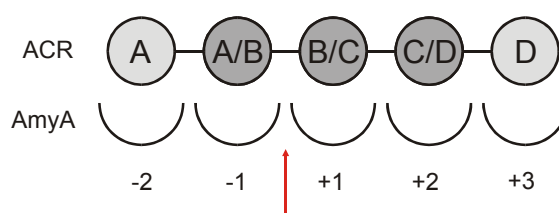
sylierungen, die in längeren Inhibitoren resultierten, wurden bereits zuvor in einer Reihe von Strukturen zuckerspaltender Enzyme beobachtet (Gilles *et al.* 1996, Qian *et al.* 1994). Am wahrscheinlichsten erscheint dabei eine um zwei Zuckereinheiten verschobene Bindung der Acarbose mit dem Valienamin-Ring (A) in einer -3-Position, dem 6-Deoxyglucosid (B) in Position -2 und den beiden Glucose-Ringen C und D in den Positionen -1 und +1 (siehe Abb. 4.14) Letztere liegen in identischer Form in Amylose, dem natürlichen Substrat dieses Enzyms, vor und die sie verknüpfende Bindung zwischen C1C und O4D ist korrekt positioniert, um eine Hydrolyse gemäß dem propagierten Mechanismus zu erlauben. Diese Hypothese impliziert, dass die Bindungsaffinität der korrekt orientierten Acarbose zu der  $\alpha$ -Amylase A nicht wesentlich größer ist als die des um zwei Einheiten verschobenen Inhibitors. Dies erscheint insofern sinnvoll, als dass Acarbose die Aktivität der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A nicht vollständig inhibiert, sondern lediglich auf ca. 10% herabsetzt (Fütterer 2002). Gleichzeitig lässt Abbildung 4.13 erkennen, dass die zuvor angesprochene Furche, in der die Acarbose koordiniert wird, auch die Bindung eines Oligosaccharids erlaubt, das in Richtung des nicht-reduzierenden Endes verlängert ist. Entsprechende Bindungsmodi wurden ebenfalls bereits in den Kristallstrukturen verwandter Enzyme beobachtet (Gilles *et al.* 1996, Roujeinikova *et al.* 2002). Nach Abspaltung des Glucoseringes D kann schließlich das verbleibende Molekül wie erwartet mit dem Valienamin-Ring in der Position -1 binden und so zu einer Inhibition des Enzyms führen.



**Abb. 4.14:** Schematische Darstellung der korrekten (A) und der vermuteten, ‚falschen‘ (B) Bindung der Acarbose, die zu einer Spaltung zwischen den Ringen C und D führen könnte. Der rote Pfeil markiert die zu spaltende Bindung.

Eine zweite mögliche Erklärung für das Fehlen des Glucoseringes in der Elektronendichte am nicht-reduzierenden Ende der Acarbose besteht in verschiedenen, überlappenden Bindungen des Inhibitors an die Amylase (vergl. Abb. 4.15). Geht man davon aus, dass die Acarbose teilweise in der korrekten Orientierung, teilweise aber um eine Saccharideinheit in Richtung des nicht-reduzierenden Endes verschoben an das Enzym bindet, so sollte für die mittleren drei, voll besetzten Zuckerreste eine deutliche Differenzelektronendichte zu erkennen sein,

während die terminalen Ringe aufgrund ihrer reduzierten Besetzungsfaktoren weniger deutlich in Erscheinung treten würden. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass in den Molekülen A, B und D weder für die Position +3, noch für eine mögliche Position -2 signifikante Differenzelektronendichte existiert. Des weiteren unterscheidet sich die 6-Deoxyglucosid-Einheit (Ring B) durch das Fehlen der Hydroxy-Funktion am C6 von den drei anderen Ringen, so dass eine äquivalente Bindung dieses Ringes in der Position -1 nicht möglich ist. Die Abbildungen 4.16 und 4.18 zeigen aber, dass das Sauerstoffatom dieser Gruppe mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen maßgeblich zur Fixierung des Valienaminringes im aktiven Zentrum beiträgt.



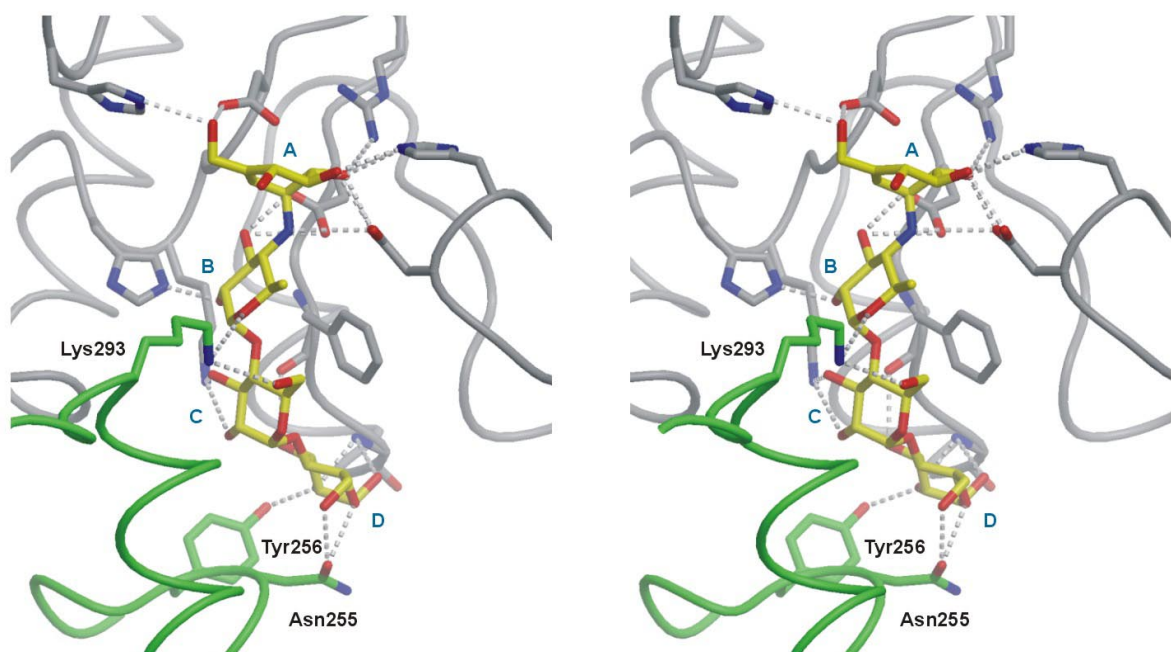
**Abb. 4.15:** Mögliche Überlappung zweier Acarbose-Moleküle, die in unterschiedlichen Positionen in der aktiven Tasche der AmyA gebunden sind. In den Positionen -2 und +3 existiert jeweils eine Saccharideinheit mit reduzierter Besetzung, die Positionen -1, +1 und +2 sind durch Überlagerung der Ringe A/B, B/C bzw. CD jeweils voll besetzt.

Gänzlich ausgeschlossen werden kann die beschriebene, überlappende Bindung der Acarbose aufgrund der vergleichsweise schlechten Qualität der Elektronendichte zwar nicht, gleichwohl erscheint sie aber wesentlich unwahrscheinlicher als eine der endgültigen Bindung vorausgehende Spaltung des Inhibitors zwischen den Ringen C und D. Eine Klärung des Sachverhaltes wäre eventuell über einen massenspektrometrischen Nachweis freier Glucose in der entsprechenden Lösung oder auch mit Hilfe von NMR-Messungen möglich. Eine generelle, evtl. dynamische Fehlordnung des Glucose-Ringes D erscheint aufgrund seiner Fixierung über fünf relativ starke Wasserstoffbrückenbindungen (siehe Tab. 4.2) und der ohnehin eingeschränkten Freiheitsgrade als sehr unwahrscheinlich.

Eine Begründung, warum lediglich in Molekül C der zweite Glucose-Ring der Acarbose vorhanden ist, kann anhand der gegebenen Struktur nicht gefunden werden. Wie zuvor bereits angesprochen, unterscheiden sich die vier Monomere nur geringfügig untereinander, so dass von einer höheren Bindungsaffinität des intakten Inhibitors zu Molekül C nicht ausgegangen werden kann. Packungseffekte, die unter Umständen die Freisetzung des Hydrolyse-Produktes verlangsamen könnten, erscheinen ebenfalls unwahrscheinlich, da zwischen den Dimeren AB und CD kein signifikanter Unterschied besteht. Eventuell existieren im Kristall aber geringe

Differenzen in den Zugangswegen zur aktiven Tasche des Enzyms, die Unterschiede in der Bindungs- bzw. Freisetzungsgeschwindigkeit des Produktes zur Folge haben könnten. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass der vierte Ring der Acarbose in Molekül C mit Besetzungsfaktoren von 0.65 verfeinert wurde, so dass auch hier von einer teilweisen Abspaltung ausgegangen werden muss. Eine überdurchschnittliche Flexibilität des Ringes, die bei einer Verfeinerung mit voller Besetzung in erhöhten Auslenkungsparametern resultieren würden, ist, wie bereits diskutiert, unwahrscheinlich.

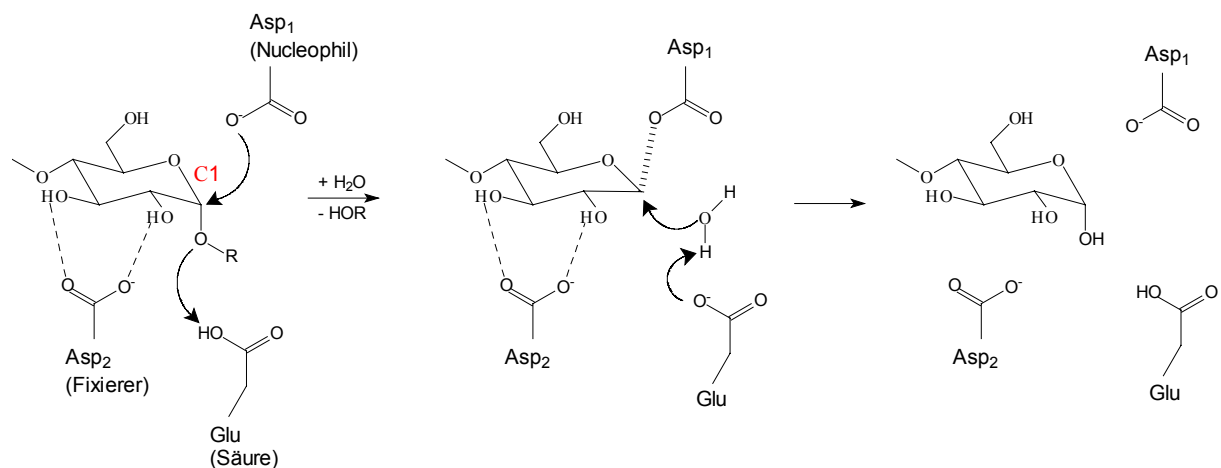
Interessant erscheint im Zusammenhang mit der Inhibitorbindung die Tatsache, dass fünf vergleichsweise starke Wasserstoffbrücken zwischen der Acarbose und dem zweiten Monomer des nicht-kristallographischen Amylase-Dimers ausgebildet werden. Sie alle stabilisieren die Lage des Glucose-Ringes am reduzierenden Ende der Acarbose, der in dem natürlichen Substrat Amylose in der identischen Position gebunden ist. Diese Querverknüpfung könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die katalytisch aktive Einheit der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A *in vivo* ein Dimer ist. Neben Gelfiltrations-experimenten spricht jedoch dagegen, dass bis dato keine als Dimer aktive Amylase bekannt ist und weder die Peptidsequenz, die allgemeine Topologie noch die Geometrie des katalytischen Zentrums der AmyA sich grundlegend von verwandten Strukturen unterscheidet.



**Abb. 4.16:** Stereographische Projektion (*cross eye*) der Bindung des Inhibitors Acarbose im aktiven Zentrum der AmyA. Die Acarbose ist gelb dargestellt, das sie primär bindende Monomer grau. Das zweite Monomer des Dimers ist grün eingefärbt. Die Orientierung der Darstellung entspricht in etwa Abb. 4.13 um ca. 90° gegen den Uhrzeigersinn rotiert.

#### 4.2.2.2 Der katalytische Mechanismus der AmyA

Die durch Amylasen katalysierte Spaltung  $\alpha$ -1,4-glycosidischer Bindungen läuft nach dem Muster einer sauren Hydrolyse in drei Schritten ab (Davies & Henrissat 1995). Nach Protonierung des glycosidischen Sauerstoffes des Substrates durch eine benachbarte Glutaminsäure greift ein Carboxylsauerstoff eines Aspartat-Restes das Kohlenstoffatom C1 der Saccharideinheit in der Position -1 nucleophil an und bildet ein kovalentes Intermediat bzw. stabilisiert das nach Freisetzung des Aglyconrestes entstandene Carbeniumion. Welcher dieser zwei Übergangszustände tatsächlich gebildet wird, konnte bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden. Der nun deprotonierte Glutamatrest aktiviert daraufhin ein Wassermolekül, das dann als Hydroxidion die kovalente Bindung zwischen dem Substrat und dem Enzym spaltet bzw. an das Carbeniumion bindet. Der Mechanismus entspricht damit einer doppelten Inversion (*double displacement mechanism*) unter Retention der  $\alpha$ -anomeren Konfiguration am Kohlenstoffatom C1. Abbildung 4.17 zeigt schematisch die einzelnen Schritte der Hydrolyse.



**Abb. 4.17:** Mutmaßlicher Mechanismus der Hydrolyse  $\alpha$ -glycosidischer Bindungen. Die Existenz des mittig dargestellten Übergangszustandes ist nicht gesichert.

Die drei katalytischen Seitenketten Asp188, Glu228 und Asp280 besetzen jeweils Positionen relativ zu der Acarbose, die mit dem vorgeschlagenen Mechanismus zur hydrolytischen Spaltung der  $\alpha$ -1,4-glycosidischen Bindung vereinbar sind.

Der Carboxylatrest des Asp280 fixiert über die beiden Sauerstoffatome O2A und O3A den Valienaminring (A) in der Position -1 der Bindungstasche. Die Abstände zwischen Wasserstoffdonor und -akzeptor variieren dabei zwischen 2.37 und 3.06 Å.

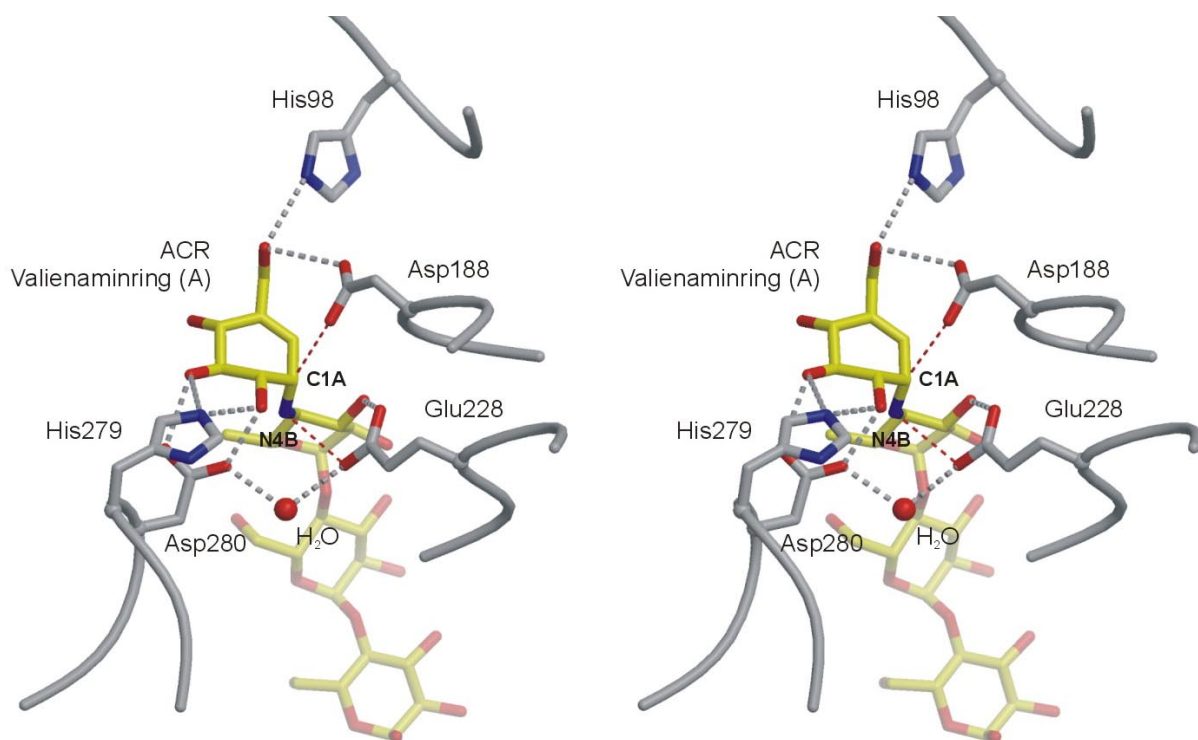
Von dem Atom OE2 der Glutamat-Seitenkette 228 wird angenommen, dass es in dieser Reaktion als Wasserstoffdonor für den glycosidischen Sauerstoff agiert. Sein Abstand zu dem Stickstoff der Acarbose N4B beträgt 2.94 bis 3.08 Å, so dass eine Übertragung des Protons der Carbonsäure auf das verbrückende Sauerstoffatom des physiologischen Substrates Amylose durchaus sinnvoll erscheint. Glu228:OE1 wird über zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Ala189:N und ACR701:O3B stabilisiert, die beide die Rolle eines Wasserstoffdonors übernehmen (siehe Abb. 4.18), so dass eine Protonierung der Seitenkette Glu228 demzufolge nur noch an dem Atom OE2 stattfinden kann. Der postulierte, für eine Glutaminsäureseitenkette hohe pKs-Wert der Carboxylgruppe (Strokopytov *et al.* 1995) ist anhand der chemischen Umgebung des Glu228 jedoch nicht nachvollziehbar. Für eine isolierte, hydrolysierte Carboxylgruppe der Glutaminsäure liegt der pKs-Wert bei ungefähr 4.4 (Stryer 1994), müsste also um mehr als zwei Einheiten angehoben werden, damit Glutaminsäure bei dem für die Katalyse optimalen pH-Wert von 7.0 als Protonendonator agieren kann. Nielsen *et al.* haben kürzlich anhand von Punktmutationen in der chimären *Bacillus* Ba2  $\alpha$ -Amylase gezeigt, dass die messbare, katalytische Aktivität zuckerspaltender Enzyme in Abhängigkeit vom pH-Wert in den meisten Fällen nicht entsprechend den berechneten Veränderungen in der Elektrostatik der aktiven Tasche variiert (Nielsen *et al.* 2001). Daraus folgerten sie, dass das pH-abhängige Aktivitätsprofil von Änderungen in der strukturellen Dynamik des katalytischen Zentrums zumindest ebenso stark beeinflusst wird wie von elektrostatischen Modifikationen, so dass eine Protonierung des Glu228 bei einem pH-Wert von 7.0 zumindest nicht auszuschließen ist. Da bei einer Auflösung von 1.9 Å aber weder Wasserstoffatome selbst nachweisbar, noch über unterschiedliche C<sub>δ</sub>-O<sub>ex</sub>-Bindungslängen zweifelsfrei einem der Carboxylatsauerstoffatome zuzuweisen sind, kann ein Beweis der Protonierung des Glu228 nicht erbracht werden.

Mit Abständen zwischen 2.74 und 3.23 Å befindet sich Asp188:OD1 in einer Entfernung zu ACR701:C1A, die in etwa dem minimalen nichtbindenden Abstand eines Sauerstoffatoms zu einem Kohlenstoffatom entspricht bzw. knapp darüber liegt. Damit wäre Asp188:OD1 in der Lage, den Kohlenstoff in der physiologischen Reaktion nucleophil anzugreifen und das postulierte Carbeniumion zu stabilisieren, bzw. ein kovalentes Intermediat zu bilden (Yoshioka *et al.* 1997).

Die Seitenketten der Histidine His98 und His279 tragen wie erwartet zur Fixierung der Saccharideinheit in der Position -1 bei. Eine direkte Beteiligung an der katalytischen Reaktion

ist aufgrund ihres größeren Abstandes zu den Atomen C1A und N4B (bzw. dem glycosidischen Sauerstoff) nicht anzunehmen.

In jedem der vier Monomere existiert ein gut definiertes Wassermolekül, das im dritten Teilschritt der Reaktion nach Aktivierung durch Glu228:OE2 in der Lage wäre, das kovalente Intermediat zu hydrolysieren bzw. an das stabilisierte Carbeniumion zu binden. H<sub>2</sub>O:119 befindet sich in Monomer A 2.93 Å von Glu228:OE2 entfernt und weist zu dem Kohlenstoffatom der Acarbose C1A einen Abstand von 5.15 Å auf. In den anderen drei Monomeren variieren die Werte zwischen 2.77 und 2.97 bzw. 4.32 und 4.57 Å. Für eine Beteiligung dieses Wassermoleküls an der Spaltung des Polysaccharids spricht auch die Tatsache, dass es in verschiedenen Amylasestrukturen sowohl innerhalb der Prokaryoten als auch der Eukaryoten konserviert ist (Gilles *et al.* 1996, Dauter *et al.* 1999). Abbildung 4.18 zeigt die Acarbose mit den beschriebenen Aminosäuren und dem angesprochenen Wassermolekül in der Bindungstasche exemplarisch für Monomer A.

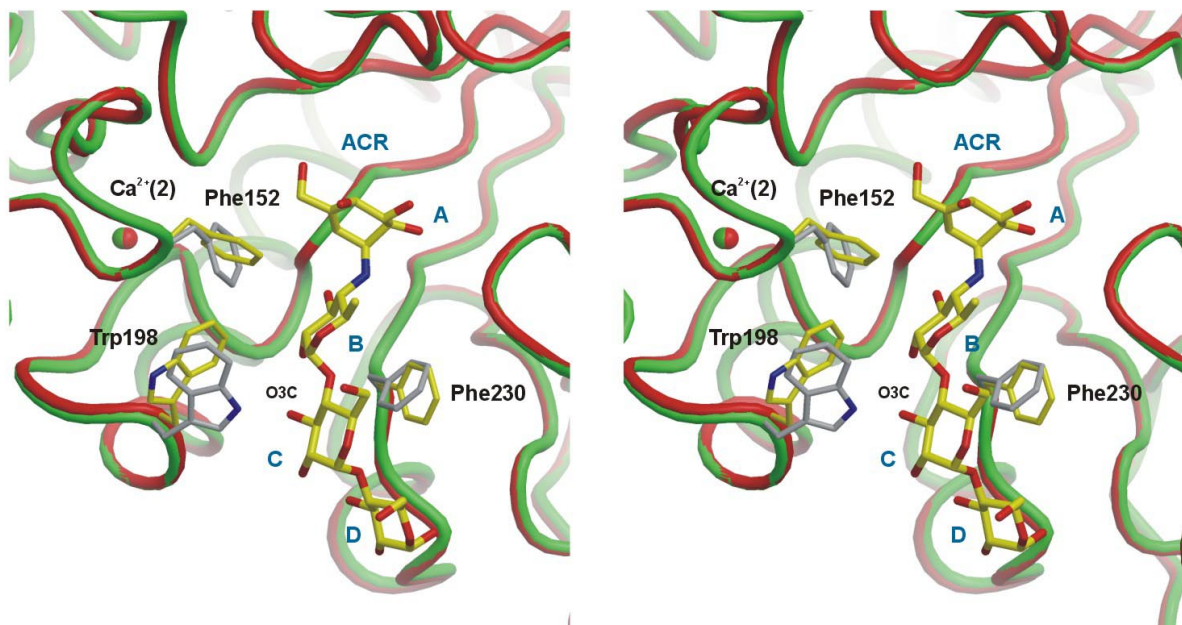


**Abb. 4.18:** Wechselwirkungen zwischen den katalytisch aktiven Resten der AmyA und dem Inhibitor Acarbose im aktiven Zentrum (stereographische Projektion, *cross eye*). Die Acarbose ist gelb, die AmyA grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind ebenfalls in grau eingezeichnet, die Protonierung durch Glu228 sowie der nucleophile Angriff des Asp188 auf das Atom C1A sind durch rote Linien angedeutet. Die Orientierung der Darstellung ist relativ zu Abb. 4.13 etwa 90° gegen den Uhrzeigersinn rotiert.



#### 4.2.2.3 Acarbose-induzierte Konformationsänderungen im aktiven Zentrum

Mit Hilfe des Programms ESCET (Schneider 2002) konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Acarbose im aktiven Zentrum der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A zu keiner signifikanten Änderung der Tertiärstruktur des Enzyms führt. Dies gilt analog auch für die Seitenketten, die mit dem Inhibitor die zuvor beschriebenen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Ein Umklappen einer oder mehrerer Seitenketten oder eine signifikante Bewegung des katalytisch relevanten Calciumions konnten in keinem der Monomere beobachtet werden. Die durch die Koordination der Acarbose induzierten Bewegungen beschränken sich auf die drei Aminosäuren Phe152, Trp198 und Phe230, die durch Rotation um die Winkel  $\chi_1$  bzw.  $\chi_2$  Raum für die Acarbose frei geben. Dabei besetzen Phe152 und Phe230 in allen vier Monomeren des Komplexes fest definierte, identische Positionen. Trp198 dagegen liegt in dieser Struktur in drei unterschiedlichen Konformationen vor, wobei in einem Fall eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zum O3C der Acarbose gebildet wird. In dem unbeladenen Enzym dagegen ist Trp198 ebenfalls auf einer Position fixiert. Abbildung 4.19 zeigt vergleichend die Orientierungen der angesprochenen Aminosäuren im aktiven Zentrum der leeren Amylasestruktur und des Acarbose-Komplexes.

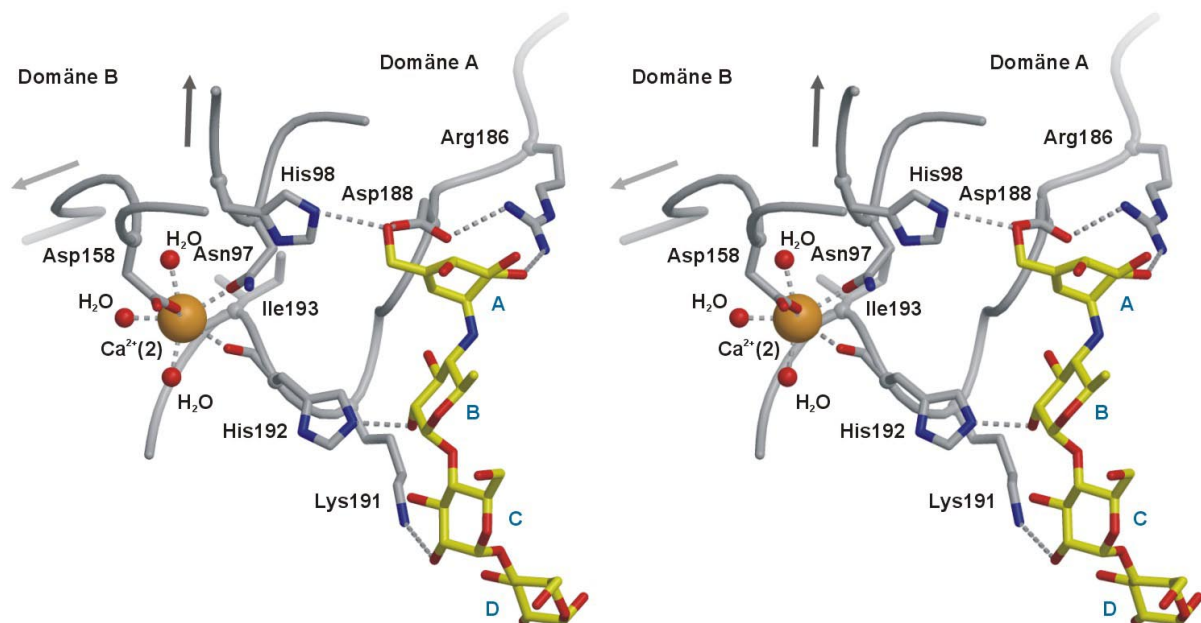


**Abb. 4.19:** Inhibitor-induzierte Konformationsänderungen im aktiven Zentrum der *T. maritima*  $\alpha$ -Amylase A, dargestellt in stereographischer Projektion (*cross eye*). Das nicht-komplexierte Enzym ist grün bzw. grau dargestellt, der Enzym-Inhibitor-Komplex rot bzw. gelb. Die Orientierung der Abbildung entspricht der aus Abb. 4.16, die Beschriftung der Acarbose (blau) wurde analog Abb. 4.9 eingefügt.

#### 4.2.2.4 Funktion des katalytisch relevanten Calciums

Das zwischen den Domänen A und B lokalisierte Calciumion ist innerhalb der Familie 13  $\alpha$ -Amylasen konserviert und für die katalytische Aktivität des Enzyms zwingend erforderlich. Arbeiten an dem homologen Protein von *Aspergillus oryzae* gehen davon aus, dass die Rolle dieses Ions vor allem strukturgebender Natur ist (Boel *et al.* 1990, Molodova *et al.* 1965). Dies lässt sich auch aus der Röntgenstruktur des bestimmten AmyA''-Acarbose-Komplexes ableiten.

Ca<sup>2+</sup> wird von den Seitenketten der Aminosäuren Asn97 und Asp158 koordiniert, die beide in *loops* lokalisiert sind, welche jeweils eine Verbindung zwischen dem zentralen TIM-Barrel und der Domäne B bilden. Weiterhin koordinieren auch die Carbonylsauerstoffatome der Aminosäuren Ile193 und His192 an das genannte Calciumion. Entscheidend ist dabei, dass die Seitenketten der Aminosäuren His192 und des benachbarten Lys191 an der Fixierung des 6-Deoxyglucosids (Ring B in Position +1) bzw. der ersten Glucoseeinheit (Ring C, Position +2) der Acarbose beteiligt sind. Das dem Asn97 benachbarte His98 bindet außerdem den Valienaminring (Ring A, Position -1) ebenfalls über eine Wasserstoffbrücke. Abbildung 4.20 verdeutlicht die beschriebene Verbindung der Domäne B über das Calciumion Ca<sup>2+</sup> mit den Aminosäuren, die den Inhibitor bzw. das Substrat in der aktiven Tasche fixieren.



**Abb. 4.20:** Stereographische Darstellung (*cross eye*) der Verbindung der Domänen A und B über das zur Katalyse notwendige Calcium-Ion Ca<sup>2+</sup>. Die Pfeile deuten die Position der Domäne B an. Die Orientierung entspricht der in Abb. 4.16, die Saccharideinheiten der Acarbose sind analog Abb. 4.9 benannt.

Es ist anzunehmen, dass es mit einer Entfernung des Calciumions durch Zusatz von EDTA zu einer teilweisen Umlagerung der Hauptkette in diesem Bereich des Proteins kommt. Dies hätte zur Folge, dass die Seitenketten der Aminosäuren His98, Lys191, His192 und eventuell auch das katalytische Nucleophil Asp188:OD1 nicht mehr wie zuvor an die Acarbose bzw. das Substrat koordinieren können. Das Resultat ist eine verminderte Bindungsaffinität und damit verbunden die drastische Abnahme der katalytischen Aktivität des Enzyms bis hin zur vollständigen Inaktivierung. Aufgrund der relativ geringen Entfernung des Ca<sup>2+</sup> zu dem Nucleophil Asp188:OD1 von knapp 10 Å sind überdies elektrostatische Veränderungen in der aktiven Tasche bei Entfernung des Metallkations denkbar, die sich ebenfalls negativ auf die Aktivität der AmyA auswirken könnten.

Das Enzym 4- $\alpha$ -Glucanotransferase aus *Thermotoga maritima*, von dem kürzlich die Kristallstruktur veröffentlicht wurde, katalysiert prinzipiell die gleiche Reaktion wie AmyA, die Hydrolyse des Übergangszustandes erfolgt jedoch nicht durch ein Wassermolekül, sondern die 4-Hydroxylgruppe eines Saccharids, so dass statt einer Hydrolyse ein Transfer stattfindet (Roujeinikova *et al.* 2002). Acarbose wird in der aktiven Tasche dieses Enzyms analog der Acarbose in AmyA gebunden, wobei aber statt der Abspaltung des Glucoserestes D ein zusätzlicher Rest in der Position -2 beobachtet werden kann. Die generelle Topologie des Enzyms stimmt mit einem zentralen TIM-Barrel sowie den zusätzlichen Domänen B und C ebenfalls weitgehend mit der der AmyA'' überein. Im Gegensatz zu letztgenanntem Enzym ist die 4- $\alpha$ -Glucanotransferase jedoch nicht calciumabhängig und weist an der Position des Ca<sup>2+</sup> in AmyA auch kein Calcium- oder äquivalentes Metallkation auf. Eine genaue Inspektion der Struktur in diesem Bereich zeigt, dass die Verknüpfung der beiden Domänen in diesem Enzym über direkte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäuren ausgebildet werden, die im Vergleich zur Sequenz der AmyA'' teilweise mutiert sind. Statt des ‚Umweges‘ Asn97:OD1-Ca<sup>2+</sup>-His192:O existiert in diesem Molekül beispielsweise ein direkter Kontakt zwischen His93:ND1 und His190:O, wobei His93 aus der Glucanotransferase dem Asn97 in der dreidimensionalen Struktur der AmyA'' entspricht. In ähnlicher Weise werden die Atome Arg147:NH1 und Asp193:OD1 über eine Wasserstoffbrücke aneinander fixiert, während zwischen den entsprechenden Aminosäuren Phe149 und Gly 195 in AmyA kein Kontakt besteht.

Der Befund, dass die 4- $\alpha$ -Glucanotransferase aus *Thermotoga maritima* mit einer sehr ähnlichen Struktur prinzipiell die gleiche Reaktion katalysiert wie AmyA, dabei aber nicht

abhängig ist von dem Vorhandensein von Calcium, unterstützt die Annahme, dass der entscheidende Effekt des Calciums tatsächlich die Erhaltung der dreidimensionalen Struktur und weniger die Einstellung eines bestimmten elektrostatischen Potentials im Bereich der aktiven Tasche ist.

### 4.3 Thermostabilität der *Thermotoga maritima* $\alpha$ -Amylase A

Zur Diskussion der Thermostabilität eines Proteins ist es entscheidend, präzise zu definieren, was genau unter diesem Terminus verstanden wird. Thermostabilität wird teilweise über die Dauer definiert, die ein Protein bei Temperaturen knapp unter 100°C überlebt, bevor es inaktiviert wird, teilweise darüber ob und in welchem Umfang eine thermische Denaturierung bei höheren Temperaturen stattfindet (Petsko 2001). Von thermischer Denaturierung spricht man, wenn größere Teile der Tertiärstruktur durch Auflösung strukturgebender Wechselwirkungen auseinanderbrechen. Dabei handelt es sich in der Regel um einen reversiblen Prozess. Thermische Inaktivierung dagegen ist oftmals auf Änderungen bezüglich der chemisch kovalenten Struktur eines Proteins zurückzuführen und damit in der Mehrzahl der Fälle irreversibel (Ahern & Klibanov 1985). Typische Beispiele sind Spaltungen der Polypeptidkette (Ahern & Klibanov 1988), Isomerisierungen von Seitenketten (Tomazic & Klibanov 1988) oder die Desamidierung von Asparagin-Seitenketten (Ahern *et al.* 1987). Die folgende Diskussion zur Thermostabilität der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A beschränkt sich weitgehend auf Aspekte, die mit der Entfaltung des Proteins korreliert sind, jedoch keinen Einfluss auf seine kovalent chemische Natur haben.

Als psychrophil gelten generell Organismen, deren Temperaturoptimum zwischen 15 und 20°C liegt, mesophile Organismen haben eine maximale Wachstumsrate zwischen 20 und 45°C, thermophile etwa zwischen 50 und 70°C und hyperthermophile Organismen weisen ein Temperaturoptimum oberhalb von ungefähr 80°C auf. Die Lücken zwischen den Werten deuten an, dass die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien fließend sind. Ein vielversprechender Ansatz zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Struktur und der Thermostabilität eines Proteins ist der Vergleich homologer Enzyme aus psychrophilen, mesophilen, thermo- und hyperthermophilen Organismen (Kelly *et al.* 1993, Tanner *et al.* 1996). Aus eventuellen Trends lassen sich entsprechende Aussagen über die Ursachen der Stabilisierung (hyper-)thermophiler Enzyme ableiten. Eindeutige Beweise bezüglich einzelner stabilisierender Effekte können mit Hilfe dieser Methode jedoch nicht erbracht werden, da

innerhalb der betrachteten Enzyme immer mehrere Parameter gleichzeitig und unabhängig voneinander variieren und unterschiedliche Beiträge zur Thermostabilisierung leisten. Dagegen liefert die gezielte biochemische Veränderung einer Proteinstruktur, z.B. durch Mutation von Aminosäuren, die mit der Thermostabilität in Verbindung gebracht werden (Watanabe *et al.* 1994, Watanabe *et al.* 1997, Matsumura *et al.* 1989), eindeutige Daten, muss sich aber konzeptionsbedingt auf wenige Aspekte beschränken und ist zudem ungleich aufwendiger.

Die folgenden Untersuchungen konzentrieren sich auf Vergleiche zwischen vier bakteriellen  $\alpha$ -Amylasen und einer weiteren aus dem Reich der Mammalier sowie der Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus cereus* (1uok). Die Sequenz und räumliche Struktur des letztgenannten Enzyms sind denen der AmyA besonders ähnlich (siehe Abb. 3.5 und Abb. 4.5), jedoch ist diese Glucosidase bezüglich ihrer Thermostabilität mit einer Entfaltungstemperatur von nur 44.5°C als ausgesprochen mesophil einzustufen. Bei *Alteromonas haloplanctis* handelt es sich um ein antarktisches Bakterium, dessen  $\alpha$ -Amylase (1aqh) den bis heute einzigen Vertreter einer psychrophilen Glucosidase mit bekannter 3D-Struktur darstellt (Aghajari *et al.* 1998). Das Enzym weist eine 66%ige Sequenzähnlichkeit mit dem homologen Enzym aus der Schweineleber (1dhk) auf (Feller *et al.* 1994). Letzteres Protein bietet sich zudem für Vergleiche an, da es unter allen Amylasen am genauesten charakterisiert ist (Wiegand *et al.* 1995, Qian *et al.* 1993, Brayer *et al.* 1995). *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -Amylase (1bag bzw. 1bli) entstammen beide einem mesophilen Bakterienstamm, können selbst jedoch mit optimalen Katalysertemperaturen von 80 bzw. 90°C als hyperthermophil bezeichnet werden. Beide Enzyme erscheinen für Vergleiche interessant, da sie in der Stärke-verarbeitenden Industrie eingesetzt werden und bereits Untersuchungen bezüglich ihrer Thermostabilität durchgeführt wurden (Declerck *et al.* 2000, Janecek 1993).

**Tab. 4.3:** Thermostabilität und Thermophilie zum Vergleich ausgewählter Organismen bzw. Glucosidasen.  $T_{\text{opt}}$  beschreibt die Temperaturen, bei denen der Organismus die höchste Wachstumsrate zeigt, bzw. das Enzym die höchste katalytische Aktivität.  $T_{\text{melt}}$  bezeichnet die Temperatur, bei der 50% des Enzyms in reversibel hitzeinaktivierter Form vorliegen. Die in der Tabelle fehlenden Werte konnten nicht ermittelt werden.

pdb Code	Organismus / Enzym	$T_{\text{opt}}$ (Organismus) [°C]	$T_{\text{opt}}$ (Enzym) [°C]	$T_{\text{melt}}$ (Enzym) [°C]
1aqh	<i>A. haloplanctis</i>	< 4		43.7
1dhk	<i>S. scrofa</i> (Wildschwein)	37		
1bag	<i>B. subtilis</i>	30	80	
1bli	<i>B. licheniformis</i>	mesophil	90	
(AmyA)	<i>T. maritima</i>	80	90	
1uok	<i>B. cereus</i> Oligo-1,6-Glucosidase	30		44.5

#### 4.3.1 Packungseffekte

Es konnte gezeigt werden, dass eine dichtere Packung mit weniger Einkerbungen und eine daraus resultierende, globulärere Proteinstruktur zu einer erhöhten Thermostabilität beitragen können (Thompson & Eisenberg 1999, Szilagyi & Zavodszky 2000). In diesem Zusammenhang spielen zwei generelle Komponenten eine Rolle:

1. Die Packung individueller Atome bzw. Aminosäuren innerhalb eines Proteins.
2. Die Packung bzw. Oligomerisierung ganzer Moleküle *in vivo*.

Villeret *et al.* haben gezeigt, dass letztere zu einer extremen Thermostabilisierung in Ornithine Carbamylotransferase aus *Pyrococcus furiosus* führen kann (Villeret *et al.* 1998). In einem umfassenderen Vergleich thermostabiler Enzyme mit ihren mesophilen Verwandten konnte dieser Effekt aber nur in einer von 18 Proteinfamilien beobachtet werden (Kumar *et al.* 2000), so dass die Bildung von Oligomeren als generelles Mittel der Thermostabilisierung eher unwahrscheinlich ist.

Die zum Vergleich herangezogenen Amylasen sind alle als Monomer aktiv. Wie zuvor beschrieben, kristallisiert *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A zwar als Dimer, Gelfiltrationsexperimente belegen jedoch, dass das Enzym in Lösung nahezu vollständig in seiner monomeren Form existiert (Fütterer 2002). Ein positiver Effekt bezüglich der Thermostabilisierung durch die Bildung von Oligomeren ist für AmyA demzufolge nicht nachweisbar, wenngleich einige Ergebnisse der Strukturanalyse wie die große Kontaktfläche

zwischen den Monomeren und die Koordinierung der Acarbose durch das zweite Monomer auf eine dimere Existenz hindeuten.

Zum Vergleich der intramolekularen Packungen der Moleküle innerhalb dieser Familie wurden für jedes Monomer seine Oberfläche sowie das davon eingeschlossene Volumen berechnet und mit der Länge der Polypeptidkette korreliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

**Tab. 4.4:** Individuelle Packungsparameter für der Vergleich herangezogenen Familie 13 Glucosidasen.

pdb Code	Organismus / Enzym	Anzahl Aminosäuren	Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Oberfläche pro AS [Å <sup>2</sup> ]	Volumen [Å <sup>3</sup> ]	Oberfläche-Volu- men-Verhältnis [Å <sup>-1</sup> ]
1aqh	<i>A. haloplanctis</i>	448	16086	35.9	65450	0.246
1dhk	<i>S. scrofa</i>	496	17724	35.7	71912	0.246
1bag	<i>B. subtilis</i>	425	15104	35.5	63191	0.239
1bli	<i>B. licheniformis</i>	483	17265	35.7	71955	0.240
(AmyA)	<i>T. maritima</i>	505	18701	37.0	76669	0.243
luok	<i>B. cereus</i> Oligo-1,6- Glucosidase	558	21680	38.9	89103	0.243

Das Verhältnis der Oberfläche des Proteins zu seinem Volumen variiert nur geringfügig zwischen den untersuchten Strukturen. Signifikante Änderungen oder gar eine Tendenz zu einer dichteren Packung mit erhöhter Thermostabilität sind in den obigen Daten nicht erkennbar. Entgegen der Hypothese ist die Oberfläche pro Aminosäure für die thermostabile AmyA'' mit 37.0 Å<sup>2</sup> sogar größer als für die psychrophile α-Amylase aus *Alteromonas haloplanctis* mit 35.9 Å<sup>2</sup>, so dass für das thermostabile Enzym eher eine lockerere denn eine festere Packung vorliegt.

### 4.3.2 Wasserstoffbrückenbindungen

Sowohl die reine Anzahl bzw. Dichte von Wasserstoffbrückenbindungen als auch deren spezifische Anordnung haben Auswirkungen auf die Thermostabilität von Makromolekülen (Vogt *et al.* 1997, Kumar *et al.* 2000). In vielen Fällen führt eine quantitative Zunahme dieser Wechselwirkungen zu einer erhöhten Thermostabilität, es existieren aber ebenso Strukturen hyperthermophiler Proteine mit weniger Wasserstoffbrückenbindungen als in ihren mesophilen Verwandten. Von besonderem Interesse waren dabei in früheren Studien

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Seitenketten, aus denen weitgehend konsistente Ergebnisse erhalten wurden. Tanner *et al.* haben sich speziell mit dem Einfluss von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen geladenen Seitenketten und neutralen Partnern beschäftigt. In der Familie der D-Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenasen (GAPDH) fanden sie eine starke Korrelation zwischen der Anzahl solcher Wasserstoffbrückenbindungen und der Thermostabilität der jeweiligen Enzyme. Den positiven Einfluss dieser Wechselwirkungen führen die Autoren auf eine elektrostatische Stabilisierung zurück, die im Gegensatz zu reinen Salzbrücken mit einem geringeren Energieaufwand für die Desolvatation der Bindungspartner auskommt (Tanner *et al.* 1996).

Wie aus Tabelle 4.5 ersichtlich, besteht zwischen der Anzahl aller Wasserstoffbrückenbindungen und der Thermostabilität der ausgewählten Amylasen keine stetige Korrelation. Gleichwohl ist aber eine Tendenz zu einem ausgeprägteren Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk für die thermophilen Enzyme aus *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* und *Thermotoga maritima* deutlich zu erkennen. Bezogen auf die Länge der Peptidkette bilden diese drei Enzyme signifikant (8 - 19%) mehr Wasserstoffbrücken aus als ihre mesophilen und psychrophilen Homologen aus dem Schwein oder *Alteromonas haloplanctis*. Die Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus cereus* fügt sich jedoch nicht in dieses Schema ein. Obwohl das Enzym mehr Wasserstoffbrücken pro Aminosäure ausbildet als AmyA (1.181 gegenüber 1.156), liegt seine Schmelztemperatur mit lediglich 44.5°C weniger als ein Grad über der der psychrophilen Amylase aus *Alteromonas haloplanctis*. Die beschriebene Tendenz gilt analog auch für geladene Wasserstoffbrückenbindungen. Lediglich die thermostabile  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus subtilis* zeigt in diesem Fall mit 0.23 geladenen Wasserstoffbrückenbindungen pro Aminosäure den kleinsten beobachteten Wert und fällt damit aus dem beschriebenen Schema heraus. Betrachtet man ausschließlich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Seitenkettenatomen, so weist AmyA'' trotz der hohen Thermostabilität den niedrigsten Wert auf, wengleich ansonsten innerhalb der Amylasen durchaus eine Tendenz zu mehr Wasserstoffbrücken besteht.



**Tab. 4.5:** Anzahl der Wasserstoffbrücken in den untersuchten Amylasen. Werte in Klammern sind normiert auf die Anzahl der Aminosäuren.

pdb Code	Organismus	Anzahl Wasserstoffbrücken	Anzahl geladene Wasserstoffbrücken	Anzahl Wasserstoffbrücken zwischen zwei Seitenketten
1aqh	<i>A. haloplanctis</i>	480 (1.071)	106 (0.237)	65 (0.145)
1dhk	<i>S. scrofa</i>	518 (1.044)	127 (0.256)	69 (0.139)
1bag	<i>B. subtilis</i>	523 (1.231)	99 (0.233)	78 (0.184)
1bli	<i>B. licheniformis</i>	603 (1.248)	182 (0.377)	108 (0.224)
(AmyA)	<i>T. maritima</i>	584 (1.156)	144 (0.285)	69 (0.137)
1uok	<i>B. cereus</i> Oligo-1,6- Glucosidase	659 (1.181)	172 (0.308)	111 (0.199)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass innerhalb der verglichenen Amylasen insgesamt eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen und der Thermostabilität besteht. AmyA selbst entspricht sowohl im Bezug auf die Anzahl aller als auch bezüglich seiner geladenen Wasserstoffbrückenbindungen diesem Schema. Die unterdurchschnittliche Dichte entsprechender Wechselwirkungen zwischen Seitenkettenatomen entspricht jedoch nicht den Erwartungen. Ebenso erstaunt, dass die aus dem mesophilen Bakterium *Bacillus cereus* stammende Oligo-1,6-Glucosidase mit einem Schmelzpunkt von 44.5°C in allen Disziplinen Werte aufweist, die in Bereichen der thermostabilen Amylasen liegen.

Domänenübergreifende Wasserstoffbrückenbindungen wurden vor dem Hintergrund der strukturellen Ähnlichkeit für die Enzyme aus *Thermotoga maritima* und *Bacillus cereus* im Detail untersucht. In AmyA wird das C-terminale  $\beta$ -Faltblatt über neun Wasserstoffbrücken an der zentralen Domäne A fixiert. Diese relativ feste Anbindung erklärt die im Vergleich zur restlichen Struktur vergleichsweise gering erhöhten B-Faktoren innerhalb des Faltblattes, das ansonsten nur über eine scharnierähnliche und damit konformationell flexible (kovalente) Verbindung zu dem zentralen TIM-Barrel verfügt (vergl. Abb. 4.4). Domäne B, die mit Hilfe fehlerskalierter Differenz-Distanz-Matrizen bereits als relativ flexibel charakterisiert werden konnte (siehe Kap. 4.1.2.2), ist über eine einzelne Wasserstoffbrücke an die Helix  $\alpha_3$  des  $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels angeheftet (Lys165:NZ-Pro117:O) und bewegt sich gemeinsam mit dieser. Weiterhin bildet AmyA'' 22 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Extrusion nach dem Strang  $\beta_7$  und dem zentralen Barrel aus. Das Interface zwischen den Domänen A und C in der Oligo-1,6-Glucosidase von *Bacillus cereus* ähnelt weitgehend dem der AmyA'' und die

Anzahl der Wasserstoffbrücken zu der oben beschriebenen Extrusion ist mit 20 nahezu identisch. Große Unterschiede bestehen aber in der Bindung der Domäne B, die in BCOG über ungefähr 14 Wasserstoffbrückenbindungen an der zentralen Domäne A fixiert wird. Überdurchschnittlich hohe Auslenkungsparameter deuten aber auch in diesem Enzym auf eine erhöhte Flexibilität hin. Betrachtet man diesen Befund isoliert, so wäre zu erwarten, dass die Entfaltungstemperatur  $T_{\text{melt}}$  der Oligo-1,6-Glucosidase oberhalb der der AmyA'' läge, da die Verknüpfung der Domänen untereinander stärker ausgeprägt ist und somit mehr Energie zu ihrer Entfaltung aufgebracht werden müsste. Letztlich zeigen die Daten aber nur, dass die geringe Thermostabilität der BCOG nicht auf eine wenig entwickelte Verbindung der einzelnen Domänen untereinander zurückzuführen ist.

### 4.3.3 Ionische Wechselwirkungen

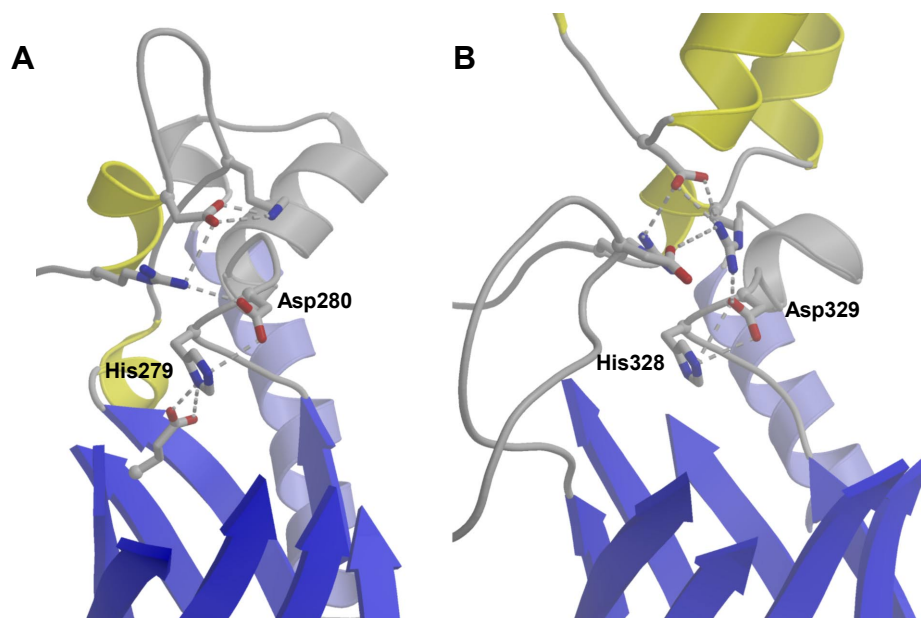
In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, in wieweit und in welcher Weise sich Salzbrücken innerhalb eines Proteins auf dessen Thermostabilität auswirken können (Vetriani *et al.* 1998). Eine Reihe der Ergebnisse wurden von Kumar und Nussinov (Kumar & Nussinov 2001) zusammengefasst und zeigen, dass ionische Wechselwirkungen sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Effekte haben können. Kontakte zwischen geladenen Resten auf der Proteinoberfläche, die beispielsweise einen beweglichen *loop* oder Terminus an dem globulären Bereich des Proteins fixieren, scheinen ebenso wie größere Netzwerke von Salzbrücken stabilisierend zu wirken. Andererseits lässt sich aus theoretischen Berechnungen ableiten, dass die Bildung von Salzbrücken während der Faltung einen destabilisierenden Einfluss auf die dreidimensionale Struktur eines Proteins haben kann, da in diesem Fall hohe Desolvatationsenergien aufzuwenden sind, die in der gefalteten Struktur oft unkompensiert bleiben (Hensch & Tidor 1994, Sheinermann *et al.* 2000).

Tabelle 4.6 zeigt, dass die Anzahl der Salzbrücken ( $d \leq 4.0 \text{ \AA}$ ) innerhalb der verglichenen Amylase-Strukturen unabhängig von der Thermostabilität variiert und unterstützt somit die Theorie des verschiedenartigen Einflusses ionischer Wechselwirkungen.

**Tab 4.6:** Ionische Wechselwirkungen innerhalb der Strukturen der untersuchten Glucosidasen. Der maximale Abstand der ionischen Partner zueinander beträgt 4.0 Å. Die Netzwerke wurden nach Durchsicht der einzelnen Ionenpaare identifiziert.

pdb Code	Oragnismus	Anzahl Reste	Salzbrücken (pro Aminosäure)	größtes Netzwerk
1aqh	<i>A. haloplanctis</i>	448	43 (0.096)	4
1dhk	<i>S. scrofa</i>	496	46 (0.093)	5
1bag	<i>B. subtilis</i>	425	33 (0.078)	4
1bli	<i>B. licheniformis</i>	483	63 (0.130)	4
(AmyA)	<i>T. maritima</i>	505	44 (0.087)	6
luok	<i>B. cereus</i> Oligo-1,6-Glucosidase	558	70 (0.125)	6

Eine genauere Analyse dieses Einflusses erlaubt unter Umständen die Betrachtung zusammenhängender Netzwerke geladener Aminosäureseitenketten. Während das größte derartige Netzwerk in den untersuchten Enzymstrukturen häufig vier und maximal fünf Aminosäuren umfasst, ist es in AmyA'' und *Bacillus cereus* Oligo-1,6-Glucosidase aus sechs Seitenketten aufgebaut. In beiden Proteinen ist dieses Netzwerk an der Carboxyseite des  $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels lokalisiert und dient vermutlich zur Fixierung der Extrusion nach dem siebten Strang dieser Struktur an die zentrale Domäne A (siehe Abb. 4.21).



**Abb. 4.21:** Netzwerke zusammenhängender Salzbrücken in den Strukturen der AmyA'' (A) und der Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus cereus* (B). In beiden Clustern sind zwei jeweils äquivalente Seitenketten der aktiven Tasche eingebunden. Die Farbgebung der ‚Domänen‘ entspricht Abbildung 4.4.

Die weitgehende Übereinstimmung dieser Strukturen verknüpfter Salzbrücken ist in Abbildung 4.21 dargestellt und manifestiert sich in der Tatsache, dass in beiden Netzwerken je zwei äquivalente Aminosäureseitenketten aus der aktiven Tasche eingebaut sind (His279 und Asp280 in AmyA'' und His328 und Asp329 in BCOG).

Obwohl die angesprochene Extrusion auf der Oberfläche der AmyA'' lokalisiert und reich an *loops* ist, treten in dieser Region weder auffällig hohe Auslenkungsparameter noch signifikant unterschiedliche Konformationen in den unabhängigen Molekülen auf (vergl. Kap. 4.1.2). Demzufolge ist anzunehmen, dass das beschriebene Netzwerk ionischer Wechselwirkungen neben den zuvor betrachteten Wasserstoffbrückenbindungen signifikant zur Stabilisierung dieser Region beiträgt. Differenzierte Aussagen in Zusammenhang mit der unterschiedlichen Thermostabilität der verglichenen Enzyme können jedoch angesichts der Ähnlichkeit der beschriebenen Netzwerke in AmyA'' und BCOG nicht gemacht werden. Hierzu wäre es notwendig, das angesprochene Netzwerk durch Mutation beteiligter Aminosäuren zu verändern und die damit verbundene Änderung in der Schmelztemperatur  $T_{\text{melt}}$  aufzunehmen.

#### 4.3.3.1 Calciumionen

In Zusammenhang mit ionischen Wechselwirkungen müssen neben den Salzbrücken zwischen geladenen Seitenketten entsprechender Aminosäuren auch komplexierte Ionen berücksichtigt werden. Insbesondere von Calcium ist für eine Reihe von Glucosidasen bekannt, dass es die dreidimensionale Struktur der Enzyme stabilisiert und so zu einer Anhebung der Entfaltungstemperatur  $T_{\text{melt}}$  beiträgt (Savchecko *et al.* 2002, Igarashi *et al.* 1998). Mit Ausnahme der Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus cereus*, die in Gegenwart von EDTA kristallisiert wurde (Watanabe *et al.* 1997), ist in jeder der untersuchten Glucosidasestrukturen zumindest das katalytisch essentielle Calciumion gebunden.

**Tab. 4.7:** Anzahl komplexierter Calciumionen in den untersuchten Enzymen.

pdb Code	Organismus	Anzahl Reste	Anzahl Ca <sup>2+</sup>
1aqh	<i>A. haloplanctis</i>	448	1
1dhk	<i>S. scrofa</i>	496	2
1bag	<i>B. subtilis</i>	425	3
1bli	<i>B. licheniformis</i>	483	3
(AmyA)	<i>T. maritima</i>	505	4 - 5
1uok	<i>B. cereus</i> Oligo-1,6-Glucosidase	558	0 (EDTA)

Tabelle 4.7 zeigt, dass in den thermostabilen Amylasen absolut gesehen mehr Calciumionen vorhanden sind als in den meso- bzw. psychrophilen Enzymen aus *Sus scrofa* (Wildschwein) und *Alteromonas haloplanctis*. Da die Werte jedoch insgesamt klein und absolut betrachtet ähnlich sind, können zuverlässige Aussagen nicht abgeleitet werden. Für die  $\alpha$ -Amylase A aus *Thermotoga maritima* ist aber bekannt, dass das Enzym durch Behandlung mit EDTA bei 65°C 79% seiner katalytischen Aktivität verliert und dieser Wert bei 80°C auf 88% ansteigt (Liebl *et al.* 1997). In beiden Fällen lässt sich durch späteren Zusatz von 2mM CaCl<sub>2</sub> die Aktivität des Proteins zu 68 bzw. 77% wieder herstellen. Ausgehend von der aufgestellten Hypothese, dass das katalytisch relevante Ca(2) in erster Linie strukturgebende Funktion hat (vergl. Kap. 4.2.2.4), deutet dieser Befund auf eine reversible Entfaltung der AmyA mit der Entfernung des Calciums hin. Ein solcher Verlust der räumlichen Struktur wäre auch mit der Entfernung der Calciumionen Ca(3) und Ca(4) konsistent, die in der *loop*-reichen Extrusion nach dem Strang  $\beta$ 7A wahrscheinlich die dreidimensionale Konformation dieser Region fixieren.

Da der relative Aktivitätsverlust mit der Inkubationstemperatur zunimmt, kann Calcium direkt mit der Thermostabilität des Enzyms in Zusammenhang gebracht werden. Ungewöhnlich erscheint in diesem Zusammenhang jedoch die Tatsache, dass der Zusatz von lediglich 10 mM CaCl<sub>2</sub> innerhalb von zwei Stunden zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms bei 80°C führt. Wenngleich nicht geklärt ist, wodurch diese Inaktivierung zustande kommt, so erscheint sie doch konsistent mit der Beobachtung, dass in der Kristallisation des Enzyms mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen keine für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Einkristalle erhalten werden konnten (vergl. Kap. 3.3). Selbiges gilt für Kristallisationsversuche mit EDTA.

#### 4.3.4 Disulfidbrücken

Durch Mutation einzelner sowie mehrerer Cystein-Reste in verschiedenen Proteinen konnte eindeutig gezeigt werden, dass Disulfidbrücken die Thermostabilität eines Enzyms in bestimmten Fällen deutlich erhöhen können. Durch die Einführung dreier Cystinbrücken in das normalerweise Cystin-freie Lysozym des T4-Phagen konnte die Entfaltungstemperatur um beachtliche 23.4°C erhöht werden (Matsumura *et al.* 1989). In ähnlicher Weise führte die Deletion einer von vier Disulfidbrücken in Lysozym aus dem Hühnereiweiß zu einer ausgeprägten Herabsetzung der Enzymstabilität bezüglich des pH-Wertes und der Temperatur (Radford *et al.* 1991). Ein ähnlicher Effekt wurde auch für TEM-1  $\beta$ -Lactamase beobachtet

(Vanhove *et al.* 1997). Gleichzeitig sind keine Beispiele bekannt, in denen die Thermostabilität durch die Entfernung von Cystinbrücken angehoben werden konnte.

Wie aus Tabelle 4.8 ersichtlich, besteht innerhalb der Familie 13 Glucosidasen keine Tendenz zu mehr Disulfidbrücken in thermophilen und hyperthermophilen Enzymen gegenüber ihren psychrophilen und mesophilen Homologen. Während letztere vier bzw. fünf Cystinbrücken ausbilden, beinhalten die an hohe Temperaturen angepassten Amylasen sowie BCOG keine Disulfidbindungen.

**Tab. 4.8:** Anzahl einzelner Cysteine sowie Cystinbrücken in Familie 13 Glucosidasen.

pdb Code	Organismus	Anzahl Reste	Anzahl Cysteine	Anzahl Cystinbrücken
1aqh	<i>A. haloplanctis</i>	448	8	4
1dhk	<i>S. scrofa</i>	496	12	5
1bag	<i>B. subtilis</i>	425	1	0
1bli	<i>B. licheniformis</i>	483	0	0
(AmyA)	<i>T. maritima</i>	505	1	0
1uok	<i>B. cereus</i> Oligo-1,6-Glucosidase	558	3	0

Die Beobachtung, dass spezifische Disulfidbrücken die Thermostabilität einzelner Proteine teilweise deutlich erhöhen können, lässt sich also nicht in der Form auf diese Familie homologer Proteine übertragen, dass in ihren thermostabilen Vertretern mehr Cystinbrücken zu beobachten wären als in mesophilen Verwandten. Nichtsdestotrotz ist es durchaus möglich, dass die in den Amylasen von *Alteromonas haloplanctis* sowie dem Schwein ausgebildeten Disulfidbrücken zu einer Stabilisierung der räumlichen Struktur beitragen, bzw. die Faltung des Proteins unterstützen. Ein Beitrag zur Thermostabilität der AmyA'' durch Disulfidbrücken kann jedoch ausgeschlossen werden.

#### 4.3.5 Anteil und Verteilung hydrophober, polarer und geladener Seitenketten

Es ist seit langem bekannt, dass eine hydrophobe Kernregion ein für die Faltung und Stabilität globulärer Proteine in einer wässrigen Umgebung wichtiges Strukturmotiv darstellt (Branden & Tooze 1991). Andererseits sind Kontakte zwischen hydrophoben Clustern auf der Oberfläche eines Proteins und dem umgebenden Wasser thermodynamisch ungünstig. Der Einfluss der Oberflächenhydrophobizität wurde beispielsweise von Melik-Nubarov *et al.*

untersucht, die hydrophile Fragmente kovalent an die Oberfläche von  $\alpha$ -Chymotrypsin addierten und feststellten, dass sich die Enzymstabilität dadurch, abhängig von dem Grad der Hydrophilisierung, um einen Faktor von bis zu 1000 steigern ließ (Melik-Nubarov *et al.* 1990). Da der generelle Aufbau und die Faltung des Proteins, intramolekulare Wasserstoff- und Salzbrücken sowie die Anzahl möglicher Disulfidbindungen unverändert blieben, interpretierten sie diese Ergebnisse als eindeutige Hinweise auf eine Thermostabilisierung durch eine erhöhte Hydrophilie der Proteinoberfläche. Chakravarty und Vardarajan haben bei der systematischen Untersuchung vollständiger Genome einen im Mittel erhöhten Anteil geladener Reste (Asp, Glu, Lys, Arg und His) bei gleichzeitiger Abnahme ungeladener, polarer Reste (Ser, Thr, Gln, Asn und Cys) in Proteinen hyperthermophiler Organismen festgestellt (Chakravarty & Varadarajan 2000). Ähnliche Zusammenhänge wurden auch von Cambillau und Claverie gefunden, wobei diese aber Histidin nicht zu den geladenen Seitenketten rechneten (Cambillau & Claverie 2000). Während Chakravarty und Vardarajan lediglich den Anteil der jeweiligen Klassen von Aminosäuren untersuchten, erweiterten Cambillau und Claverie diese Analyse, indem sie die für Wasser zugängliche Oberfläche der bekannten Strukturen betrachteten. Auch hier fand sich in (hyper-) thermophilen Proteinen ein erhöhter Anteil an geladenen Seitenketten, der mit einer Abnahme polarer, ungeladener Aminosäuren einhergeht und die in den Genomsequenzen gefundenen Tendenzen noch übersteigt. Ein detaillierterer Vergleich von Lumazin Synthasen aus dem hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* mit homologen mesophilen Proteinen ergab, dass die mit geladenen Seitenketten besetzte *water accessible surface area* des thermophilen Proteins weitaus größer ist als die der mesophilen Enzyme. Gleichzeitig ist die mit hydrophoben bzw. polar ungeladenen Aminosäuren besetzte Oberfläche entsprechend kleiner (Zhang, X. *et al.* 2001). Die daraus abgeleitete Hydrophilie der Proteinoberfläche machen die Autoren gemeinsam mit der großen Anzahl ionischer Atompaaire auf der Oberfläche für den mit 119,9°C extrem hohen Schmelzpunkt dieser Lumazin-Synthase verantwortlich.

Innerhalb der fünf verglichenen Amylasen können die folgenden Tendenzen beobachtet werden: Der prozentuale Anteil geladener Aminosäuren ist in den Peptidsequenzen der thermophilen Enzyme signifikant höher als in den beiden mesophilen bzw. psychrophilen Amylasen (siehe Tab. 4.9). Etwa in gleichem Maße dieser Zunahme reduziert sich der Anteil ungeladener aber polarer Aminosäuren, während sich für hydrophobe Seitenketten kein Zusammenhang mit der Thermostabilität erkennen lässt.

**Tab. 4.9:** Anteil geladener, polarer ungeladener und hydrophober Aminosäuren in Familie 13 Glucosidasen. Werte in Klammern sind Prozentangaben bezogen auf die Anzahl der Aminosäuren in dem jeweiligen Protein.

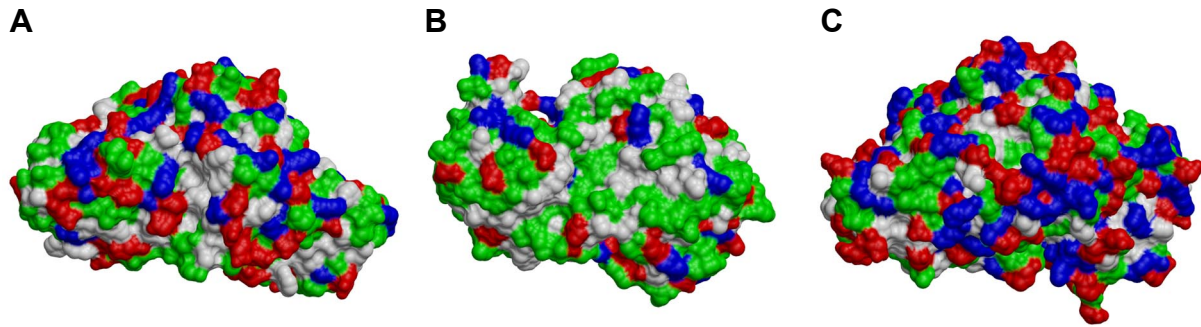
pdb Code	Organismus	Anzahl Reste	Asn, Gln, Ala, Val,		
			Asp, Glu, Lys, Arg, His	Ser, Thr, Tyr, Cys, Gly	Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp
1aqh	<i>A. haloplanctis</i>	448	85 (19.0)	195 (43.5)	168 (37.5)
1dhk	<i>S. scrofa</i>	496	109 (22.0)	191 (38.5)	195 (39.3)
1bag	<i>B. subtilis</i>	425	92 (21.6)	179 (42.1)	154 (36.2)
1bli	<i>B. licheniformis</i>	483	134 (27.7)	172 (35.6)	175 (36.2)
(AmyA)	<i>T. maritima</i>	505	142 (28.1)	161 (31.8)	202 (40.0)
1uok	<i>B. cereus</i> Oligo-1,6-Glucosidase	558	177 (31.7)	177 (31.7)	204 (36.6)

Diese Tendenzen gelten generell auch hinsichtlich der Verhältnisse von geladenen, polar ungeladenen und hydrophoben Bereichen auf der Proteinoberfläche, die konkreten prozentualen Werte unterscheiden sich jedoch erheblich (vergl. Tab. 4.10). Während der prozentual geladene Bereich der Proteinoberfläche immer größer ist als der relative Anteil geladener Aminosäuren in der Peptidsequenz, so gilt für die hydrophoben Seitenketten der umgekehrte Zusammenhang. Diese Beobachtung unterstreicht das Vorhandensein eines hydrophoben Proteinkerns und einer vergleichsweise hydrophilen Peripherie. Polar ungeladene Seitenketten kommen auf der Oberfläche der betrachteten Glucosidasen etwa entsprechend ihrer Häufigkeit in der Peptidsequenz vor. Die Verteilung der Aminosäureklassen auf der Oberfläche ist für die Enzyme aus *Thermotoga maritima*, *Alteromonas haloplanctis* und *Bacillus cereus* in Abbildung 4.22 dargestellt.

**Tab. 4.10:** Anteil geladener, polar ungeladener und hydrophober Aminosäuren auf der Oberfläche der untersuchten Familie 13 Glucosidasen. Die Einteilung der Aminosäuren entspricht Tab. 4.9; Werte in Klammern geben den prozentualen Anteil in Bezug auf die Kettenlänge des Proteins an.

pdb Code	Organismus	geladene polare hydrophobe			
		Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]
1aqh	<i>A. haloplanctis</i>	16086.4	3919.1 (24.4)	8382.6 (52.1)	3783.5 (23.5)
1dhk	<i>S. scrofa</i>	17758.7	5506.0 (31.0)	7417.3 (41.8)	4831.8 (27.2)
1bag	<i>B. subtilis</i>	15300.9	5824.1 (38.1)	6882.2 (45.0)	2594.6 (16.9)
1bli	<i>B. licheniformis</i>	17264.5	7180.3 (41.6)	6191.9 (35.8)	3889.8 (22.5)
(AmyA)	<i>T. maritima</i>	18701.3	7964.3 (42.6)	6421.9 (34.3)	4289.6 (22.9)
1uok	<i>B. cereus</i> Oligo-1,6-Glucosidase	21680.0	12334.8 (56.9)	5604.1 (25.8)	3742.1 (17.3)





**Abb. 4.22:** Verteilung der verschiedenen Klassen der Aminosäuren auf der Proteinoberfläche dreier Glucosidasen; rot: Asp, Glu; blau: Arg, Lys, His; grün: Asn, Gln, Thr, Ser, Cys, Tyr, Gly; weiß: Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp. Die Orientierung der Moleküle ist so gewählt, dass man auf die N-terminale Seite des TIM-Barrels blickt. **A:** *T. maritima*  $\alpha$ -Amylase A'', **B:** *A. haloplanctis*  $\alpha$ -Amylase, **C:** *B. cereus* Oligo-1,6-Glucosidase.

Betrachtet man die Anteile geladener Seitenketten an der Peptidsequenz und der Oberfläche der Proteine, so fällt auf, dass die Differenz dieser Werte bei den psychrophilen bzw. mesophilen Amylasen aus *Alteromonas haloplanctis* und *Sus scrofa* mit 5.4 bzw. 9.0 Prozentpunkten relativ gering ist, bei den thermophilen Vertretern aber mit mindestens 13.5 Prozentpunkten deutlich darüber liegt. Es besteht also in den thermostabilen Enzymen nicht nur eine Tendenz zu einem größeren Anteil geladener Aminosäuren in der Sequenz, sondern darüber hinaus noch zu einer Verlagerung dieser Aminosäuren in die Peripherie der Proteine. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Cambillau und Claverie, die dieses Prinzip aus der Analyse von insgesamt 30 Genomsequenzen und der für Wasser zugänglichen Oberfläche von 189 Proteinstrukturen ableiteten (Cambillau & Claverie 2000). Da diese Datenmenge eine erheblich größere Stichprobe darstellt als die hier betrachteten fünf Amylasen, die Ergebnisse jedoch gut übereinstimmen, erscheint es gerechtfertigt, einen großen Teil der Thermostabilität der *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase A sowie der homologen Enzyme aus *Bacillus subtilis* bzw. *Bacillus licheniformis* der erhöhten Hydrophilie und insbesondere der Partialladung der Proteinoberfläche zuzuschreiben.

Als problematisch erweist sich auch in diesem Vergleich die Einordnung der Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus cereus*. Auf der Grundlage des beschriebenen Zusammenhanges deuten sämtliche Werte darauf hin, dass dieses Enzym alle fünf untersuchten Amylasen bezüglich der Thermostabilität übertreffen müsste. Wie zuvor beschrieben, lässt es sich aber mit einer Schmelztemperatur von nur 44.5°C eindeutig als mesophil charakterisieren.

#### 4.3.6 Prolin-Substitutionen

Da der Pyrrolidin-Ring der Aminosäure Prolin der Rotation um die N-C $\alpha$ -Bindung der Hauptkette starke *Constraints* aufzwingt, sind die entsprechenden  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel eng auf bestimmte Werte beschränkt, was sich in einer herabgesetzten Flexibilität der Polypeptid-Kette widerspiegelt. Diese Restriktion führt zu einer Bevorzugung von Prolin-Resten in der zweiten Position von  $\beta$ -turns (Argos & Palau 1982, Chou & Fasman 1978) sowie dem N-terminalen Ende von  $\alpha$ -Helices (Richardson & Richardson 1988). Für die *Bacillus cereus* Oligo-1,6-Glucosidase konnte gezeigt werden, dass die kumulative Substitution von insgesamt neun Aminosäuren (vor allem Glutamat) gegen Prolin in den oben genannten Positionen sowie in einigen *loops* eine Erhöhung der Schmelztemperatur  $T_{\text{melt}}$  von 44.5 auf 49.6°C zur Folge hat (Watanabe *et al.* 1994). Die exakten Daten sind in Tabelle 4.11 aufgeführt. Dies wurde als „unwiderlegbarer Beweis“ der bereits zuvor aufgestellten *proline rule* (Suzuki *et al.* 1987) gewertet, nach der die Häufigkeit von Prolin-Resten in  $\beta$ -turns mit der Thermostabilität eines Enzyms korreliert werden kann.

In der 505 Aminosäuren umfassenden Sequenz von *T. maritima*  $\alpha$ -Amylase A kommen 18 Prolin-Reste vor, von denen sieben in der Position zwei von  $\beta$ -turns und zwei an den N-terminalen Enden einer  $\alpha$ -Helix liegen. In der nativen, nicht substituierten Struktur der *Bacillus cereus* Oligo-1,6-Glucosidase sind lediglich zwei der insgesamt 13 Prolin-Reste in  $\beta$ -turns und nur einer am N-terminus einer  $\alpha$ -Helix lokalisiert. Unterschiede in der Verteilung dieser Aminosäure in den beiden Strukturen bestehen also in erster Linie in der erhöhten Anzahl von Prolin-Resten in  $\beta$ -turns der AmyA, die sich nach der oben beschriebenen *proline rule* besonders stark auf die Thermostabilität auswirken sollten. Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass an den Positionen der zwei Prolin-substitutionen, die in BCOG den größten Beitrag zu einer gesteigerten Thermostabilität liefern (Asn109  $\rightarrow$  Pro, Lys121  $\rightarrow$  Pro,  $\Delta T_{\text{melt}}$  jeweils  $> 1^\circ\text{C}$ ), in der Struktur der nativen AmyA tatsächlich die Aminosäure Prolin eingebaut ist (Pro104, Pro117). Prolin104 bildet dabei das n-terminale Ende einer Helix, Prolin117 sitzt an Position zwei eines  $\beta$ -turns. Für fünf der restlichen sieben Positionen, an denen in BCOG Prolin eingebaut wurde, existiert in AmyA keine äquivalente Aminosäure, da es sich in der jeweiligen Region um zusätzliche *loop*-Bereiche oder generell verschiedene Struktur motive handelt. Die verbleibenden zwei Positionen sind in AmyA und BCOG mit Threonin und Glutamat identisch besetzt.

**Tab. 4.11:** Zusammenhang der Prolinsubstitutionen in BCOG und der resultierenden Änderung der Schmelztemperatur  $T_{\text{melt}}$ , sowie äquivalente Aminosäuren in der Sequenz der AmyA''.

Position	subst. AS in BCOG	Mutante Nr.	$T_{\text{melt}}$ [°C]	$\Delta T_{\text{melt}}$ [°C]	äquiv. AS in AmyA''
$\beta$ -turns	Lys121	1	45.9	1.4	Pro117
	Glu208	4	47.9	0.8	-
	Glu290	3	47.1	0.8	-
$\alpha$ -Helix	Asn109	9	49.6	1.4	Pro104
	Glu175	2	46.3	0.4	Glu164
	Thr261	7	48.1	0.5	Thr234
loops	Glu216	8	48.2	0.1	-
	Glu270	5	47.6	-0.3	-
	Glu378	6	47.6	0	-

Die vorangegangenen Beobachtungen lassen einen Beitrag zur Thermostabilisierung durch den Einbau von Prolin an bestimmten Positionen in der Struktur der AmyA als durchaus möglich erscheinen. Für zwei der insgesamt 18 Prolin-Reste existieren deutliche, wenn auch nur indirekte Hinweise, dass sie tatsächlich positiv Einfluss auf die Schmelztemperatur der  $\alpha$ -Amylase A aus *Thermotoga maritima* nehmen. Bedenkt man aber, dass der Austausch von neun Aminosäuren gegen Prolin in BCOG zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur um gerade einmal 5°C geführt hat, so ist der Anteil der zusätzlichen Proline an der Thermostabilität der AmyA als eher gering einzustufen und kann nicht die großen Differenzen zwischen diesen beiden Proteinen erklären. Für eine genauere Untersuchung der Wirkung von Prolin-Substitutionen auf die Stabilität der AmyA wären aber konkrete Untersuchungen an diesem Protein notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde die dreidimensionale Struktur der  $\alpha$ -Amylase A aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* MSB8 mit Hilfe der Röntgenbeugung am Einkristall aufgeklärt.

### Kristallisation und Datensammlung

Die Kristallisation eines zu Beginn der Arbeit bereits vorliegenden, 535 Aminosäuren umfassenden Konstruktes des Proteins, das am Aminoterminal einen etwa 30 Reste langen Membrananker aufweist, ergab zunächst keine für die Röntgenbeugung geeigneten Einkristalle. Mit Hilfe eines Sequenzvergleiches konnte jedoch abgeschätzt werden, dass das zentrale TIM-Barrel des Enzyms wahrscheinlich mit Valin in Position 36 der Sequenz der AmyA beginnt. Nach Entfernung des Membranankers auf DNA-Ebene und erneuter Expression und Reinigung wurden schließlich nach der Gasdiffusionsmethode Kristalle in der Raumgruppe  $P2_12_12$  erhalten, die mit Hilfe von *streak* und *macro seeding* zu einer Größe von bis zu  $300 \times 300 \times 100 \mu\text{m}$  entwickelt werden konnten. Durch Behandlung der Kristalle mit dem Kryoprotektanden PEG 4000 wird die Einheitszelle unter Verdopplung des Inhaltes der asymmetrischen Einheit in die monokline Raumgruppe  $P2_1$  transformiert. Gleichzeitig nimmt die Streukraft der Kristalle deutlich zu, so dass bei Tieftemperatur Daten der unkomplexierten AmyA'' sowie eines Komplexes mit dem eindiffundierten Inhibitor Acarbose bis zu einer Auflösung von 1.75 bzw. 1.9 Å gesammelt werden konnten.

### Strukturlösung

Der Versuch, die Struktur der AmyA'' mit der Methode des molekularen Ersatzes zu lösen, führte nicht zum Erfolg, obwohl mit der Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus cereus* ein in der Sequenz und, wie sich später herausstellen sollte, auch der räumlichen Struktur sehr ähnliches Enzym existiert, aus dem verschiedene Suchfragmente generiert wurden. Eine erste Elektronendichte konnte schließlich nach Lokalisation von sechs Quecksilberpositionen in der Raumgruppe  $P2_12_12$  bis zu einer Auflösung von 3.2 Å berechnet werden. Unter Ausnutzung nicht-kristallographischer Symmetrie ließ sich diese Dichte soweit verbessern, dass ein erstes, einfaches poly-Alaninmodell generiert werden konnte. Dieses Strukturmodell konnte dann in einer sechsdimensionalen Suche korrekt in der monoklinen Zelle positioniert werden und bildete die Ausgangsbasis für eine NCS-unterstützte Phasenerweiterung bis zur vollen

Auflösung von 1.75 Å. Die erhaltene Dichte ließ bereits viele Details der Proteinstruktur erkennen, so dass die Generierung eines Modells automatisch durchgeführt konnte. Die erhaltene Struktur konnte schließlich bis zu einem kristallographischen R-Wert von 15.6%, der später gelöste Inhibitor-Komplex bis zu 19.1% verfeinert werden.

### Strukturbeschreibung

Die  $\alpha$ -Amylase A aus *Thermotoga maritima* zeigt die für Amylasen der Familie 13 typische Domänenstruktur mit einem zentralen  $(\beta/\alpha)_8$ -*Barrel*, einer nach dem dritten Strang des *Barrels* eingefügten  $\beta$ -Domäne sowie einem C-terminalen  $\beta$ -Faltblatt. Anhand des zuvor durchgeführten Sequenzvergleiches konnten die Aminosäuren Asp188, Glu228 und Asp280 als das katalytische Zentrum des Enzyms identifiziert werden, das in einer tiefen Furche zwischen den Domänen A und B lokalisiert ist. Diese Zuordnung wurde durch den später untersuchten Enzym-Inhibitor-Komplex bestätigt und ist mit dem postulierten Mechanismus der Amylasen, nach dem unter Beibehaltung der  $\alpha$ -anomeren Konfiguration des C1-Atoms das Substrat hydrolytisch gespalten wird, konsistent.

Anhand der Elektronendichte konnten vier bis fünf Calciumionen je Monomer identifiziert werden, von denen eines ( $\text{Ca}2$ ) innerhalb der Familie 13 Amylasen konserviert und für die katalytische Aktivität des Enzyms zwingend erforderlich ist. Eine eingehendere Betrachtung zeigt, dass über dieses Metallion die Domäne B an dem zentralen TIM-*Barrel* fixiert wird, so dass anzunehmen ist, dass dieses Calciumion in erster Linie strukturgebende Funktionen erfüllt. Letzteres gilt wahrscheinlich auch für die anderen drei, in allen Monomeren beobachteten, jedoch nicht konservierten Calciumionen.

In der Komplexstruktur mit dem Pseudotetrasaccharid Acarbose konnten in drei von vier unabhängigen Amylase-Monomeren lediglich drei der vier Glucosideinheiten des Inhibitors in der Elektronendichte beobachtet werden. Es ist wahrscheinlich, dass durch eine um zwei Positionen in Richtung des nicht-reduzierenden Endes der Acarbose versetzte Bindung zunächst der Glucose-Ring D am reduzierenden Ende des Moleküls abgespalten wurde, bevor die Acarbose dann in der erwarteten und letztlich vorgefundenen Orientierung an die AmyA koordiniert wurde. Dies deutet eine gegenüber dem physiologischen Substrat Amylose nur wenig erhöhte Bindungsaffinität der Acarbose an das katalytische Zentrum der AmyA an, die aber noch durch kinetische Experimente zu bestätigen wäre.

### Thermostabilität der AmyA

Anhand vergleichender Untersuchungen an einer Reihe psychrophiler, mesophiler und hyperthermophiler Glucosidasestrukturen konnten Rückschlüsse auf die ausgeprägte Thermostabilität der  $\alpha$ -Amylase A aus *Thermotoga maritima* gezogen werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die dreidimensionale Struktur der AmyA nicht durch ein einzelnes, spezifisches Merkmal des Enzyms stabilisiert wird, sondern dass sich die Thermostabilität additiv aus einer Vielzahl kleinerer Beiträge zusammensetzt.

Als besonders konsistent mit zuvor durchgeführten, breiter angelegten Untersuchungen hat sich die Häufigkeit und Verteilung hydrophober, polar ungeladener und geladener Aminosäuren in der Sequenz sowie auf der für Wasser zugänglichen Oberfläche des Proteins herausgestellt. So nimmt der Anteil geladener Aminosäuren in der Sequenz und an der molekularen Oberfläche der jeweiligen Amylase von *Alteromonas haloplanctis* zu *Thermotoga maritima* etwa in dem Maße zu, wie der Anteil polarer, jedoch ungeladener Aminosäuren abnimmt. Daraus ergibt sich für die thermophilen Enzyme eine zunehmend hydrophile Proteinoberfläche, die aufgrund energetisch günstiger Wechselwirkungen mit dem umgebenden Lösungsmittel zu einer Stabilisierung der räumlichen Struktur dieser Enzyme führt.

Schlüssig erscheint auch die Beobachtung, dass die Anzahl intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen mit der Thermostabilität zunimmt. Dies gilt sowohl für die Gesamtheit der Wasserstoffbrückenbindungen als auch für entsprechende Wechselwirkungen zwischen geladenen und ungeladenen Atomen. Zuvor gemachte Annahmen, dass in thermophilen Enzymen eine Zunahme von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Seitenkettenatomen zu beobachten ist, scheinen jedoch für AmyA nicht zuzutreffen. Der entsprechende Wert liegt noch unter dem der psychrophilen Amylase aus *Alteromonas haloplanctis*. Dennoch erscheint die Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur der AmyA durch ein gut ausgebildetes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen plausibel.

Ein detaillierterer Vergleich der Struktur der Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus cereus* mit AmyA legt die Vermutung nahe, dass Prolin-Reste in definierten Positionen einen positiven Einfluss auf die Schmelztemperatur des Enzyms ausüben könnten. Diese Hypothese ließe sich, wie für die genannte Glucosidase geschehen, durch Mutation einzelner Aminosäuren bestätigen bzw. widerlegen.

Ein nicht eindeutiges Ergebnis liefert die Betrachtung des Einflusses von Calcium auf die Stabilität der AmyA. Einerseits benötigt das Enzym zur Katalyse zwingend Calciumionen, andererseits kann es durch Zusatz von nur 10 mM  $\text{CaCl}_2$  innerhalb kurzer Zeit vollständig inaktiviert werden. Für die vier in allen Monomeren vorhandenen Calciumionen werden in erster Linie strukturgebende Funktionen postuliert, so dass sich hier ein direkter Zusammenhang zwischen der Entfaltung der Tertiärstruktur und dem Entzug des Calciums herstellen lässt. Da der mit der Entfernung des Calciums verbundene Aktivitätsverlust mit steigender Temperatur zunimmt, ist anzunehmen, dass die in der Struktur gefundenen Calciumionen eine nicht unerhebliche Rolle in der thermischen Stabilisierung des Enzyms spielen. Der Effekt der Inaktivierung der AmyA bei Gabe zusätzlichen Calciums konnte bis heute jedoch nicht geklärt werden.

Als nicht konsistent bei der Betrachtung der Thermostabilität hat sich in mehreren Punkten die Oligo-1,6-Glucosidase aus *Bacillus cereus* erwiesen. Obwohl das Enzym ein ausgeprägtes Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk ausbildet und bezüglich der Hydrophilie und Ladung seiner für Wasser zugänglichen Oberfläche Werte aufweist, die im Bereich der thermostabilen Enzyme aus *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* oder *Thermotoga maritima* liegen bzw. diese übertreffen, liegt seine Entfaltungstemperatur  $T_{\text{melt}}$  mit lediglich 44.5°C nur knapp ein Grad über der der Amylase aus dem psychophilen Bakterium *Alteromonas haloplanctis*.

Diese Glucosidase ist insofern ein gutes Beispiel dafür, dass Vergleiche der Strukturen homologer Proteine mit unterschiedlichen Temperaturoptima immer nur Hinweise auf die Ursachen der Thermostabilität liefern können, den Beweis für die Richtigkeit der aufgestellten Hypothesen aber schuldig bleiben. Nichtsdestotrotz konnten für AmyA einige Zusammenhänge aufgezeigt werden, die konsistent mit früheren Ergebnissen aus größeren Stichproben sind. Einige der aufgestellten Hypothesen ließen sich zudem in weiterführenden Experimenten gezielt untersuchen.

## 6 Literatur

**Abrahams J.P. & Leslie A.G.W.** (1996) Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Cryst.*, **D52**, 30-42.

**Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. & Haser, R.** (1998) Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci.*, **7:3**, 564-72.

**Ahern, T.J. & Klibanov, A.M.** (1985) The mechanisms of irreversible enzyme inactivation at 100C. *Science*, **228:4705**, 1280-4.

**Ahern, T.J. & Klibanov, A.M.** (1988) Analysis of processes causing thermal inactivation of enzymes. *Methods Biochem. Anal.*, **33**, 91-127.

**Ahern, T.J., Casal, J.I., Petsko, G.A. & Klibanov, A.M.** (1987) Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84:3**, 675-9.

**Alkazaz, M., Desseaux, V., Marchis-Mouren, G., Payan, F., Forest, E. & Santimone, M.** (1996) The mechanism of porcine pancreatic alpha-amylase. Kinetic evidence for two additional carbohydrate-binding sites. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 787-96.

**Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.

**Argos, P. & Palau, J.** (1982) Amino acid distribution in protein secondary structures. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **19:4**, 380-93.

**Armbrecht, M.** (2001): Mündliche Mitteilung.

**Bashford, D.** (1997) An object-oriented programming suite for electrostatic effects in biological molecules. *in*: Yutaka Ishikawa, Rodney-R. Oldehoeft, John V.-W. Reynders, and Marydell Tholburn, editors, Scientific Computing in Object-Oriented Parallel Environments, volume 1343 of Lecture Notes in Computer Science, pages 233-240, Berlin. ISCOPE97, Springer.

**Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E.** (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242.

**Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z., Dodson, G.G., Jensen, V.J., Petersen, S.B., Swift, H., Thim, L. & Woldike, H.F.** (1990) Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*, **29**, 6244-9.

**Branden, C., & Tooze, J.** (1991) Introduction to Protein Structure. Garland Publishing, New York / London.



- Brayer, G.D., Luo, Y. & Withers, S.G.** (1995) The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.*, **4**:9, 1730-42.
- Britton, K.L., Yip, K.S., Sedelnikova, S.E., Stillman, T.J., Adams, M.W., Ma, K., Maeder, D.L., Robb, F.T., Tolliday, N., Vetriani, C., Rice, D.W. & Baker, P.J.** (1999) Structure determination of the glutamate dehydrogenase from the hyperthermophile *Thermococcus litoralis* and its comparison with that from *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.*, **293**:5, 1121-32.
- Brünger, A.T.** (1992) The Free R Value: A Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures, *Nature*, **355**, 472-474.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L.** (1998) Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst.*, **D54**, 905-921.
- Brzozowski, A.M. & Davies, G.J.** (1997) Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose, at 2 Å resolution. *Biochemistry*, **36**, 10837-10845.
- Burmeister, W.P.** (2000) Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage. *Acta Cryst.*, **D56**, 328-41.
- Cambillau, C. & Claverie, J.M.** (2000) Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *J. Biol. Chem.*, **275**:42, 32383-6.
- Chakravarty, S. & Varadarajan, R.** (2000) Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Lett.*, **470**:1, 65-9.
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D.** (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **47**, 45-148.
- Collaborative Computational Project, Number 4** (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.*, **D50**, 760-763.
- Coutinho, P.M. & Henrissat, B.** (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. *in*: "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", Gilbert H.J., Davies, G., Henrissat, B. and Svensson, B. eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 3-12.
- Cowtan K.** (1994) 'dm': An automated procedure for phase improvement by density modification. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, **31**, 34-38.
- Crowther, R.A.** (1972) The Fast Rotation Function. Pages 173-178 of: Rossmann, M. G. (ed), The Molecular Replacement Method. *Int. Sci. Rev. Ser.*, no. 13. New York: Gordon and Breach.
- Crowther, R.A. & Blow, D.M.** (1967) A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure. *Acta Cryst.*, **23**, 544-548.

- Cruickshank, D.W.J.** (1999) Remarks about protein structure precision. *Acta Cryst.*, **D55**, 583-601.
- Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Christensen, S., Borchert, T.V., Beier, L., Wilson, K.S. & Davies, G.J.** (1999) X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Biochemistry.*, **38(26)**, 8385-92.
- Davies, G.J. & Henrissat, B.** (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, **3:9**, 853-859.
- Davies, G.J., Wilson, K.S. & Henrissat, B.** (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, **321** ( Pt 2), 557-9.
- Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R. & Gaillardin, C.** (2000) Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* , **301:4**, 1041-57.
- DINO: Visualizing Structural Biology** (2001) <http://www.dino3d.org>.
- Dodson, E., Harding, M.M., Hodgkin, D.C. & Rossmann, M.G.** (1966) The crystal structure of insulin. 3. Evidence for a 2-fold axis in rhombohedral zinc insulin. *J. Mol. Biol.*, **16:1**, 227-41.
- Drenth, J.** (1994) Principles of Protein X-Ray Crystallography, Springer-Verlag.
- Driessen, H.P.C., Bax, B., Slingsby, C., Lindley, P.F., Mahadevan, D., Moss, D.S. & Tickle, I.J.** (1991) Structure of oligomeric beta B2-crystallin: an application of the T2 translation function to an asymmetric unit containing two dimers. *Acta Cryst.*, **B47**, 987-997.
- Esnouf, R.M.** (1997) An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *Journal of Molecular Graphics*, **15**, 132-134.
- Esnouf, R.M., Ren, J., Garman, E.F., Somers, D.O., Ross, C.K., Jones, E.Y., Stammers, D.K., & Stuart, D.I.** (1998) Continuous and Discontinuous Changes in the Unit Cell of HIV-1 Reverse Transcriptase Crystals on Dehydration. *Acta Cryst.*, **D54**, 938-953.
- Feller, G., Payan, F., Theys, F., Qian, M., Haser, R. & Gerday, C.** (1994) Stability and structural analysis of alpha-amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *Eur. J. Biochem.*, **222**, 441-7.
- Fütterer, O.** (2001) Vergleichende Untersuchung von drei Amylasen des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* MSB8, Dissertation, Göttingen.
- Fütterer, O.** (2002): Mündliche Mitteilung.
- Garman, E.F. & Schneider, T.R.** (1997) Macromolecular cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.*, **30**, 211-237.
- Gilles, C., Astier, J.P., Marchis-Mouren, G., Cambillau, C. & Payan, F.** (1996) Crystal structure of pig pancreatic alpha-amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose. *Eur. J. Biochem.*, **238(2)**, 561- 9

- Hampel, A., Labanauskas, M., Connors, P.G., Kirkegard, L., RajBhandary, U.L., Sigler, P.B. & Bock, R.M.** (1968) Single crystals of transfer RNA from formylmethionine and phenylalanine transfer RNA's. *Science*, **162:860**, 1384-7.
- Harker, D.** (1956) The determination of the phases of the structure factors of noncentrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta. Cryst.*, **9**, 1-9.
- Hendsch, Z.S. & Tidor, B.** (1994) Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis. *Protein Science*, **3:2**, 211-226.
- Hennig, M., Sterner, R., Kirschner, K. & Jansonius, J.N.** (1997) Crystal structure at 2.0 Å resolution of phosphoribosyl anthranilate isomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: possible determinants of protein stability. *Biochemistry*, **36:20**, 6009-16.
- Henrissat, B.** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-316.
- Henrissat, B. & Bairoch, A.** (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695-696.
- Holm, L. & Sander, C.** (1993) Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices. *J. Mol. Biol.*, **233**, 123-138.
- Hoof, R.W.W., Sander, C. & Vriend, G.** (1996) Positioning hydrogen atoms by optimizing hydrogen-bond networks in protein structures. *Proteins*, **26**, 363- 376.
- Howlin, B., Butler, S.A., Moss, D.S., Harris, G.W. & Driessen, H.P.C.** (1993) TLSANL: TLS parameter analysis program for segmented anisotropic refinement of macromolecular structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 622-624 .
- Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, U.B. & Stetter, K.O.** (1986) *Thermotoga maritima* sp.nov. represents a new genus of uniquely extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch. Microbiol.*, **144**, 324-333.
- Igarashi, K., Hatada, Y., Ikawa, K., Araki, H., Ozawa, T., Kobayashi, T., Ozaki, K. & Ito, S.** (1998) Improved thermostability of a Bacillus alpha-amylase by deletion of an arginine- glycine residue is caused by enhanced calcium binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248:2**, 372-7.
- Ishikawa, K., Matsui, I., Honda, K. & Nakatani, H.** (1992) Multi-functional roles of a histidine residue in human pancreatic alpha-amylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183:1**, 286-91.
- Janecek, S.** (1993) Does the increased hydrophobicity of the interior and hydrophilicity of the exterior of an enzyme structure reflect its increased thermostability? *Int. J. Biol. Macromol.*, **15:5**, 317-8.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M.** (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.*, **A47**, 110-119.

- Josse, R.G.** (1995) Acarbose for the treatment of type II diabetes: the results of a Canadian multi- centre trial. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, Suppl:S167-72.
- Kabsch, W.** (1976) A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Cryst.*, **A32**, 922-923 .
- Kabsch, W. & Sander, C.** (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.
- Kadziola, A., Sogaard, M., Svensson, B. & Haser, R.** (1998) Molecular structure of a barley alpha-amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J. Mol. Biol.*, **278:1**, 205-17.
- Kelly, C.A., Nishiyama, M., Ohnishi, Y., Beppu, T. & Birktoft, J.J.** (1993) Determinants of protein thermostability observed in the 1.9-A crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermus flavus*. *Biochemistry*, **32:15**, 3913-22.
- Kissinger, C.R., Gehlhaar, D.K. & Fogel, D.B.** (1999) Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Cryst.*, **D55**, 484-491.
- Kraulis, P.J.** (1991) Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structure. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 946-950.
- Kumar, S. & Nussinov, R.** (2001) How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell. Mol. Life Sci.*, **58:9**, 1216-33.
- Kumar, S., Tsai, C.J. & Nussinov, R.** (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.*, **13:3**, 179-91.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M.** (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
- Lee, B. & Richards, F.M.** (1971) The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility. *J. Mol. Biol.*, **55**, 379 - 400.
- Lee, S.Y., Kim, S. Sweet, R.M. & Suh, S.W.** (1991) Crystallization and a preliminary X-ray crystallographic study of alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **291**, 255-257.
- Liebl, W., Stemplinger, I. & Ruile, P.** (1997) Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima* alpha-amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium. *J. Bacteriol.* , **179:3**, 941-8.
- Lottspeich, F. & Zorbas H.** (1998); Bioanalytik; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lunin, V.Y.** (1988) Use of the information on electron density distribution in macromolecules. *Acta Cryst.*, **A44**, 144-150.

- Machius, M., Declerck, N., Huber, R. & Wiegand, G.** (1998) Activation of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through a disorder-->order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure*, **6:3**, 281-92.
- Matsumura, M., Signor, G. & Matthews, B.W.** (1989) Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*, **342:6247**, 291-3.
- Matthews, B.W.** (1968) Solvent content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol.*, **33**, 491-7.
- Matthews, B.W.** (2001) Heavy-atom location and phase determination with single-wavelength diffraction data. *in: International Tables for Crystallography (Volume F: Crystallography of Biological macromolecules. Editors: M.G. Rossmann and E. Arnold, 2001. Cordrecht: Kluwer Academic Publishers, The Netherlands).*
- McPherson, A.** (1999) *Crystallization of Biological Macromolecules*, CSHL Press, New York.
- McRee, D.E.** (1993) *Practical Protein Crystallography*, Academic Press, San Diego, CA.
- McRee, D.E.** (1999) XtalView/Xfit - A Versatile Program for Manipulating Atomic Coordinates and Electron Density. *J. Struct. Biol.*, **125**, 156-165.
- Melik-Nubarov, N.S., Shikshnis, V.A., Slepnev, V.I., Shchegolev, A.A. & Mozhaev, V.V.** (1990) Correlation of enzyme thermostability and its surface hydrophobicity (using a modified alpha-chymotrypsin as an example). *Mol. Biol. (Mosk)*, **24:2** 346-57.
- Merritt, E.A. & Bacon, D.J.** (1997) Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.*, **277**, 505-524.
- Molodova, G.A., Ivanov, I.D. & Nikolaev, G.M.** (1965) The role of the calcium ion in the maintenance of conformation and active center of alpha-amylase in *Aspergillus oryzae*. *Izv. Akad. Nau. SSSR Biol.*, **3**, 359-67.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J.** (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst.*, **D53**, 240-255.
- Nielsen, J.E. & Borchert, T.V.** (2000) Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1543:2**, 253-274.
- Nielsen, J.E., Borchert, T.V. & Vriend, G.** (2001) The determinants of alpha-amylase pH-activity profiles. *Protein Eng.*, **14:7**, 505-12.
- Otwinowski, Z. & Minor, W.** (1997) Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, *Methods in Enzymology*, Volume **276: Macromolecular Crystallography**, part A, p. 307-326, 1997, C.W. Carter, Jr. and R.M. Sweet, Eds., Academic Press.
- Perrakis, A., Morris, R.J. & Lamzin, V.S.** (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.*, **6**, 458-463.
- Petsko, G.A.** (2001) Structural basis of thermostability in hyperthermophilic proteins, or "there's more than one way to skin a cat". *Methods Enzymol.*, **334**, 469-78.

**PovRay**, *Persistence of Vision*, <http://www.povray.org>.

**Qian, M., Haser, R. & Payan, F.** (1993) Structure and molecular model refinement of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **231:3**, 785-99.

**Qian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E. & Payan, F.** (1994) The Active Center of Mammalian Alpha-Amylase. Structure of the Complex of a Pancreatic Alpha- Amylase with a Carbohydrate Inhibitor Refined to 2.2-Å Resolution *Biochemistry*, **33**, 6284.

**Querol, E., Perez-Pons, J.A. & Mozo-Villarias, A.** (1996) Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Eng.*, **9:3**, 265-71.

**Radford, S.E., Woolfson, D.N., Martin, S.R., Lowe, G. & Dobson, C.M.** (1991) A three-disulphide derivative of hen lysozyme. Structure, dynamics and stability. *Biochem. J.*, **273(Pt 1)**: 211-7.

**Ramachandran, G.N. & Sassiakharan, V.** (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **28**, 283-437.

**Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G.D. & Levine, M.J.** (1996) Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Cryst.*, **D52**, 435- 446.

**Richardson, J.S. & Richardson, D.C.** (1988) Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science*, **240**, 1648-52.

**Rodriguez, R., Chinae, G., Lopez, N., Pons, T. & Vriend, G.** (1998) Homology modeling, model and software evaluation : three related resources. *CABIOS*, **14**, 523-528.

**Rossmann, M.G. & Blow, D.M.** (1962) The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.*, **15**, 24-31.

**Roujeinikova, A., Raasch, C., Sedelnikova, S., Liebl, W. & Rice, D.W.** (2002) Crystal Structure of *Thermotoga maritima* 4-alpha- Glucanotransferase and its Acarbose Complex: Implications for Substrate Specificity and Catalysis. *J. Mol. Biol.*, **321:1**, 149-62.

**Russell, R.J., Ferguson, J.M., Hough, D.W., Danson, M.J. & Taylor, G.L.** (1997) The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, **36:33**, 9983-94.

**Sanner, M.F., Spohner, J.-C. & Olson, A.J.** (1996) Reduced Surface: an Efficient Way to Compute Molecular Surfaces. *Biopolymers*, **38**, 305-320.

**Savchenko, A., Vieille, C., Kang, S. & Zeikus, J.G.** (2002) *Pyrococcus furiosus* alpha-amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry*, **41**:6193-201.

**Schneider, T.R.** (2002) A genetic algorithm for the identification of conformationally invariant regions in protein molecules. *Acta Cryst.*, **D58**, 195-208.

**Sheinermann, F.B., Norel, R. & Honig, B.** (2000) Electrostatic aspects of protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 153-159.

- Sheldrick, G.M.** (1997) XP: Programm zur interaktiven, graphischen Darstellung von Molekulan, V. 5.10. © Bruker AXS.
- Sheldrick, G.M.** (1997) XPREP: Programm zur Bearbeitung von Beugungsdaten und Untersuchung reziproker Gitter V5.15. © Bruker AXS.
- Sheldrick, G.M.** (2001) Programm zur Analyse und Mittelung von Substrukturlösungen aus SHELXD und Berechnung experimenteller Phasen. *unveröffentlicht*.
- Stetter, K.O.** (1996) Hyperthermophilic Procaryotes. *FEMS Microbiol. Reviews*, 18, 149-158.
- Strokopytov, B., Penninga, D., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkhuizen, L. & Dijkstra, B.W.** (1995) X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry*, **34**:7, 2234-40.
- Stryer, L.** (1994) Biochemie, 2. korr. Nachdruck 1994 der völlig neubearb. Aufl. 1990, Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akad. Verlag.
- Suzuki, Y., Oishi, K., Nakano, H. & Nagayama, T.** (1987) A general principle of increasing protein thermostability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **226**, 456-551.
- Szilagyi, A. & Zavodszky, P.** (2000) Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure Fold. Des.*, **8**:5, 493-504.
- Tanner, J.J., Hecht, R.M. & Krause, K.L.** (1996) Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 2.5 Angstroms Resolution. *Biochemistry*, **35**:8, 2597-609.
- Thompson, M.J. & Eisenberg, D.** (1999) Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J. Mol. Biol.*, **290**:2, 595-604.
- Tomazic, S.J. & Klibanov, A.M.** (1988) Mechanisms of irreversible thermal inactivation of Bacillus alpha-amylases. *J. Biol. Chem.*, **263**:7, 3086-91.
- Tong, L. & Rossmann, M.G.** (1990) The locked rotation function. *Acta Cryst.*, **A46**, 783-92.
- Usón, I. & Sheldrick, G.M.** (1999) Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **9**, 643-648.
- Vagin, A. & Teplyakov, A.** (1997) MOLREP: An automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.*, **30**, 1022-1025.
- Vanhove, M., Guillaume, G., Ledent, P., Richards, J.H., Pain, R.H. & Frère, J.-M.** (1997) Kinetic and thermodynamic consequences of the removal of the Cys-77-Cys-123 disulphide bond for the folding of TEM-1  $\beta$ -lactamase. *Biochem. J.*, **321** ( Pt 2), 413-7.
- Vellieux, F.D.M. & Reed, R.J.** (1997) Noncrystallographic Symmetry Averaging in Phase Refinement and Extension. *in: Methods in Enzymology*, **277**, 53-64, Academic Press.

- Vetriani, C., Maeder, D.L., Tolliday, N., Yip, K.S., Stillman, T.J., Britton, K.L., Rice, D.W., Klump, H.H. & Robb, F.T.** (1998) Protein thermostability above 100°C: a key role for ionic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:21, 12300-5.
- Villeret, V., Clantin, B., Tricot, C., Legrain, C., Roovers, M., Stalon, V., Glansdorff, N. & Van Beeumen, J.** (1998) The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:6, 2801-6.
- Vogt, G., Woell, S. & Argos, P.** (1997) Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J. Mol. Biol.*, **269**:4, 631-43.
- Wallon, G., Kryger, G., Lovett, S.T., Oshima, T., Ringe, D. & Petsko, G.A.** (1997) Crystal structures of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* 3-isopropylmalate dehydrogenase and comparison with their thermophilic counterpart from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.*, **266**:5, 1016-31.
- Wang, B.C.** (1985) Resolution of Phase Ambiguity in Macromolecular Crystallography. *in*: Wyckoff, H., Hirs, C.H.W., & Timasheff, S.N. (eds). (1985) Diffraction Methods for Biological Macromolecules. *Methods in Enzymology*, **115**. Academic Press.
- Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y. & Suzuki, Y.** (1997) The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J. Mol. Biol.*, **269**(1), 142-53.
- Watanabe, K., Masuda, T., Ohashi, H., Mihara, H. & Suzuki, Y.** (1994) Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule. *Eur. J. Biochem.*, **226**:2, 277-83.
- Weiss, M.S. & Hilgenfeld, R.** (1999) Dehydration leads to a phase transition in monoclinic factor XIII crystals. *Acta Cryst.*, **D55**, 1858-62.
- Wiegand, G., Epp, O. & Huber, R.** (1995) The crystal structure of porcine pancreatic alpha-amylase in complex with the microbial inhibitor Tendamistat. *J. Mol. Biol.*, **247**:1, 99-110.
- Winn, M., Isupov, M. & Murshudov, G.N.** (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Cryst.*, **D57**, 122-133.
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L.** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **87**, 4576-4579.
- Yoshioka, Y., Hasegawa, K., Matsuura, Y., Katsube, Y. & Kubota, M.** (1997) Crystal Structures of a Mutant Maltotetraose-forming Exo-amylase Cocrystallized with Maltopentaose. *J. Mol. Biol.*, **271**, 619-628.
- Zhang, K.Y.J., Cowtan, K. & Main, P.** (1997) Combining Constraints for Electron-Density Modification. *in*: *Methods in Enzymology*, **277**, 53-64, Academic Press.



---

**Zhang, K.Y.J., Cowtan, K. & Main, P.** (2001) Phase improvement by iterative density modification. *in: International Tables for Crystallography* (Volume F: Crystallography of Biological macromolecules. Editors: M.G. Rossmann and E. Arnold, 2001. Cordrecht: Kluwer Academic Publishers, The Netherlands).

**Zhang, X., Meining, W., Fischer, M., Bacher, A. & Ladenstein, R.** (2001) X-Ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6 Å resolution: Determination of thermostability revealed from structural comparison. *J. Mol. Biol.*, **306(5)**, 1099-114.

## Publikationen

**Yu, P., Pape, T., Usón, I., Said, M.A., Roesky, H.W., Montero, M.L., Schmidt, H.-G., and Demsar, A.** (1998) Reactions of Organotitanoxane Fluorides with  $AlR_3$  (R = Me, Et,  $CH_2Ph$ ) and  $Me_3SiCl$ : X-ray Crystal Structures of  $[C_5Me_5-Ti((\mu-O)]_4F[(((\mu-F)AlMe_3)_3]$ ,  $[C_5Me_5Ti((\mu-O)]_4F_3[(((\mu-F)Al(CH_2Ph)_3)_3]$ ,  $[C_5Me_5-Ti((\mu-O)Et)_4]$ , and  $(C_5Me_5)Ti_4O_5X_2$  (X = Cl and F), *Inorg. Chem.*, 37, 5117-5124.

**Jaschke, B., Herbst-Irmer, R., Klingebiel, U., Neugebauer, P., and Pape, T.** (1998) 1,3-Bis(silyl)cyclodisilazane: Synthesis and Crystal Structure, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2953-2954.

**Wraage, K., Pape, T., Herbst-Irmer, R., Noltemeyer, M., Schmidt, H.-G., and Roesky, H.W.** (1999) Synthesis of  $(R\text{Sn})_4X_6$  Adamantanes (X = O, S, Se) in Liquid Ammonia and in the two Phase System: Liquid Ammonia / THF, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1290, 869.

**Varkey, S.P., Schormann, M., Pape, T., Roesky, H.W., Noltemeyer, M., Herbst-Irmer, R., Schmidt, H.-G.** (2001) Organotitanoxanes,  $[C_5Me_5TiMe_2]_2(\mu-O)$  and  $[(C_5Me_5)_4Ti_4Me_2](\mu-O)_5$ : Synthesis and Crystal Structures, *Inorg. Chem.*, 40, 2427-2429

**Gellermann, E., Klingebiel, U., Pape, T., Dall'Antonia, F., Schneider, T.R., Schmatz, S.** (2001) Silylhydrazine und dimere N,N'-Dilithium-N,N'-bis(silyl)hydrazide - Synthesen, Reaktionen, Isomerisierungen, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 627, 2581-2588.

**Pape, T., Schneider, T.R., Sheldrick, G.M., Kuhn, P., Laver, W.G., Vasella, A., Vorwerk, S., Vimr, E., and Garman, E.:** The Structures of Wild Type and D62G Mutant *Salmonella typhimurium* Neuraminidase (STNA) with two potent Inhibitors at atomic Resolution, in preparation.

**Pape, T., Fütterer, O., Schneider, T.R., Liebl, W., Sheldrick, G.M.:** The Crystal Structure of a hyperthermophilic  $\alpha$ -Amylase from *Thermotoga maritima*, in preparation.

## Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. George M. Sheldrick für die interessante Aufgabenstellung meines Promotionsthemas, seine in vielen Diskussionen konstruktive Unterstützung meiner Arbeit und die hervorragende Ausbildung im Bereich der Kleinmolekül- und Proteinkristallographie bedanken.

Herrn Dr. Thomas R. Schneider danke ich für die Betreuung und das stete Interesse an meiner Arbeit sowie die damit verbundene Diskussionsbereitschaft bei allen aufgetretenen Fragen und Problemen.

Die Untersuchungen an der  $\alpha$ -Amylase A aus *Thermotoga maritima* wären nicht möglich gewesen ohne die vorausgegangenen Arbeiten von Herrn Prof. Dr. W. Liebl vom Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen. Ihm und ganz besonders Herrn Dr. Ole Fütterer möchte ich für die gute Zusammenarbeit sowie das Überlassen mehrerer Proben unterschiedlicher Konstrukte des Enzyms herzlich danken.

Für die Unterstützung bei den MALDI-ToF Messungen an AmyA danke ich Herrn Dr. Bernhard Schmidt und Frau Nelli Schwabauer aus dem Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen.

Dank gebührt auch Herrn Dr. Ralph Krätzner, ohne dessen unkonventionelle Ideen zur Kristallisation dieses Projekt womöglich nicht zum Erfolg hätte geführt werden können.

Für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit geht mein Dank an Frau Dipl. Chem. Ilka Müller, Frau Dipl. Chem. Verena König, Herrn Dr. Ralph Krätzner sowie Frau Karin Pape.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Sheldrick gilt mein Dank für das gute Arbeitsklima, viel Unterstützung bei allen möglichen Kleinigkeiten und das eine oder andere abendliche Getränk auf dem Balkon. Ganz besonders seien hier Ralph, Ilka und natürlich Verena erwähnt.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht und mich nicht nur finanziell unterstützt haben.



# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name	Thomas Pape
Geburtsdatum	15. November 1970
Geburtsort	Göttingen
Familienstand	ledig

## Schulbildung

08 / 77 - 07 / 81	Grundschule Bovenden
08 / 81 - 07 / 83	Orientierungsstufe Bovenden
08 / 83 - 05 / 90	Otto-Hahn-Gymnasium Göttingen

## Hochschulstudium

10 / 91	Diplomstudiengang Biologie
10 / 93	Vordiplom Biologie
10 / 94	Studiengang Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien
04 / 97 - 02 / 98	Staatsexamensarbeit am Institut für Anorganische Chemie der Georg-August-Universität Göttingen im Arbeitskreis von Prof. G.M. Sheldrick, PhD: „Röntgenstrukturuntersuchungen an silizium- und titanhaltigen Verbindungen“
07 / 98	1. Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien, Fächerkombination Biologie / Chemie

## Promotion

08 / 98 - 09 / 02	Dissertation am Lehrstuhl für Strukturchemie der Georg-August-Universität Göttingen im Arbeitskreis von Prof. G.M. Sheldrick, PhD: „Die Kristallstruktur der $\alpha$ -Amylase A aus dem hyperthermophilen Bakterium <i>Thermotoga maritima</i> MSB8“
-------------------	---

