



Technische Universität München

Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Lehrstuhl für Biologische Chemie



Strukturelle Charakterisierung von katalytischen und regulatorischen Proteinen des *Escherichia coli* Maltose/Maltodextrin-Systems

Simon Christoph Weiß, Dipl.-Biochem.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Dieter Langosch

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Arne Skerra
2. Prof. Dr. Siegfried Scherer

Die Dissertation wurde am 13.05.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 18.10.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Der Energiestoffwechsel in <i>Escherichia coli</i>	1
1.2 Das Maltose/Maltodextrin-System von <i>Escherichia coli</i>	3
1.3 Genetische Organisation des Maltose/Maltodextrin-Systems	6
1.4 MalT - Der Transkriptionsaktivator des Maltose-Systems	7
1.5 Die Amylomaltase MalQ.....	14
1.6 MalM: Ein periplasmatisches Protein unbekannter Funktion.....	17
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	19
2 Material	20
2.1 Bakterienstämme	20
2.2 Plasmide	20
2.3 Oligodesoxynukleotide	24
2.4 Enzyme und andere Proteine	27
2.5 Chemikalien	27
2.6 Standards und Kits.....	32
2.7 Instrumente	32
2.8 Andere Materialien	36
2.9 Medien, Antibiotika und Puffer	38
3 Methoden	42
3.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen	42
3.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	43
3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
3.4 Gel-Elektrophorese und Reinigung von DNA	43
3.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	44
3.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung der DNA Fragmente.....	44
3.5 5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	45

3.6 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	45
3.7 Polymerase-Kettenreaktion	45
3.8 QuikChange Mutagenese	46
3.9 Dephosphorylierung von DNA.....	47
3.10 Ligierung von DNA-Fragmenten	47
3.11 Sequenzierung von doppelsträngiger DNA	47
3.12 Zell Extraktion.....	48
3.12.1 French Press Zellaufschluss	48
3.12.2 Periplasmatische Extraktion	49
3.13 SDS Polyacrylamid Gel-Elektrophorese	49
3.14 Streptactin-Affinitätschromatographie	50
3.15 Metallchelate-Affinitätschromatographie	51
3.16 Anionenaustauschchromatographie	52
3.17 Gelfiltration von Proteinen.....	52
3.18 Bestimmung der Protein-Konzentrationen	53
3.19 Konzentrierung von Proteinen	54
3.20 Massenspektrometrie	54
3.21 ATPase Assay	54
3.22 Erstellung eines <i>E. coli</i> Zellextraktes zur Stabilisierung von Malt-Fragmenten	55
3.23 Thermofluor Assay	55
3.24 Methylierung von Lysin Resten	56
3.25 Verdau von Protein mit der SUMO Protease	57
3.26 Glucoseoxidase/Peroxidase Assay der Amylomaltase	57
3.27 Enzymatischer Assay für MalQ.....	58
3.28 HPLC von Maltodextrinderivaten	59
3.29 Kristallisation von Proteinen	59
3.30 Röntgenbeugungsexperimente	60
3.31 Auswertung von Röntgenbeugungsdaten.....	62

3.32 Struktur-Verfeinerung	63
3.33 Monte Carlo Simulation der MalQ Reaktion	63
3.34 Statistische Simulation der MalQ Reaktion	64
4 Ergebnisse.....	65
4.1 Strukturelle und funktionelle Analyse des Regulators MalT	65
4.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von MalT und MalT-Fragmenten	65
4.1.2 Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die Proteinstabilität	68
4.1.3 Konformationelle Stabilisierung von MalT durch systematische Verkürzung	72
4.1.4 Mutagenese von MalT-Fragmenten	75
4.1.5 Reinigung von MalT-Fragmenten in Gegenwart von MalY	78
4.1.6 ATPase Aktivität von MalT-Fragmenten.....	81
4.1.7 Kristallisationsexperimente mit MalT-Fragmenten.....	83
4.2 Das periplasmatische Protein MalM mit unbekannter Funktion	84
4.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung des Volllängen MalM	84
4.2.2 Produktion von MalM Fragmenten	86
4.2.3 Methylierung von Lysinseitenketten.....	90
4.2.4 Reduzierung der Seitenkettenflexibilität an der Proteinoberfläche durch Mutagenese.....	91
4.2.5 Bestimmung der MalM Signalpeptid-Sequenz durch Massenspektrometrie	94
4.2.6 Kristallisations-Experimente.....	96
4.2.7 Röntgenbeugungs-Experimente und vorläufige Auswertung	98
4.3 Die Amylomaltase MalQ.....	101
4.3.1 Klonierung, Expression und Reinigung	101
4.3.2 Kristallisations-Experimente.....	104
4.3.3 Datensammlung für Röntgendiffraktions-Experimente an MalQ	106
4.3.4 Verfeinerung der Amylomaltase-Strukturen.....	108
4.3.5 Strukturelle Charakterisierung von MalQ	110
4.3.6 Aktives Zentrum und Ligandenbindung	117
4.3.7 Enzymatische Aktivität der Amylomaltase	125

5. Diskussion.....	132
5.1 Charakterisierung von MalT und MalT-Fragmenten	132
5.1.1 Optimierung der Löslichkeit und Stabilität von MalT-Fragmenten.....	132
5.1.2 Beeinflussung der Kristallisation von MalT-Fragmenten durch optimierte Löslichkeit	136
5.2 Charakterisierung des MalM Proteins mit unbekannter Funktion	137
5.2.1 Das Signalpeptid von MalM.....	137
5.2.2 MalM als Hexamer	139
5.2.3 Hohe Löslichkeit und geringe Kristallisierbarkeit	141
5.2.4 Zusammenhang zwischen Matthews-Koeffizient und Streuqualität der MalM Kristalle ..	142
5.3 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von MalQ.....	144
5.3.1 Vergleich der MalQ Struktur mit der anderer Glycosid-Hydrolasen.....	144
5.3.2 Funktionelle Ähnlichkeit von MalQ und pflanzlichem DPE2	145
5.3.3 Struktureller Vergleich von MalQ N2 mit CBM20	146
5.3.4 Struktureller Vergleich von MalQ N2 mit anderen CBMs	148
5.3.5 Maltose als Substrat von MalQ	152
5.3.6 MalQ Konformationen und der katalytische Zyklus von Amylomaltasen.....	153
5.3.7 Das Gleichgewicht der MalQ-Reaktion.....	155
5.3.8 Acarbose als Inhibitor von Amylomaltasen.....	157
6 Zusammenfassung.....	160
7 Summary.....	162
8 Abkürzungen.....	164
9 Literatur	166
Anhang	181

1. Einleitung

1.1 Der Energiestoffwechsel in *Escherichia coli*

Der Zuckerstoffwechsel ist von zentraler Bedeutung für alle Lebensformen, wobei Glucose eine besonders wichtige Rolle zukommt. Die zu verstoffwechselnden Zucker werden häufig als Polymer zwischengespeichert, dessen Auf- und Abbau essentiell ist und genau reguliert werden muss, um die dafür aufzuwendende Energie zu minimieren. Ein Beispiel hierfür ist Maltodextrin, das aus α 1–4-verknüpften Glucosemolekülen besteht; Maltose stellt dessen kleinste Einheit als Dimer zweier α 1–4-verknüpfter Glucoseeinheiten dar. Das Maltose/Maltodextrin-System von *E. coli* war einer der ersten Zuckerstoffwechselwege, der beschrieben wurde (Monod & Torriani, 1950). Die Untersuchung der funktionellen Komponenten dieses Systems erwies sich jedoch als Herausforderung. Demgegenüber wurde das später entdeckte aber einfacher strukturierte und regulierte Lactose-Operon hinsichtlich der beteiligten Proteinkomponenten strukturell zuerst charakterisiert (Jacob & Monod, 1961; Monod *et al.*, 1965; Roderick, 2005).

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass selektive Kohlenhydratnutzung weit verbreitet ist, und dass Glucose die bevorzugte Kohlenhydratquelle für nahezu alle bekannten Organismen darstellt (Polayes *et al.*, 1988; Tagami & Aiba, 1998; Busby & Ebright, 1999). Denn die Glykolyse, bei der aus einem Molekül Glucose zwei Moleküle Pyruvat entstehen, liefert einen Teil der Stoffwechsel-Energie. Bereits die Anwesenheit externer Glucose bewirkt häufig, dass komplexere Kohlenhydrate von der Zelle gar nicht erst aufgenommen bzw. verstoffwechselt werden. Diese Bevorzugung von Glucose wird als **Carbon Catabolite Repression** (CCR) bezeichnet (Magasanik, 1961). Allgemein ist CCR als regulatorisches Phänomen definiert, bei dem die Expression und Aktivität anderer kohlenhydratabbauender Enzyme in Anwesenheit des bevorzugten Kohlenhydrats reduziert ist (Görke & Stülke, 2008). In den meisten Bakterien sind 5 bis 10 % aller Gene CCR-abhängig (Liu *et al.*, 2005; Blencke *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zur im nächsten Abschnitt diskutierten Aufnahme von Maltose/Maltodextrin erfolgt der Import der meisten Monosaccharide, wie z.B. Glucose, Mannose und N-Acetylglucosamin in *E. coli* über das Phosphoenolpyruvat–Kohlenhydrat **Phospho Transferase System** (PTS) (Kundig *et al.*, 1964). Dieses koppelt den Transport über die cytoplasmatische Membran mit der intrazellulären Phosphorylierung des transportierten Zuckers. Durch diese Phosphorylierung wird einem hohen Konzentrationsgradienten zwischen Zelle und Umgebung entgegengewirkt. Das PTS besteht aus den drei Hauptkomponenten Enzym I (EI), Enzym II (EII) und dem Histidin-Protein (HPr). Der eigentliche Transporter des PTS ist der EII-Komplex. Dieser ist je nach Organismus und zu

transportierendem Zucker entweder ein Multidomänenprotein oder ein Proteinkomplex aus drei verschiedenen Proteinen (Deutscher *et al.*, 2006). Das *E. coli* EII^{Glc} besteht aus einem löslichen cytosolischen EIIA und einem transmembranen EIICB (Abbildung 1). Domäne EIIC bildet den membranüberspannenden Transporter, während die cytoplasmatische Domäne EIIA die transportierten Glucosemoleküle phosphoryliert.

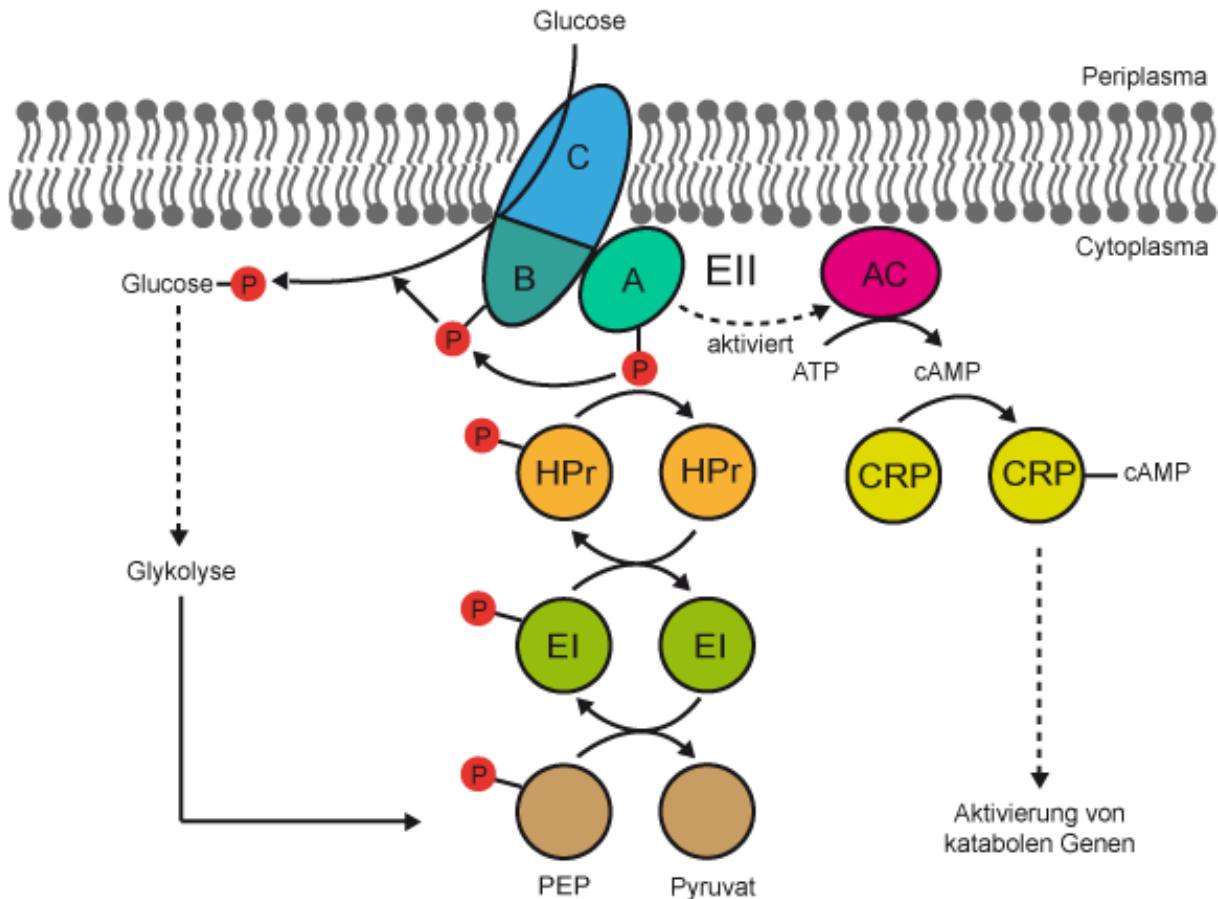


Abbildung 1: Das glucosespezifische PTS-System von *E. coli*. EI und EII stehen für die Enzyme I bzw. II des PTS, wobei A, B und C die jeweilige Untereinheit von EII beschreiben. AC ist die Abkürzung für die Adenylatcyclase, CRP für das **cAMP Receptor Protein** und HPr für das Histidin-Protein. Die übertragene Phosphat-Gruppe ist als roter Kreis dargestellt. Die phosphorylierte Form von EIIA kann an die Adenylatcyclase binden und diese somit aktivieren.

Durch den Abbau von Glucose in der Glykolyse wird Phosphoenolpyruvat (PEP) gebildet, dessen energiereiche Phosphatgruppe durch Autophosphorylierung auf His189 von EI übertragen werden kann. Im Folgenden wird diese Phosphatgruppe zunächst auf His15 von HPr und von dort auf His90 von EIIA weitergereicht. Im letzten Schritt dieser Proteinphosphorylierungskaskade wird schließlich Cys421 von EIIB phosphoryliert. Durch Übertragung der Phosphatgruppe von EIIB auf die transportierte Glucose wird diese dem Transportgleichgewicht entzogen und begünstigt so den weiteren Import.

In diesem Zyklus hängt der Phosphorylierungsgrad der verschiedenen PTS Komponenten von der Transportrate und dem Verhältnis von Pyruvat zu PEP ab. Wenig Zuckerimport

bewirkt einen hohen Anteil an phosphoryliertem EIIA, wodurch die membranständige Adenylatcyklase (AC) aktiviert wird (Görke & Stülke, 2008; Postma *et al.*, 1993). Das auf diese Weise produzierte cAMP bindet an das Katabolitgen-Aktivatorprotein (CAP), welches auch **cAMP Receptor Protein** (CRP) genannt wird, und aktiviert dadurch die schwachen Promotoren vieler kataboler Gene und Operons, indem die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA begünstigt und so die Bildung des offenen Promotorkomplexes erleichtert wird (Tagami & Aiba, 1998; Busby & Ebright, 1999). Allerdings ist eine erhöhte cAMP Konzentration in vielen Fällen nicht ausschließlich oder gar nicht für die Glucose-vermittelte Unterdrückung der Genexpression verantwortlich. Stattdessen ist z.B. im Lactose-Operon eine erhöhte Konzentration des aktiven Lac-Repressors der Hauptgrund für die Unterdrückung der Genexpression. Dieser Mechanismus wird auch als Induktor-Ausschluss bezeichnet (Inada *et al.*, 1996).

1.2 Das Maltose/Maltodextrin-System von *Escherichia coli*

Im Gegensatz zum Import der Glucose über das PTS ist das Maltose/Maltodextrin-System (siehe Abbildung 2) für die Aufnahme als auch den Metabolismus der α 1–4-verknüpften Oligosaccharide verantwortlich. Es ist somit ein Beispiel für die Verwendung eines sekundären Zuckers in Abwesenheit von Glucose (Boos & Shuman, 1998). Insgesamt werden 14 Proteine durch die Gene des *mal*-Regulons kodiert: (i) LamB, MalE, MalFGK₂ und MalX erfüllen Transportaufgaben, (ii) MalP, MalQ, MalS, MalY und MalZ sind für die Metabolisierung von Bedeutung, (iii) MalI und MalT sind Transkriptionsfaktoren und (iv) MalM ist ein Protein unbekannter Funktion (Abbildung 3) (Dippel & Boos, 2005; Ferenci *et al.*, 1980).

Das trimere Maltoporin (LamB) befindet sich in der äußeren Zellmembran (siehe Abbildung 2). Es ist neben der Aufnahme von Maltodextrinen in den periplasmatischen Raum auch für den passiven Transport anderer Moleküle, wie Lactose, Arabinose oder Glycerin sowie für die generelle Membranpermeabilität verantwortlich (Ferenci & Boos, 1980; Death *et al.*, 1993; Schirmer *et al.*, 1995). Im periplasmatischen Raum werden Maltodextrine bis zu einer Länge von 6 Glucoseeinheiten durch das **Maltose binding Protein** (MBP oder MalE) gebunden, und zum aktiven Transporter des Maltose-Systems überführt (Sharff *et al.*, 1992; Spurlino *et al.*, 1991; Ferenci *et al.*, 1980). Dieser zweite Transporter besteht aus einem Heterodimer von MalF und MalG, das die cytoplasmatische Membran überspannt, und einem cytoplasmatisch assoziierten Homodimer der **ATP binding Cassette** (ABC) MalK, welches die benötigte Energie für den Transport gegen den steilen Konzentrationsgradienten liefert (Oldham & Chen, 2011; Davidson *et al.*, 1996). Maltodextrine aus mehr als sechs Glucoseeinheiten können nicht durch MalFGK₂ transportiert werden, sondern werden

zunächst durch die periplasmatische α -Amylase MalS gespalten. MalS spaltet bevorzugt Maltohexaose-Einheiten von längeren Maltodextrinen ab (Freundlieb *et al.*, 1988). Neben dem Transport von Maltodextrinen erfüllen die MalK-Untereinheiten des MalFGK₂-Transporters auch regulatorische Funktionen. Zum einen können sie die Expression der *mal*-Gene durch Interaktion mit inaktivem, monomerem MalT negativ regulieren, zum anderen beeinflusst die Bindung von unphosphoryliertem EIIA^{Glc} an MalK die Transportaktivität von MalFGK₂ (Kühnau *et al.*, 1991). Sobald Maltodextrine ins Cytoplasma gelangen, müssen sie zu Glucose bzw. Glucose-6-Phosphat umgesetzt werden, um in der Glykolyse verstoffwechselt werden zu können. Das wichtigste der dafür notwendigen Enzyme ist die Amylomaltase (4- α -Glucanotransferase) MalQ. Von dieser konnte gezeigt werden, dass sie für das Wachstum von *E. coli* Stämmen auf maltosehaltigen Medien notwendig ist. Sie katalysiert den Transfer von Glycosyl- oder Dextrinyl-Einheiten von Maltodextrinen (Donor) mit mindestens drei Glucose-Einheiten (d.h. Maltotriose oder länger) auf ein anderes α 1,4-verknüpftes Glucosepolymer, das als Akzeptor dient (Palmer *et al.*, 1976). Dabei wird Glucose oder ein kürzeres Maltodextrin vom reduzierenden Ende des Donormoleküls freigesetzt und es entsteht ein verlängertes Maltodextrin als Reaktionsprodukt. Als Konsequenz muss Glucose aus dem Gleichgewicht entzogen werden, wenn eine vollständige Umsetzung von Maltose oder Maltodextrinen durch MalQ erfolgen soll. Dies ist z.B. durch Glucokinase vermittelte Phosphorylierung der Glucose zu Glucose-6-Phosphat möglich (Boos & Shuman, 1998). Längere Maltodextrine, die durch die Amylomaltase-Reaktion entstehen, können durch die Phosphorylase MalP unter der direkten Freisetzung von Glucose-1-Phosphat abgebaut werden (Becker *et al.*, 1994). Ein zweiter Abbauweg der Maltodextrine wird durch die Glucosidase MalZ katalysiert, die Glucose vom reduzierenden Ende abspaltet (Tapio *et al.*, 1991). *E. coli* Stämme, denen *malZ* fehlt, zeigen normales Wachstum auf Maltose. Im Gegensatz dazu wird das Wachstum von *malQ* Deletionsmutanten bereits durch die Zugabe von Maltose in das Medium inhibiert (Peist *et al.*, 1996). Außerdem zeigen diese Mutanten eine erhöhte Konzentration von Glucose, Maltose und Maltodextrinen im Cytoplasma. Dies ist vermutlich eine Folge ihrer Unfähigkeit Glykogenabbauprodukte zu repolymerisieren, sodass sich diese im Cytoplasma anreichern (Park *et al.*, 2011).

1.3 Genetische Organisation des Maltose/Maltodextrin-Systems

Die *mal*-Gene befinden sich in acht verschiedenen Genabschnitten, die über das gesamte Chromosom verteilt liegen, aber hauptsächlich in zwei Clustern organisiert sind (Abbildung 3) (Boos & Shuman, 1998; Boos & Böhm, 2000).

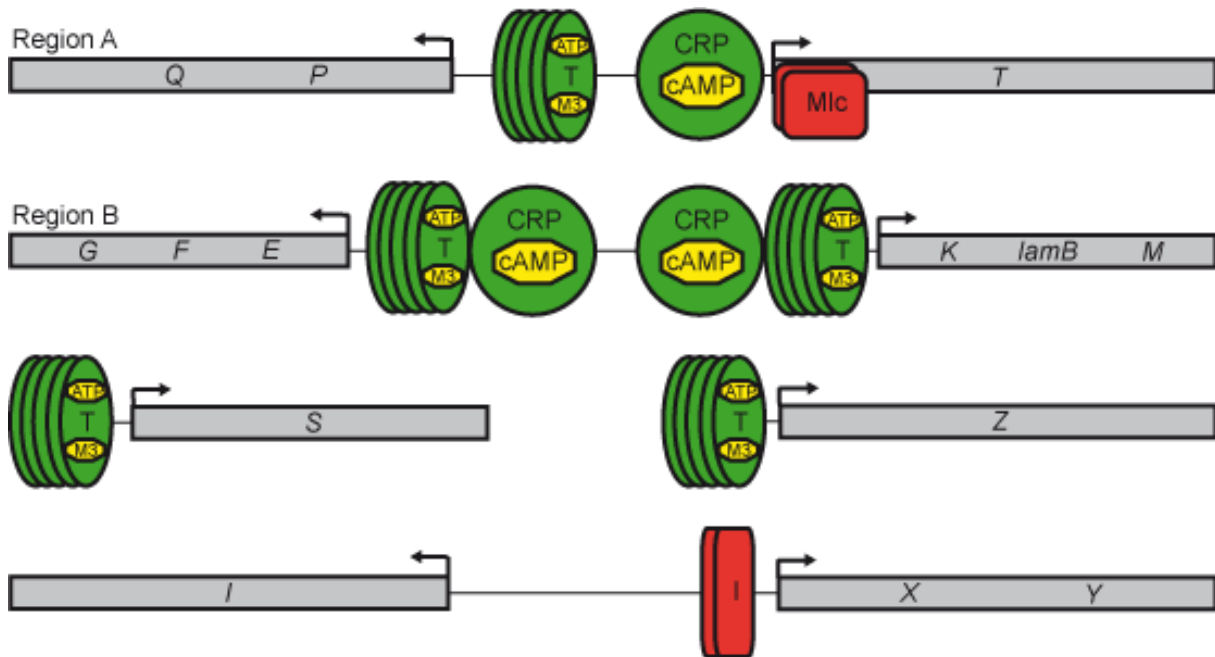


Abbildung 3: Organisation der *mal*-Gene (nach Boos & Böhm, 2000). Die grauen Boxen repräsentieren die *mal*-Gene. Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an. Grüne Ellipsen kennzeichnen positive Regulatoren, rote Rechtecke Repressoren und gelbe Achtecke niedermolekulare Effektoren, wie cAMP, ATP und Maltotriose.

Das erste dieser Cluster ist die *malA* Region, die sich bei 76,5 min befindet und zwei gegensätzlich orientierte Operons enthält. Während *malT* im Uhrzeigersinn transkribiert wird, wird *malPQ* in Gegenrichtung abgelesen (Raibaud *et al.*, 1983). Proteine, die für den Maltose Transport verantwortlich sind, werden durch den zweiten Cluster, die *malB* Region, bei 91,4 min kodiert. Diese ist ebenfalls in zwei gegenläufigen Operons angeordnet: *malEFG* wird gegen den Uhrzeigersinn transkribiert, während *malK*, *lamB* und *malM* im Uhrzeigersinn orientiert sind (Raibaud *et al.*, 1979). Auch *malX* und *malY* sind in einem Operon bei 36,6 min organisiert (Reidl & Boos, 1991). Dagegen sind *malS* bei 80,5 min (Schneider *et al.*, 1992b), *malZ* bei 9,1 min (Tapio *et al.*, 1991) und *malI* nicht in einem Operon organisiert.

Die Transkription von *malPQ*, *malK*, *lamB*, *malM*, *malS* und *malZ* steht jeweils unter der positiven Kontrolle des Regulators MalT. Die Gene, die sich in der *malA* und *malB* Region befinden, sind zusätzlich durch CRP reguliert und werden somit nur bei Aktivität der AC transkribiert, wenn keine Glucose durch das PTS transportiert wird (Boos & Böhm, 2000). Die *malT* Expression selbst steht zusätzlich unter negativer Kontrolle des globalen Regulators Mlc (*makes large Colonies*) (Hosono *et al.*, 1995; Decker *et al.*, 1998; Seitz *et al.*,

2003) sowie unter positiver Kontrolle durch CRP (Richet, 2000), um eine Aktivierung des Maltose-Systems bei aktivem Glucose-Import zu unterdrücken. Die Repression durch Mlc ist ungewöhnlich, da Mlc nicht durch einen niedermolekularen Induktor inaktiviert wird, sondern durch Wechselwirkung mit der aktiven, dephosphorylierten cytoplasmatischen Domäne des PtsG (EIIB^{Glc}) (Lee *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2008). Dadurch ist die Transkription der *mal*-Gene zweifach an den Status des PtsG gekoppelt.

Mall erhielt seinen Namen durch die ursprüngliche, falsche Vermutung, dass es sich um den globalen Induktor des Maltose-Systems handelt. Weiterführende Studien haben dann gezeigt, dass Mall ein Repressor für die Region bei 36,6 min ist, d.h. für die Expression von *mall*, *malX* und *malY*. Doch obwohl Mall wie LacI ein Repressor ist, wird das Maltose-System völlig anders reguliert als das *lac*-Operon, denn es steht nicht nur unter der Kontrolle eines globalen, positiven Regulators, sondern ist auch Teil eines wesentlich komplexeren Netzwerks von Protein-Protein-Interaktionen (Boos & Böhm, 2000). MalX ist ein aktives EIICB des PTS dessen physiologisches Substrat unbekannt ist, das jedoch ineffizient Glucose transportieren kann (Boos & Böhm, 2000).

1.4 MalT - Der Transkriptionsaktivator des Maltose-Systems

Wie oben erwähnt, agiert MalT als positiver Regulator für die Transkription von fünf *mal*-Operons (vgl. Abbildung 3) (Schlegel *et al.*, 2002a; Richet & Raibaud, 1987). Bei MalT handelt es sich um ein multimodulares Protein mit 901 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 103 kDa (Richet & Raibaud, 1987). Es bindet ATP mit einer K_D von 0,4 mM (Richet & Raibaud, 1989) und Maltotriose mit einer K_D von etwa 20 mM (Dardonville & Raibaud, 1990). Der genaue Aktivierungsmechanismus von MalT ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist bekannt, dass MalT prinzipiell in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen kann: einem monomeren und einem homo-oligomeren. Die Bindung des Induktors Maltotriose bewirkt die Stabilisierung des Oligomers, welches im Gegensatz zum Monomer an den Promotor binden kann und damit die Transkription der *mal*-Gene ermöglicht (Boos & Böhm, 2000). In wieweit dabei eine Interaktion zwischen MalT und der σ^{70} -Initiatoruntereinheit der RNA Polymerase stattfindet, ist noch nicht vollständig geklärt. Wichtig für die Aktivierung sind offenbar die beiden Aminosäuren Ser834 und Gln876 (Walker *et al.*, 1982), die jedoch nicht direkt an der DNA-Bindung beteiligt sind (Danot *et al.*, 1996).

MalT gehört zur Familie der **Signal Transduction ATPases with numerous Domains** (STAND), die eine Untergruppe der P-Loop **Nucleosid Triphosphat Hydrolasen** (NTPasen) bilden (Leipe *et al.*, 2004; Ammelburg *et al.*, 2006; Danot *et al.*, 2009). NTPasen katalysieren eine Vielzahl von hochkomplexen, energetisch aufwändigen Reaktionen, weshalb sie häufig auch als molekulare Maschinen bezeichnet werden (Piccolino, 2000; Miller & Enemark,

2016). Zu diesen Prozessen gehören u.a. DNA-Replikation (Kelman & White, 2005) und Rekombination (Yamada *et al.*, 2004), spezifisch regulierte Proteolyse (Sauer & Baker, 2011), Protein Disaggregation (Sousa, 2014) und Auflösung von Proteinkomplexen (Monroe & Hill, 2016). NTPasen stellen die für diese Prozesse benötigte Energie durch die Spaltung energiereicher Phosphorsäure-Anhydridbindungen der jeweiligen Nukleotid-Cosubstrate bereit (Miller & Enemark, 2016). Sie weisen wie viele andere Nukleotid-bindende Proteine auch die charakteristischen Aminosäuresequenzen der sogenannten Walker A (GxxxxGK[S/T]) und Walker B Motive (hhhh[D/E]) auf (Walker *et al.*, 1982; Pathak *et al.*, 2014). Die Phosphatbindestelle der NTPasen wird als P-Loop bezeichnet, wenn sie eine archetypische Loop-Struktur des Walker A Motivs zeigt (Pathak *et al.*, 2014).

STAND Proteine kommen in allen drei Organismenreichen vor und erfüllen vielfältige Funktionen. Unter anderem kontrollieren sie fundamentale zelluläre Prozesse, wie z.B. Genexpression, Entzündungen und Zelltod. Neben *E. coli* MalT (Marquetet & Richet, 2007) sind AfsR aus *Streptomyces coelicolor* (Horinouchi *et al.*, 1990) und AlkS aus *Pseudomonas putida* (van Beilen *et al.*, 2001) bekannte Vertreter mit Genregulationsfunktionen. Entzündungen werden z.B. durch das humane CIAS1 (Sutterwala *et al.*, 2006) oder Vertreter der **Nod-like Receptors** (NLR) Familie (Franchi *et al.*, 2009) reguliert. Beispiele für Apoptose induzierende STAND-Proteine sind *Homo sapiens* APAF1 (Riedl & Salvesen, 2007) und CED-4 (Yan *et al.*, 2006). Des Weiteren gehört auch eine größere Gruppe von pflanzlichen Pathogen Resistenz Proteinen (z.B. Gro1-4) (van Ooijen *et al.*, 2007) zur Familie der STAND Proteine.

Die komplizierten regulatorischen Funktionen der STAND-Proteine spiegeln sich dabei in ihrer erheblichen Größe (typischerweise 800 bis 3000 Aminosäuren) und ihrer komplexen Architektur wider. Obligatorisch für STAND Proteine ist ihr modularer Aufbau und eine sogenannte **Nucleotide-binding Oligomerization Domain** (NOD), die üblicherweise zwischen 35 und 40 kDa groß ist und ATPase Aktivität besitzt (Inohara & Nunez, 2001). Die wichtigsten Sequenzmotive der NOD sind die oben beschriebenen Walker A und Walker B Motive, die essentiell für die ATP-Hydrolyse sind und nach deren Sequenzunterschieden STAND Proteine in Unterfamilien eingeteilt wurden (Walker *et al.*, 1982; Saraste *et al.*, 1990; Traut, 1994). Die NOD selbst ist ebenfalls modular aufgebaut: Sie enthält eine obligatorische **Nucleotide binding Domain** (NBD), die durch zusätzliche Motive wie eine **helical Domain** (HD) und eine **winged-Helix Domain** (WHD) ergänzt sein kann (Marquetet & Richet, 2010). Neben der essentiellen NOD treten bei vielen STAND Proteinen (so auch bei MalT) eine Sensordomäne und eine Effektordomäne auf (siehe Abbildung 4A). Die Abfolge dieser Domänen kann sich zwischen den verschiedenen STAND-Proteinen allerdings stark unterscheiden.

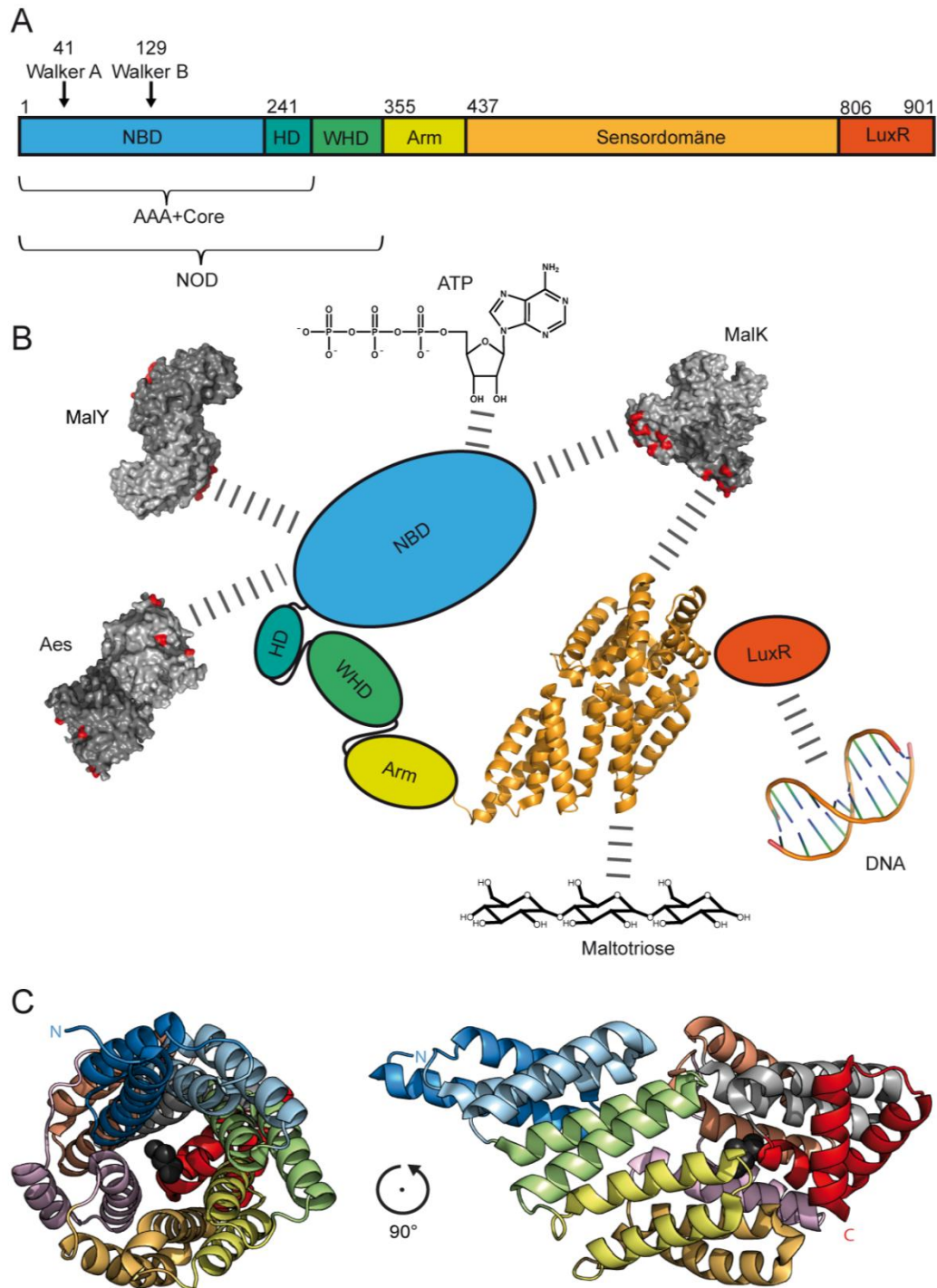


Abbildung 4: Der modulare Aufbau von MalT. (A) Sequenzielle Abfolge der MalT Domänen. (B) Bekannte Interaktionen von MalT mit Proteinen und niedermolekularen Verbindungen. Die strukturell unbekanntes Domänen von MalT sind als Ellipsen dargestellt, wohingegen die Sensordomäne als Cartoon-Modell der Röntgenstruktur (PDB-Code 1HZ4) (Steggborn *et al.*, 2001) abgebildet ist. Etablierte Protein-Interaktionspartner sind als graue Oberflächendarstellung abgebildet, die jeweiligen Monomere sind durch unterschiedliche Grauschattierungen angedeutet. Die Interaktionsflächen auf den Oberflächen von Aes, MalK und MalY sind rot hervorgehoben. (C) SUPR Faltung der MalT Sensordomäne in der Cartoon-Darstellung. Die Helices eines Zwei-Helix-Bündels sind jeweils gleichfarbig dargestellt. Das C-terminale Drei-Helix-Bündel ist rot gefärbt. Das Glycerin Molekül in der mutmaßlichen Maltotriosebindestelle ist in Form dunkelgrauer Kalotten abgebildet.

Der einzige strukturell aufgeklärte Bereich von MalT ist die Sensordomäne (Aminosäuren 437-806; PDB-Code: 1HZ4) (Steegborn *et al.*, 2001) (Abbildung 4B und Abbildung 4C). Der Kern dieser Domäne besteht aus einer Abfolge von acht sogenannten *two-Helix Bundle* Motiven, die wiederum in einer rechtshändigen Superhelix angeordnet sind. Diese Superhelix-Struktur wurde **superhelical Peptide Repeats** (SUPR) genannt und enthält eine potentielle Bindestelle für Maltotriose sowie eine größere potenzielle Protein-Interaktionsfläche, welche vermutlich bei der Maltotriose-abhängigen Oligomerisierung von MalT eine wichtige Rolle spielt. Am C-terminalen Ende der Sensordomäne tritt ein Motiv aus drei α -Helices auf, das gegen die Grundfläche der Superhelix gepackt ist (Abbildung 4C) (Steegborn *et al.*, 2001). Auch bei anderen STAND Proteinen gibt es Sensordomänen mit repetitivem Grundmotiv. Bei humanem APAF-1 und RPR1 aus der Reispflanze treten z.B. eine β -Propeller-förmige WD40 Domäne (Riedl *et al.*, 2005) und ein **Leucine-rich-Repeat** (LRR) (Sakamoto *et al.*, 1999) auf.

Die DNA-bindende Effektor-domäne von MalT (Aminosäuren 807-901) befindet sich am C-Terminus des Proteins. Sie hat die Struktur eines **Helix-Turn-Helix**-Motivs (HTH) des LuxR-Typs (De Schrijver & De Mot, 1999). Diese Domäne ist in der Lage die kurze, asymmetrische Nukleotidsequenz 5'-GGGGA(T/G)GAGG-3' zu binden, die in mehreren Wiederholungen innerhalb der Promotoren des *mal*-Regulons vorkommt (Danot *et al.*, 1996; Vidal-Ingigliardi *et al.*, 1993).

Die Aktivität von MalT wird über zwei gegensätzliche Zyklen reguliert: einen positiven (siehe Abbildung 5) und einen negativen (siehe Abbildung 2). Dabei stabilisiert der negative Zyklus, die langlebige, monomere, ADP-gebundene inaktive Form (Joly *et al.*, 2004; Schiefner *et al.*, 2014), während der positive Zyklus die homo-oligomere, ATP und Maltotriose gebundene aktive Form stabilisiert (Marquenet & Richet, 2010; Schreiber & Richet, 1999).

Der positive Zyklus besteht aus mehreren Schritten: 1) In Anwesenheit von sowohl ATP als auch Maltotriose kommt es zu einer Konformationsänderung der NOD von einer geschlossen, kompakten Form hin zu einer offeneren Struktur, wobei sich die WHD vermutlich von der NBD wegbewegt. 2) Dadurch werden Bindestellen zugänglich, die eine Oligomerisierung von MalT ermöglichen. 3) Das Oligomer ist dann in der Lage die entsprechenden Promotor Regionen der DNA zu binden. 4) Der offene Promotor-Komplex wird aktiviert und die Transkription beginnt. 5) Der MalT-Komplex dissoziiert vom Promotor und 6) einige MalT Protomere hydrolysieren anschließend das gebundene ATP zu ADP und Phosphat. Die resultierende MalT•ADP•Maltotriose Spezies weist eine siebenfach geringe Tendenz zur Oligomerisierung auf, 7) weshalb einzelne Protomere vom Oligomer dissoziieren.

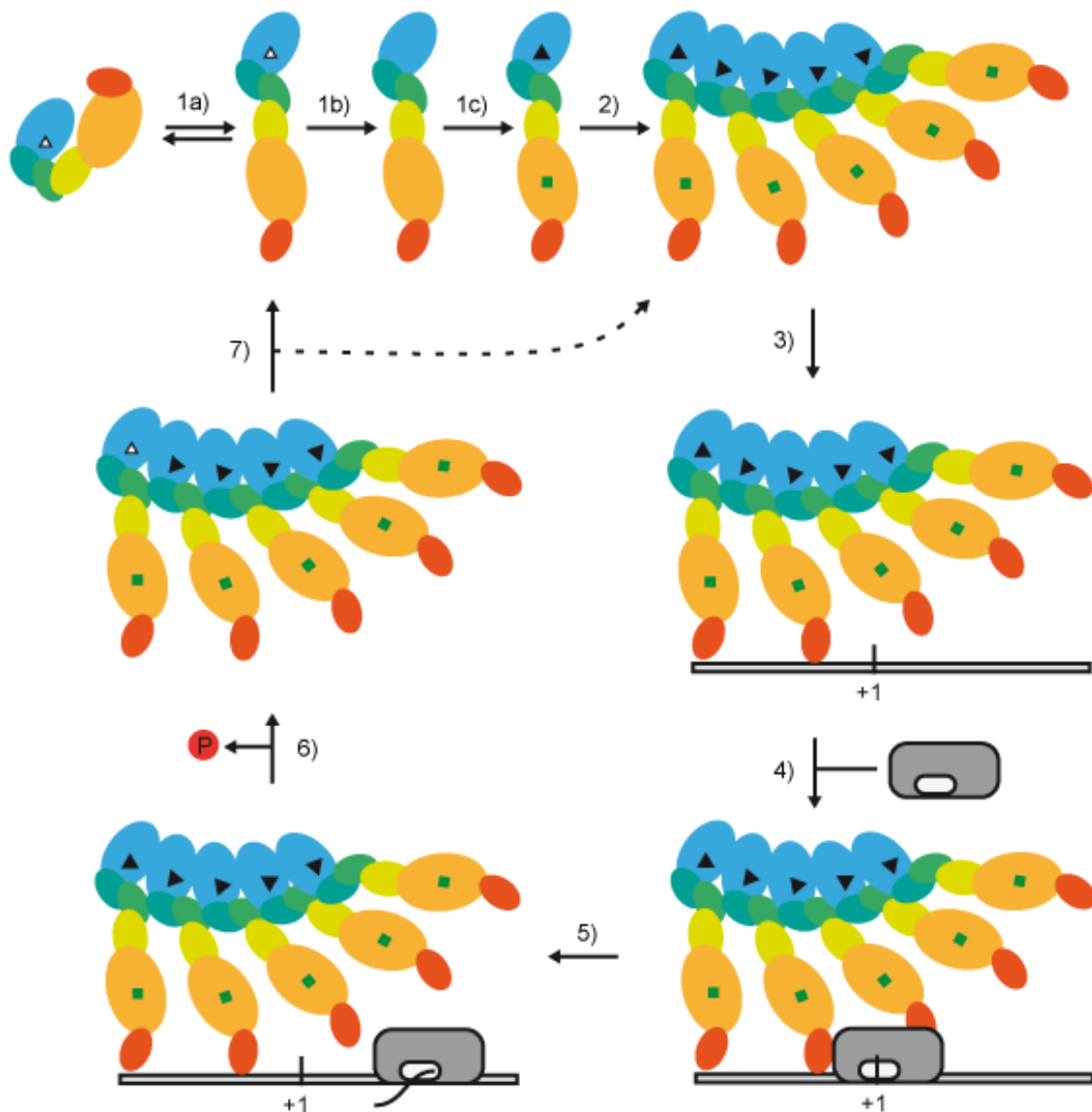


Abbildung 5: MalT Aktivierung (nach Danot *et al.* 2009 und Marquetet *et al.* 2010). Die einzelnen Domänen von MalT sind analog zu Abbildung 4 eingefärbt. ATP ist als schwarz gefülltes Dreieck, ADP als weißes Dreieck und Maltotriose als grünes Quadrat dargestellt. Die RNA Polymerase ist als graues Rechteck abgebildet.

Die Affinität der so entstandenen monomeren, ADP und Maltotriose gebundenen MalT-Spezies für Maltotriose ist deutlich reduziert ($K_{D/app}$ nur noch etwa 200 μM) (Schreiber *et al.*, 2000). Folglich dissoziiert Maltotriose vom monomeren Komplex. Schließlich geht das ADP gebundene MalT wieder in seinen geschlossenen, inaktiven Zustand über (Schreiber & Richet, 1999; Marquetet & Richet, 2007; Danot *et al.*, 2009; Marquetet & Richet, 2010). Die ATPase Aktivität von MalT ist also nicht für die Transkription erforderlich, sondern sorgt letztlich für die Dissoziation des aktiven Oligomers. Im monomeren Zustand ist dann die erneute Konkurrenz der negativen und positiven Effektoren um MalT möglich. Auf diese

Weise wird eine optimale Anpassung der *mal*-Genexpression an die jeweilige zelluläre Situation gewährleistet (Marquenet & Richet, 2007).

Die negative Regulation von MalT erfolgt im wesentlichen durch drei Proteine, die das MalT-Monomer binden können, wodurch die Oligomerisierung und somit die Transkription verhindert wird (siehe Abbildung 2). Zu ihnen zählen die regulatorische Domäne der Transport ATPase MalK (Joly *et al.*, 2004), die β -Cystathionase MalY (Schreiber *et al.*, 2000) und die Acyl-Esterase Aes (Peist *et al.*, 1997).

Die Komplexbildung zwischen MalK und MalT stabilisiert MalT in seiner inaktiven, monomeren Konformation und koppelt somit die Transkription der *mal*-Gene direkt an den Zustand des Maltose-Transporters. MalK Deletionsmutanten exprimieren die *mal*-Gene konstitutiv auf einem Level, das etwa 30 bis 40 % des vollinduzierten Zustands entspricht, während eine MalK Überproduktion die Induktion der *mal*-Gene verhindert (Hofnung *et al.*, 1974). MalK kann allerdings nur mit MalT interagieren, solange der Transporter inaktiv und die Maltosekonzentration gering ist (Böhm & Boos, 2004). Im Gegenzug verringert MalK Bindung an MalT dessen Affinität für Maltotriose (Joly *et al.*, 2004). Die Kontaktfläche auf MalK befindet sich dabei ausschließlich in dessen regulatorischer Domäne (Böhm *et al.*, 2002; Kühnau *et al.*, 1991). Mutationsexperimente deuten darauf hin, dass sowohl die NOD als auch die Sensordomäne von MalT wichtig für die Interaktion mit MalK sind (Richet *et al.*, 2005).

Die Interaktion von MalY mit MalT war die erste beschriebene Protein-Protein-Interaktion, bei der durch Konkurrenz mit einem niedermolekularen Liganden die Aktivität eines Regulators beeinflusst wird (Schreiber *et al.*, 2000). Die genaue Funktion von MalY ist noch nicht geklärt, allerdings zeigt es in Anwesenheit von Pyridoxal-5-Phosphat β -Cystathionase Aktivität. MalY selbst kommt in Lösung als Homodimer vor und scheint einen Komplex mit MalT in der Stöchiometrie von 2:2 einzugehen. Die Interaktionsfläche auf MalT liegt dabei in der NOD, während die Kontaktfläche von MalY jeweils auf den entgegengesetzten äußeren Flächen des Dimers liegt (Schlegel *et al.*, 2002b).

Ein drittes Protein, das mit MalT interagiert und die Transkription der *mal*-Gene inhibiert, wurde beim Durchmustern von *malQ* Mutanten gefunden. Dabei handelt es sich um die Acyl-Esterase Aes (Peist *et al.*, 1997). Der Aes-MalT-Komplex beinhaltet ebenfalls beide Proteine in äquimolarer Menge. Da Aes in Lösung gleichermaßen als Dimer vorliegt, besteht der Komplex vermutlich auch aus einem Dimer Aes, das 2 Moleküle MalT bindet (Joly *et al.*, 2002). Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse eines Oberflächen Alanin-Scannings von Aes gestützt. Die Bindungsstellen der zwei MalT Monomere befinden sich jeweils auf gegenüberliegenden Seiten des AES Dimers, die etwa 70 Å voneinander entfernt liegen (Schiefner *et al.*, 2014).

Da alle drei beschriebenen Interaktionspartner von MalT als Dimere vorkommen, scheint eine solche Quartärstruktur die Stabilisierung des inaktiven MalT zu begünstigen. Während bei Aes und MalY die MalT Bindestellen auf gegenüberliegenden Seiten des Dimers liegen, zeigen beide MalT Bindestellen des MalK Dimers in dieselbe Richtung und sind nur 45 Å voneinander entfernt. Dies bedeutet, dass sich entweder ein MalT Monomer gleichzeitig an beide Bindestellen anlagern kann oder, dass zwei MalT Moleküle direkt nebeneinander an das MalK Dimer binden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stabilisierung des inaktiven MalT Zustands durch die löslichen Enzyme MalY und Aes sehr ähnlich zu sein scheint, während sich das membranassoziierte MalK davon unterscheidet (Schiefner *et al.*, 2014).

Das regulatorische Netzwerk von MalT ist aber noch komplexer als die bloße Aktivierung durch ATP und Maltotriose, denn auch eine erhöhte cytoplasmatische Glucosekonzentration sorgt für eine gesteigerte Expression der *mal*-Gene (Lengsfeld *et al.*, 2009). So wird die Amylomaltase MalQ durch Glucosekonzentrationen von über 100 mM scheinbar gehemmt. Da in einer solchen Situation keine längeren Maltodextrine mehr gebildet werden könnten, müsste sich Maltotriose anreichern. Diese Maltotriose würde daraufhin MalT verstärkt aktivieren. Es ist allerdings fraglich, inwieweit diese Erklärung tatsächlich zutrifft, denn eigentlich sollte eine erhöhte interne Glucosekonzentration CCR bewirken und somit die *mal*-Genexpression eher unterdrücken.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein erhöhtes Level an Glucokinase die *mal*-Genexpression verringert (Lengsfeld *et al.*, 2009). Dem könnten zwei Ursachen zu Grunde liegen: 1.) Die Glucokinase verhindert die Ansammlung von Glucose und so die oben beschriebene Hemmung der Amylomaltase. Folglich würde die Konzentration an Maltotriose nicht steigen und MalT auch nicht verstärkt aktiviert werden. Da allerdings selbst in Abwesenheit von Glykogen- und Maltodextrin-metabolisierenden Enzymen eine basale Expression der *mal*-Gene beobachtet wird, muss es eine andere bzw. zumindest eine weitere Erklärung geben. 2.) Die MalT Aktivität wird direkt durch Glucokinase reguliert. Neben einer denkbaren, direkten Interaktion zwischen MalT und Glucokinase erfolgt die negative Kontrolle der basalen *malT* Expression aber wahrscheinlicher über eine vermehrte Freisetzung von Mlc. Da die Strukturen von Glucokinase (Lunin *et al.*, 2004) und Mlc (Schiefner *et al.*, 2005) sehr ähnlich sind, könnte Glucokinase - in ausreichend hoher Konzentration - mit Mlc um die Bindung an PtsG konkurrieren. Dadurch würde Mlc aus seiner Interaktion mit PtsG verdrängt werden. Freies Mlc wäre dann in der Lage, durch Bindung an den *malT* Promotor, die Transkription von *malT* zu verringern und somit die *mal*-Genexpression insgesamt zu erniedrigen (Lengsfeld *et al.*, 2009).

1.5 Die Amylomaltase MalQ

Das wichtigste Enzym für den Metabolismus von Maltodextrinen in *E. coli* ist die Amylomaltase (4- α -Glucanotransferase) MalQ (UniProt P15977). MalQ war die erste Amylomaltase, die isoliert und biochemisch charakterisiert werden konnte (Monod & Torriani, 1950; Wiesmeyer & Cohn, 1960a; Wiesmeyer & Cohn, 1960b). Es ist bekannt, dass dieses Enzym die Übertragung von Glycosyl- oder Dextrinyleinheiten von einem Maltodextrin mit mindestens drei Glucose Einheiten (d.h. Maltotriose) auf eine anderes α 1–4-verknüpftes Glucose Polymer katalysiert (Palmer *et al.*, 1976). Dabei wird entweder Glucose oder ein anderes kürzeres Maltodextrin vom reduzierenden Ende des Donormoleküls freigesetzt und es entsteht eine verlängerte α 1–4-verknüpfte Glucosekette als zweites Reaktionsprodukt (Abbildung 6). Somit bleibt die Gesamtzahl an glycosidischen Bindungen konstant (Roujeinikova *et al.*, 2002). Die Folge dieser konstanten Bindungszahl ist, dass ein vollständiger Abbau von Maltose oder Maltodextrinen nur möglich ist, wenn längere Maltodextrine durch andere Enzyme gespalten werden. Glucose kann z.B. über die Glucokinase-vermittelte Phosphorylierung zu Glucose-6-phosphat aus diesem Gleichgewicht entfernt werden (Boos & Shuman, 1998). Gebildete längere Maltodextrine können entweder erneut als Substrate in die MalQ Reaktion eingehen, durch die Phosphorylase MalP zu Glucose-1-Phosphat umgesetzt werden (Becker *et al.*, 1994) oder durch die Glucosidase MalZ zu Glucose abgebaut werden (Tapio *et al.*, 1991). Da MalP allerdings nur in der Lage ist Maltodextrine mit einer Länge von mindestens fünf Glucose-Einheiten (d.h. Maltopentaose oder länger) phosphorolytisch zu spalten, liegt der Schluss nahe, dass das Maltose/Maltodextrin-System in *E. coli* für die Verwendung von längeren Maltodextrinen ausgelegt ist. Die Hauptfunktion von MalQ scheint daher die Umwandlung kurzer in längere Maltodextrine zu sein, die durch MalP abgebaut werden können (Schwartz, 1987). Auf diese Weise entsteht im Gegensatz zum direkten Abbau von Maltose und Maltodextrinen durch α -Amylasen auch eine gewisse Menge an Glucose-1-Phosphat. Somit wird durch die MalQ-Reaktion im Vergleich zur sofortigen Spaltung von Maltose/Maltodextrinen zu Glucose weniger ATP verbraucht. Die über das Maltose/Maltodextrin-System gebildete Menge an Glucose-1-Phosphat ist dabei proportional zur Länge der verwendeten Ausgangszucker.

Ohne Amylomaltase ist *E. coli* nicht in der Lage auf maltose- oder maltotriosehaltigen Medien zu wachsen (Schwartz, 1987). Dies ist überraschend, da der Maltose/Maltodextrin-Transport in dieser Situation nicht beeinträchtigt ist und die α -Glucosidase beim Abbau von Maltose und Maltotriose Glucose freisetzen müsste. Vermutlich ist allerdings die erhöhte Menge an gebildeter Maltose bzw. Glucose "toxisch" für diese *malQ* Deletionsmutanten (Peist *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu *malQ*⁻-Stämmen sind *E. coli* Stämme, denen *malZ* fehlt, immer noch in der Lage normal auf Maltose-haltigen Medien zu wachsen. Unter Selektionsdruck für Maltose wurde zudem ein *malQ*⁻ Stamm gefunden, der trotzdem auf

Maltose-haltigen Medien wachsen kann. Bei diesem tritt eine Punktmutation in *malZ* auf (Peist *et al.*, 1996). Diese Trp292Cys-Mutation sorgt dafür, dass MalZ eine Glycosyltransferase-Aktivität ähnlich der Amylomaltase MalQ aufweist und somit zumindest teilweise das Fehlen von MalQ kompensieren kann. Außerdem kann MalZ_{W292C} Maltose nicht mehr hydrolysieren, obwohl die Hydrolase-Reaktion von längeren Maltodextrinen dadurch nicht beeinflusst wird. Diese Experimente zeigen, dass der Aufbau der längeren Maltodextrine eine notwendige Voraussetzung für das Wachstum von *E. coli* auf maltosehaltigen Medien ist.

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, verringert sich die MalQ-Aktivität in Anwesenheit erhöhter Glucosekonzentrationen scheinbar. Ab einer Konzentration von 0,1 M Glucose wurde keine Amylomaltase-Reaktion mehr beobachtet. Diese augenscheinliche Hemmung kann allerdings sowohl durch Zugabe von Glucokinase und ATP/Mg²⁺ als auch durch einen Überschuss an Maltose wieder aufgehoben werden (Lengsfeld *et al.*, 2009). Unter Wachstumsbedingungen, in denen keine externe Maltosequelle vorliegt, reichern *E. coli* Stämme mit *malQ*-Deletion außerdem erhöhte Mengen an Glucose und Maltodextrinen, vor allem aber Maltose, im Cytoplasma an. Dies liegt vermutlich an ihrer Unfähigkeit Glykogenabbauprodukte zu repolymerisieren (Park *et al.*, 2011).

Das Enzym MalQ besteht aus 694 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 78,5 kDa (Pugsley & Dubreuil, 1988) und gehört zur Glycosid-Hydrolase Familie 77 (GH77). Die Einteilung der insgesamt mehr als 80 Unterfamilien der Glycosidhydrolasen erfolgte anhand der Aminosäuresequenzähnlichkeit, aber nicht auf Basis der Substrat- bzw. Reaktionsspezifität (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993; Henrissat & Bairoch, 1996). Die GHs der Familie 77 kommen in Eubakterien, Archaeen und in Pflanzen vor (Godany *et al.*, 2008). Dabei können sie sowohl am Metabolismus von Maltooligosacchariden, Glykogen als auch Stärke beteiligt sein (Boos & Shuman, 1998; Lu & Sharkey, 2006). Mikrobielle Glycosidhydrolasen werden als Amylomaltasen bezeichnet, während die pflanzlichen Enzyme zumeist einfach disproportionierende Enzyme (kurz D-Enzyme) genannt werden (Takaha *et al.*, 1993; Terada *et al.*, 1999; Kaper *et al.*, 2005).

Alle Enzyme der GH-Familien 13, 70 und 77 zeigen Hydrolyse- oder Transglycosylierungsaktivität gegenüber α -verknüpften Glycanen, wobei deren anomere Konfiguration erhalten bleibt. Häufig werden sie daher als α -Amylase-Familie zusammengefasst (MacGregor *et al.*, 2001). Bei dieser Enzymfamilie handelt es sich um Multidomänen-Proteine mit einer katalytischen $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel Domäne, die erstmals bei der Triosephosphatisomerase (TIM) aus dem Hühnermuskel beobachtet wurde (Alber *et al.*, 1981; Reardon & Farber, 1995). Diese TIM-Barrel Domäne bezeichnet man bei Proteinen der GH-Familie auch als Domäne A (MacGregor *et al.*, 2001). Die Reste des aktiven Zentrums befinden sich in den Loops, die das C-terminale Ende eines β -Strangs mit der

jeweils folgenden α -Helix des TIM-Barrels verbinden. Teilweise kommt es in diesen Loops zu größeren Insertionen, die als eigenständige Domäne betrachtet werden können. In den meisten α -Amylasen ist der Loop, der den dritten β -Strang mit der dritten α -Helix verbindet, besonders wichtig. Er wurde zuerst in der Amylase aus Schweinepankreas beschrieben und als Domäne B bezeichnet (Desseaux *et al.*, 1991). Mittlerweile werden aber auch benachbarte große Loops zur Domäne B gezählt (Janecek *et al.*, 1997; Katsuya *et al.*, 1998). Die meisten Enzyme der GH-Familien 13, 70 und 77 beginnen mit der katalytischen $(\beta/\alpha)_8$ -Domäne A. In einigen Fällen tritt jedoch am N-terminalen Ende eine sogenannte Domäne N auf, deren Funktion noch nicht geklärt ist. Enzyme der GH-Familie 13 weisen teilweise auch eine Domäne C auf, die aus β -Strängen besteht. Diese erhöht vermutlich die Affinität für die jeweiligen Substrate (Dauter *et al.*, 1999; Lawson *et al.*, 1994).

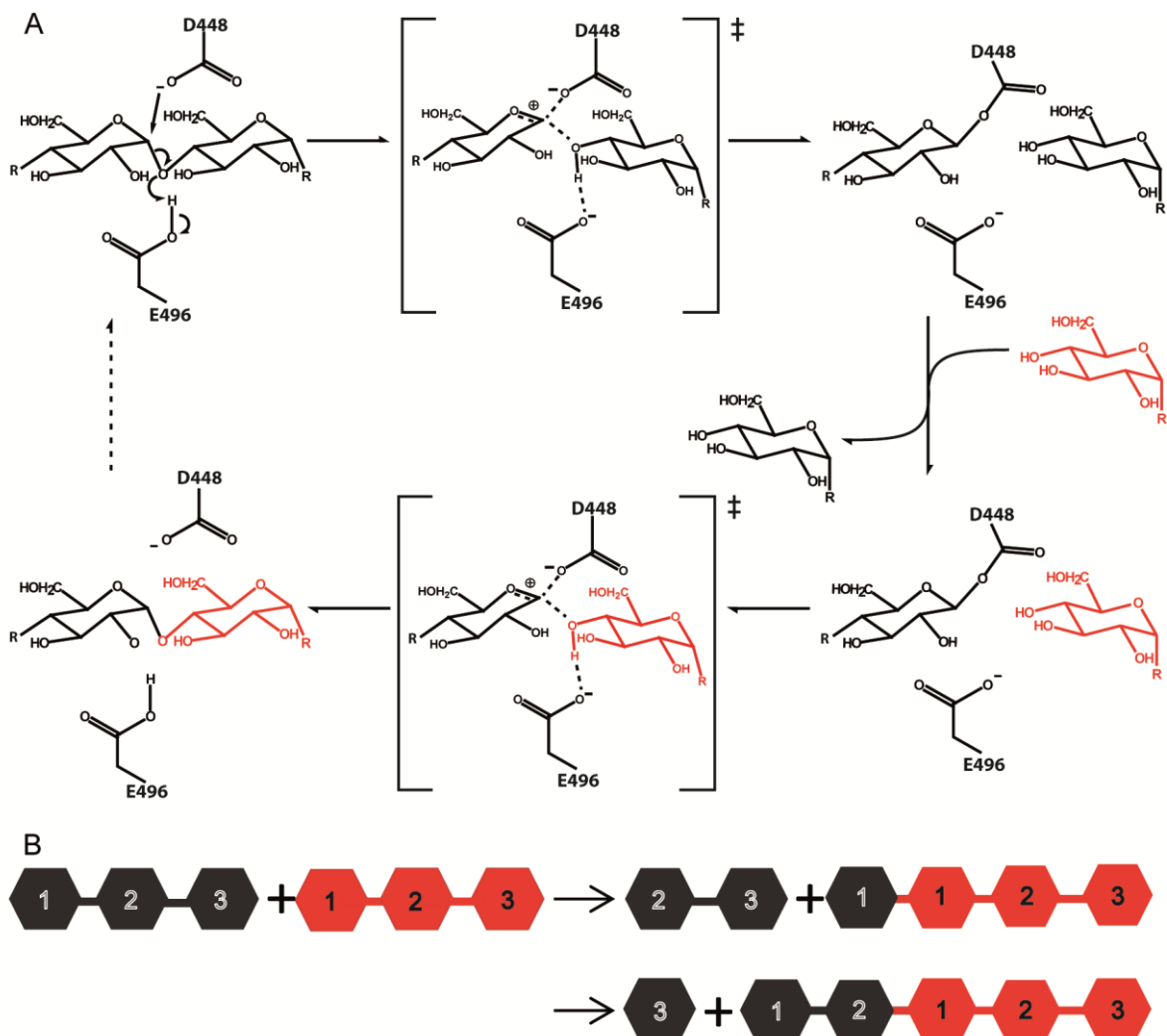


Abbildung 6: Die Amylomaltase Reaktion. (A) Reaktionsmechanismus der Amylomaltase MalQ. Das Donormolekül ist in schwarz dargestellt, das Akzeptormolekül in rot. (B) Die beiden möglichen Amylomaltase-Reaktionen, wenn Maltotriose als alleiniges Substrat angenommen wird. Auch hier ist das Donormolekül in schwarz und der Akzeptor in rot dargestellt. Die Zahl innerhalb der Sechsecke beschreibt die ursprünglich Position des Pyranose-Rings im Donor- bzw. Akzeptormolekül beginnend am nicht-reduzierenden Ende.

Im aktiven Zentrum von α -Amylasen sind zwei Aspartate, ein Glutamat und zwei Histidinreste strikt konserviert. Neben diesen Resten findet man in den meisten Amylomaltasen auch ein konserviertes Arginin zwei Positionen vor dem als Nukleophil wirkenden Aspartat (Janecek *et al.*, 1997). In MalQ sind im wesentlichen die Reste Asp448 (Nukleophil) und Glu496 (Säure/Base Katalysator) an der Katalyse beteiligt. Zu Beginn des katalytischen Zyklus protoniert die Carboxygruppe von Glu496 die zu spaltende α -glycosidische Bindung des Donorsubstrates (Abbildung 6). Die Bindungselektronen zwischen C1 und Sauerstoff klappen daraufhin zur neugebildeten 4'-OH Gruppe des abgespaltenen Zuckers. Die somit an C1 entstandene positive Ladung in Form eines Oxonium-Ions wird durch ein freies Elektronenpaar des Ringsauerstoffs stabilisiert. Gleichzeitig greift das Carboxylat von Asp448 das C1 des Donors nukleophil an, wodurch sich ein kovalentes Zwischenprodukt bildet. Im nächsten Schritt wird das abgespaltene reduzierende Ende des Donormoleküls im aktiven Zentrum durch einen Akzeptorzucker ausgetauscht, welcher durch das negativ geladene Glu496 an der freien 4'-OH-Gruppe deprotoniert wird. Die sich bildende negative Ladung am O4-Sauerstoff des Akzeptormoleküls greift das C1-Atom des kovalenten Zwischenprodukts nukleophil an und spaltet somit die Bindung zum Enzym. Das finale Reaktionsprodukt entsteht und gleichzeitig wird das negativ geladene Aspartat regeneriert (Svensson, 1994).

1.6 MalM: Ein periplasmatisches Protein unbekannter Funktion

MalM (UniProt P03841) ist das einzige Produkt MalT-abhängiger *mal*-Gene, dessen biologische Funktion bis heute nicht geklärt ist (Rousset *et al.*, 1986; Boos & Shuman, 1998). Eine Rolle bei der Aufnahme von Maltodextrinen liegt jedoch nahe, da *malM* innerhalb der *malB* Region in direkter Nachbarschaft zu den Transportproteinen des Maltose-Systems lokalisiert ist. Das *malM* Gen kodiert für 306 Aminosäuren, befindet sich stromabwärts von *lamB* und ist durch drei Kopien der 40 Nukleotide umfassenden **palindromic Unit** (PU) von diesem getrennt (Gilson *et al.*, 1984). Zellfraktionsexperimente nach Überproduktion von MalM sowie Mutationsstudien an der N-terminalen Aminosäuresequenz zeigen eine periplasmatische Lokalisierung (Gilson *et al.*, 1986; Rousset *et al.*, 1986). Vermutlich umfasst die Signalpeptidsequenz 22 bis 26 Aminosäuren (Gilson *et al.*, 1986). Matures MalM zeigt zwei Abfolgen von Alanin und Prolin-Resten (Aminosäuren 227 bis 230 und 243 bis 248), die man in ähnlicher Form auch bei OmpA (Chen *et al.*, 1980) und der Hühner Myosin L Kette (Nabeshima *et al.*, 1982) findet. Dieser Bereich in MalM ist vermutlich wie bei OmpA strukturell ungeordnet und unterteilt das Protein in zwei Domänen. Obwohl die Expression von *malM* durch Maltose induziert wird, können *E. coli* Stämme auch in Abwesenheit von MalM immer noch auf Maltose Medien wachsen (Gilson *et al.*, 1986). Auch eine Beteiligung

von MalM an der Chemotaxis in Richtung steigender Maltosekonzentrationen konnte ausgeschlossen werden (Brass & Manson, 1984). Dennoch scheint MalM von physiologischer Bedeutung zu sein, wie eine sehr hohe Sequenzidentität von 91 % zu MalM von *Salmonella typhimurium* impliziert (Schneider *et al.*, 1992a).

Das Maltose Regulon von *Klebsiella pneumoniae* kodiert für zwei weitere Gene, die bei *E. coli* nicht vorkommen: (i) eine noch unbenannte α -Amylase und (ii) die Pullulanase PulA. Bei beiden Enzymen handelt es sich um sekretierte, extrazelluläre Proteine, die während der exponentiellen Wachstumsphase an der äußeren Zellmembran gebunden vorliegen. PulA spaltet Pullulan, welches aus α 1–6 verknüpften Maltotriose-Einheiten besteht. So werden im extrazellulären Raum kürzere Maltodextrine zur Aufnahme ins Periplasma erzeugt. Dieser Befund stützt die Vermutung, dass das bakterielle Maltose-System ursprünglich zur Verstoffwechslung von längeren und verzweigten Polyglucosiden diente und im Maltose-System in *E. coli* einige der Elemente nicht mehr vorhanden sind (Schwartz, 1987). Dieser Hypothese folgend könnte das periplasmatische MalM auch für den Transport oder den Abbau von längeren und/oder verzweigten maltoseartigen Polyglucosiden von Bedeutung sein.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das *E. coli* Maltose/Maltodextrin-System ist eines der interessantesten Beispiele für die Aufnahme und Verstoffwechslung von Glucosepolymeren in Bakterien. Es ist genetisch und teilweise auch proteinchemisch gut untersucht, jedoch sind noch mehrere grundlegende Fragestellungen ungeklärt.

Von besonderem Interesse sind die strukturellen Grundlagen der Aktivierung des Maltose Regulons. Zentrales Ziel dieser Arbeit war deshalb, die Struktur von MalT allein sowie im Komplex mit seinen regulatorischen Proteinen MalK, MalY und Aes zu untersuchen. Da sich STAND-Proteine, wie MalT, bekanntermaßen nur schwer produzieren und reinigen lassen, sollten neben Vollängen-MalT auch verschiedene MalT-Fragmente herangezogen werden. Zudem sollte untersucht werden, ob sich MalT-Fragmente durch Komplexbildung mit diesen Effektorproteinen stabilisieren lassen.

Das wichtigste und am längsten bekannte Enzym des Maltodextrinstoffwechsels in *E. coli* ist die Amylomaltase MalQ. Ziel dieser Arbeit war es, Struktur und Mechanismus von MalQ aufzuklären, sowie seine Funktion im Stoffwechsel von *E. coli* besser zu verstehen. Neben mechanistischen Aspekten sollte die N-terminale Domäne von MalQ, deren ca. 140 Aminosäuren keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinstrukturen aufweisen, strukturell analysiert werden.

Weiterhin sollte die Struktur des periplasmatischen Proteins unbekannter Funktion MalM untersucht werden. Ziel war es - basierend auf der Struktur - Erkenntnisse über die physiologische Funktion von MalM zu gewinnen. Außerdem sollten Domänenstruktur, Oligomerisierungszustand und Länge der Signalsequenz von MalM untersucht werden.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

E. coli K12-Stämme

BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhdsS</i> (Studier & Moffatt, 1986) von A. Skerra, TU München
JM83	<i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), φ80, lacZΔM15</i> (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) von A. Skerra, TU München
RD130	<i>F, araD139, ΔlacUI69, rpsL, relA, thi, malTp1, malTp7</i> (Chapon, 1982a) von W. Boos, Universität Konstanz
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac[F' proAB lac^f Z ΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987) von A. Skerra, TU München

2.2 Plasmide

pASK-IBA5plus <i>tetp/o</i>	strep-PL; <i>bla/tetR</i> as transcription fusion; von A. Skerra, TU München
pASK-IBA35plus <i>tetp/o</i>	his-PL; <i>bla/tetR</i> as transcription fusion; von A. Skerra, TU München
pASK-75Strep <i>tetp/o</i>	PL-strep; <i>bla/tetR</i> as transcription fusion; von A. Skerra, TU München (Skerra, 1994)
pASK-75his <i>tetp/o</i>	PL-his; <i>bla/tetR</i> as transcription fusion; von A. Skerra, TU München (Skerra, 1994)
pOM2-MalT	PL; <i>bla/mal</i> as transcription fusion; von W. Boos, Universität Konstanz
pAS1-Aes	PL-his; <i>bla/tetR</i> as transcription fusion von W. Boos, Universität Konstanz
pMR11-MalK	PL-his; <i>cam/tetR</i> as transcription fusion von W. Boos, Universität Konstanz
pRP136-MalY	PL-his; <i>cam/tetR</i> as transcription fusion; von W. Boos, Universität Konstanz
pASK37-His-eGFP	his-eGFP-PL; <i>bla/tetR</i> as transcription fusion; von A. Skerra, TU München
pSUMO	his-SUMO-PL; <i>bla/tT7</i> as transcription fusion; von A. Skerra, TU München

In dieser Arbeit neu konstruierte Plasmide

pASK75StrepMalT901	MalT ₁₋₉₀₁ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT806	MalT ₁₋₈₀₆ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT438	MalT ₁₋₄₃₈ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT380	MalT ₁₋₃₈₀ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel

pASK75StrepMalT333	MalT ₁₋₃₃₃ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT246	MalT ₁₋₂₄₆ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT336	MalT ₁₋₃₃₆ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT246	MalT ₁₋₂₄₆ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT336	MalT ₁₋₃₃₆ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalT246	MalT ₁₋₂₄₆ N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalT336	MalT ₁₋₃₃₆ N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT246	MalT ₁₋₂₄₆ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT336	MalT ₁₋₃₃₆ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalY	MalY ₁₋₆₉₄ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35Aes	Aes ₁₋₃₁₉ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalK	MalK ₁₋₃₇₁ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalK217	MalK ₂₁₈₋₃₇₁ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalK225	MalK ₂₂₆₋₃₇₁ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalK237	MalK ₂₃₈₋₃₇₁ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalY	MalY ₁₋₆₉₄ N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5Aes	Aes ₁₋₃₁₉ N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalK	MalK ₁₋₃₇₁ N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalK217	MalK ₂₁₈₋₃₇₁ N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalK225	MalK ₂₂₆₋₃₇₁ N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalK237	MalK ₂₃₈₋₃₇₁ N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT246Cys	MalT ₁₋₂₄₆ , CAIC90SATS, C197S C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT336Cys	MalT ₁₋₃₃₆ , CAIC90SATS, C197S, C319S C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT246Cys	MalT ₁₋₂₄₆ , CAIC90SATS, C197S C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT336Cys	MalT ₁₋₃₃₆ , CAIC90SATS, C197S, C319S C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalT246Cys	MalT ₁₋₂₄₆ , CAIC90SATS, C197S N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalT336Cys	MalT ₁₋₃₃₆ , CAIC90SATS, C197S, C319S N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT246Cys	MalT ₁₋₂₄₆ , CAIC90SATS, C197S N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT336Cys	MalT ₁₋₃₃₆ , CAIC90SATS, C197S, C319S N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalTF2Cys	MalT ₁₋₃₃₃ , CAIC90SATS, C197S, C319S C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalTF3Cys	MalT ₁₋₃₈₀ , CAIC90SATS, C197S, C319S C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel

pASK75HisMalTF4Cys	MalT ₁₋₈₀₆ , CAIC90SATS, C197S, C319S C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalTF2Cys	MalT ₁₋₃₃₃ , CAIC90SATS, C197S, C319S C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalTF3Cys	MalT ₁₋₃₈₀ , CAIC90SATS, C197S, C319S C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalTF4Cys	MalT ₁₋₈₀₆ , CAIC90SATS, C197S, C319S C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT330	MalT ₁₋₃₃₀ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT327	MalT ₁₋₃₂₇ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT324	MalT ₁₋₃₂₄ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT321	MalT ₁₋₃₂₁ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT318	MalT ₁₋₃₁₈ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT315	MalT ₁₋₃₁₅ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT312	MalT ₁₋₃₁₂ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT309	MalT ₁₋₃₀₉ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT306	MalT ₁₋₃₀₆ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT303	MalT ₁₋₃₀₃ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT300	MalT ₁₋₃₀₀ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT297	MalT ₁₋₂₉₇ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT294	MalT ₁₋₂₉₄ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT291	MalT ₁₋₂₉₁ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT288	MalT ₁₋₂₈₈ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT285	MalT ₁₋₂₈₅ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT282	MalT ₁₋₂₈₂ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT279	MalT ₁₋₂₇₉ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT276	MalT ₁₋₂₇₆ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT273	MalT ₁₋₂₇₃ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT270	MalT ₁₋₂₇₀ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT267	MalT ₁₋₂₆₇ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT264	MalT ₁₋₂₆₄ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT261	MalT ₁₋₂₆₁ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT258	MalT ₁₋₂₅₈ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT255	MalT ₁₋₂₅₅ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT252	MalT ₁₋₂₅₂ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT249	MalT ₁₋₂₄₉ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalT247	MalT ₁₋₂₄₇ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT306	MalT ₁₋₃₀₆ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT303	MalT ₁₋₃₀₃ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT294	MalT ₁₋₂₉₄ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT276	MalT ₁₋₂₇₆ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT306	MalT ₁₋₃₀₆ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel

pASK75StrepMalT303	MalT ₁₋₃₀₃ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT294	MalT ₁₋₂₉₄ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT276	MalT ₁₋₂₇₆ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT264	MalT ₁₋₂₆₄ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT258	MalT ₁₋₂₅₈ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT247	MalT ₁₋₂₄₇ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT258	MalT ₁₋₂₅₈ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalT247	MalT ₁₋₂₄₇ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalQ	MalQ ₁₋₆₈₄ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalQ	MalQ ₁₋₆₈₄ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalM	MalM ₁₋₃₀₆ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalM226	MalM ₁₋₂₂₆ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalM	MalM ₁₋₃₀₆ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalM226	MalM ₁₋₂₂₆ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalQArg	MalQ ₁₋₆₈₈ C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalQArg	MalQ ₁₋₆₈₈ C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalMAla165	MalM _{1-306, EK165AA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalMAla250	MalM _{1-306, KKSE250AASA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalMAla165+250	MalM _{1-306, EK165AA, KKSE250AASA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalM226Ala154	MalM _{1-226, QQK154AAA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalM226Ala165	MalM _{1-226, EK165AA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalM226Ala154+165	MalM _{1-226, QQK154AAA, EK165AA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalM226Ala154	MalM _{1-226, QQK154AAA} C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalM226Ala154+165	MalM _{1-226, QQK154AAA, EK165AA} C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalMAla154	MalM _{1-306, QQK154AAA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalMAla154+165+T259M	MalM _{1-306, QQK154AAA, EK165AA, T259M} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalMAla154+165+250	MalM _{1-226, QQK154AAA, EK165AA, KKSE250AASA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalMAla154+165	MalM _{1-226, QQK154AAA, EK165AA} C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel

pASK75StrepMalMAla154+165+250	MalM _{1-226, QQK154AAA, EK165AA, KKSE250AASA} C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalMAla154+165	MalM _{1-226, QQK154AAA, EK165AA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75StrepMalMAla154	MalM _{1-226, QQK154AAA} C-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA5MalMCDomCyt	MalM ₂₅₂₋₃₀₆ N-terminales <i>Strep</i> -tag II Affinitätsanhängsel
pASKIBA35MalMCDomCyt	MalM ₂₅₂₋₃₀₆ N-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalMCDom253PP	MalM _{1-26,253-306} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalMCDom258PP	MalM _{1-26,258-306} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pSUMOHisMalMCDom	MalM ₂₅₂₋₃₀₆ N-terminales His ₆ -SUMO (Affinitäts-)Anhängsel
pASK75HisMalM226Tyr154	MalM _{1-226,QQK154YYY} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalM226Tyr154+Ala165	MalM _{1-226, QQK154YYY, EK165AA} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pSUMOHisMalMCDomMet280	MalM _{252-306, LKLL280MMKM} N-terminales His ₆ -SUMO (Affinitäts-)Anhängsel
pASK75HisMalT336Cys1	MalT _{1-336, CAIC90SATS} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK75HisMalT336Cys2	MalT _{1-336, CAIC90SATS, C197S} C-terminales His ₆ Affinitätsanhängsel
pASK37HisMalT276	MalT ₁₋₂₇₆ N-terminales His ₆ -eGFP (Affinitäts-)anhängsel

2.3 Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide wurden von der Thermo Fisher Scientific GmbH, Offenbach in HPLC-gereinigter Form bezogen.

Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

D20	5'-CCA CTC CCT ATC AGT GAT-3'
PR1	5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'
MalT_Seq_823_rv	5'-TCA TTG AGC GCA AAA TGG C-3'
MalT_Seq_1653_rv	5'-CAG CTG GAA TGC TTT TTC C-3'
MalT_Seq_2021_rv	5'-TCT GGT TTA GCC GTA TGA C-3'

Oligodesoxynukleotide zur Mutagenese und PCR

MalT_NOD_fw	5'-CCC TCT CAT ATG CTG ATT CCG TCA AAA CT-3'
MalT_NOD_rv	5'-GCT CTG GCA CCG CTG GCG CAG GAA G-3'
MalT_NOD_plus_rv	5'-GCT GTG ATT AAG CAG AAT ATC GC-3'
MalT_NOD_Arm_rv	5'-CGC TAT AAG ACG AAT TAG TGT CG-3'
MalT_NOD_Arm_Sen_rv	5'-GCT ATG ATG TTG ATT GAT TTC TCG-3'
MalT_komplett_rv	5'-GCT CAC GCC GTA CCC CAT CA-3'
MalT_fw	5'-GAG ATA TAC ATA TGC TGA TTC CGT CAA AAC T-3'

MalT_fw_His_Strep_tag	5'-GCC CTG ATT CCG TCA AAA CTA-3'
MalT_rv_336_blunt	5'-GCT CAG TTC CCA CTG GCA GC-3'
MalT_rv_336_ohne_C_tag	5'-CAG GTC AAG CTT ACA GTT CCC ACT GGC AGC-3'
MalT_rv_240_blunt	5'-GCT GAT TCC CGC CAG GCG G-3'
MalT_rv_240_ohne_C_tag	5'-CAGGTCAAGCTTAGATTCCCGCCAGGCGG-3'
MalY_fw	5'-GCC TTC GAT TTT TCA AAG GTC GTG-3'
MalY_rv	5'-CAG GTC AAG CTT AAC GAA CAG CGC GGA TG-3'
Aes_fw	5'-GCC AAG CCG GAA AAC AAA CTA CC -3'
Aes_rv	5'-CAG GTC AAG CTT AAA GCT GAG CGG TAA AGA AC-3'
MalK_fw_fl	5'-GCC GCG AGC GTA CAG CTG CAA-3'
MalK_fw_218	5'-GCC CCG CTG GAG CTG TAC CAC-3'
MalK_fw_226	5'-GCC GCA GAC CGT TTT GTC GCC-3'
MalK_fw_238	5'-GCC AAG ATG AAC TTC CTG CCG G-3'
MalK_rv	5'-CAG GTC AAG CTT AAA CGC CCG GCT CCT TA-3'
MalT_CAIC90SATSw_P	5'-CTC TGC GAC ATC TGA GAC GAT GGC GCA AAA AC-3'
MalT_CAIC90SATSr_P	5'-TCA GAT GTC GCA GAG TGA CCG TTG GTT GCC TG-3'
MalT_CAIC90SATSw_QC	5'-CAA CCA ACG GTC ACT CTG CGA CAT CTG AGA CGA TGG CGC-3'
MalT_CAIC90SATSr_QC	5'-GCG CCA TCG TCT CAG ATG TCG CAG AGT GAC CGT TGG TTG-3'
MalT_Cys197fw	5'-CGA AGC AGT TTT TTG ATT CCC GTC TGT CAT CGC-3'
MalT_Cys197_rv	5'-GCG ATG ACA GAC GGG AAT CAA AAA ACT GCT TCG-3'
MalT_Cys319fw	5'-CCG GCG AGT GGT TCT CCT ATC ACC CGC TGT TTG-3'
MalT_Cys319_rv	5'-CAA ACA GCG GGT GAT AGG AGA ACC ACT CGC CGG-3'
MalT_CysMut_Overlap_fw	5'-CAG CGC TGC CAG TGG GAA CTG-3'
MalT_CysMut_Overlap_rv	5'-CAG TTC CCA CTG GCA GCG CTG-3'
MalT_Short_fw	5'-TAA GCT TGA CCT GTG AAG TG-3'
MalT_RV_330	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CTG GCG CAG GAA GTT ACC-3'
MalT_RV_327	5'-CAC AGG TCA AGC TTA GAA GTT ACC AAA CAG CGG G-3'
MalT_RV_324	5'-CAC AGG TCA AGC TTA AAA CAG CGG GTG ATA GCA G-3'
MalT_RV_321	5'-CAC AGG TCA AGC TTA GTG ATA GCA GAA CCA CTC G-3'
MalT_RV_318	5'-CAC AGG TCA AGC TTA GAA CCA CTC GCC GGT ATC-3'
MalT_RV_315	5'-CAC AGG TCA AGC TTA GCC GGT ATC ATC CAT CCG-3'
MalT_RV_312	5'-CAC AGG TCA AGC TTA ATC CAT CCG CTG TAA AAA C-3'
MalT_RV_309	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CTG TAA AAA CAG CCC CTG-3'
MalT_RV_306	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CAG CCC CTG ACG CTC AAT-3'
MalT_RV_303	5'-CAC AGG TCA AGC TTA ACG CTC AAT CTC TTC GAG G-3'
MalT_RV_300	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CTC TTC GAG GCG CAT TTG C-3'
MalT_RV_297	5'-CAC AGG TCA AGC TTA GCG CAT TTG CCC GTT TTC T-3'
MalT_RV_294	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CCC GTT TTC TTC GCC GGT-3'
MalT_RV_291	5'-CAC AGG TCA AGC TTA TTC GCC GGT CAC ACG GG-3'

MalT_RV_288	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CAC ACG GGT GAT GAG GGC-3'
MalT_RV_285	5'-CAC AGG TCA AGC TTA GAT GAG GGC ATC GTT CAT TG-3'
MalT_RV_282	5'-CAC AGG TCA AGC TTA ATC GTT CAT TGA GCG CAA AAT-3'
MalT_RV_279	5'-CAC AGG TCA AGC TTA TGA GCG CAA AAT GGC GCT T-3'
MalT_RV_276	5'-CAC AGG TCA AGC TTA AAT GGC GCT TTT CAA CAG AA-3'
MalT_RV_273	5'-CAC AGG TCA AGC TTA TTT CAA CAG AAA ATG GCG CG-3'
MalT_RV_270	5'-CAC AGG TCA AGC TTA AAA ATG GCG CGT TGC GAG A-3'
MalT_RV_267	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CGT TGC GAG ATC GAC GTT A-3'
MalT_RV_264	5'-CAC AGG TCA AGC TTA ATC GAC GTT ATC CAA AAC CTC-3'
MalT_RV_261	5'-CAC AGG TCA AGC TTA ATC CAA AAC CTC ATC GAC CA-3'
MalT_RV_258	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CTC ATC GAC CAG ATA ATC CG-3'
MalT_RV_255	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CAG ATA ATC CGA AAG ATG GC-3'
MalT_RV_252	5'-CAC AGG TCA AGC TTA CGA AAG ATG GCT GGC ATT G-3'
MalT_RV_249	5'-CAC AGG TCA AGC TTA GCT GGC ATT GAT TCC CGC-3'
MalT_RV_247	5'-CAC AGG TCA AGC TTA ATT GAT TCC CGC CAG GCG-3'
MalT_306_Ctag	5'-GCT CAG CCC CTG ACG CTC AAT-3'
MalT_303_Ctag	5'-GCT ACG CTC AAT CTC TTC GAG G-3'
MalT_294_Ctag	5'-GCT CCC GTT TTC TTC GCC GGT-3'
MalT_276_Ctag	5'-GCT AAT GGC GCT TTT CAA CAG AAA-3'
MalT_264_Ctag	5'-GCT ATC GAC GTT ATC CAA AAC CTC-3'
MalT_258_Ctag	5'-GCT CTC ATC GAC CAG ATA ATC CG-3'
MalT_247_Ctag	5'-GCT ATT GAT TCC CGC CAG GCG-3'
MalQ_rv	5'-GCT GTC CAA ATC CTT CAG CAA-3'
MalQ_fw	5'-GAG ATA TAC ATA TGG AAA GCA AAC GTC TGG A-3'
FW_MalM	5'-GAG ATA TAC ATA TGA AAA TGA ATA AAA GTC TCA TC-3'
226RV_MalM	5'-GCT AGA ACC AAA TAA AGG TCC TAC-3'
RV_MalM	5'-GCT CCC CTT GCC TTT TAC ACT G-3'
RV_MalQ_Arg	5'-GCT TCT GCG CCG TCT GTC CAA ATC CTT CAG CAA-3'
MalM_Ala_FW154	5'-GGG GGC GGC AGC ACT TTA TGT TCT GGT CTT TAC C-3'
MalM_Ala_RV154	5'-AAG TGC TGC CGC CCC CAA CGC CGG TGT CAG-3'
MalM_Ala_FW165	5'-CAC GGC AGC AGA TCT CCA GCA GAC GAC C-3'
MalM_Ala_RV165	5'-AGA TCT GCT GCC GTG GTA AAG ACC AGA ACA-3'
MalM_Ala_FW250	5'-TGG CGG CAA GCG CGC CGA TGC TCA ACG ACA CG-3'
MalM_Ala_RV250	5'-GCG CGC TTG CCG CCA CCG GTG CCG GAG CGG GT-3'
MalMC_RV	5'-GGC AAG GCT AAT TCC AGG C-3'
MalMC_FW_Glu253	5'-GGA ATT AGC CTT GCC GAG CCG ATG CTC AAC GAC A-3'
MalMC_FW_Asp258	5'-GGA ATT AGC CTT GCC GAC ACG GAA AGT TAT TTT AAT AC-3'
MalMC_FW_CytNTag	5'-GCC AGC GAG CCG ATG CTC AAC G-3'
MalMC_RV_CytNTag	5'-CAG GTC AAG CTT ACC CCT TGC CTT TTA CAC TGC-3'
MalM_Tyr_FW154	5'-GGG TAC TAT TAC CTT TAT GTT CTG GTC TTT ACC AC-3'
MalM_Tyr_RV154	5'-AAG GTA ATA GTA CCC CAA CGC CGG TGT CAG-3'

MalM_CDom_MetFW 5'-GGC GAT GAA AAT GCT TGA TGA AGC TGA ACG CC-3'
 MalM_CDom_MetRV 5'-AGC ATT TTC ATC GCC TTA TCA ACA TCA CCT TTC-3'

2.4 Enzyme und andere Proteine

Alkalische Phosphatase aus <i>Arctic Shrimp</i>	USB, Cleveland, Ohio, USA
Benzonase®, Reinheitsgrad I, 25 U/μl	E. Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Carboanhydrase	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Laktatdehydrogenase	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Lysozym aus Hühnereiweiß, 95 % Protein	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ni-NTA-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Qiagen GmbH, Hilden
Ovalbumin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>Pfu</i> Ultra II DNA-Polymerase (2,5 u/μl)	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Pyruvatkinase	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
T4 DNA-Ligase (3 Weiss units/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase (10 units/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

2.5 Chemikalien

Acarbose	Jena Bioscience GmbH, Jena
Aceton	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Acetonitril (LC-MS grade)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid-Stammlösung (30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Adenosin-5'-diphosphat, Na ₂ -Salz (ADP)	AppliChem, Darmstadt
Adenosin-5'-monophosphat, Na ₂ -Salz (AMP)	AppliChem, Darmstadt
Adenosin-5'-triphosphat, Na ₂ -Salz (ATP)	AppliChem, Darmstadt
Adenylyl-Imidodiphosphat (AMPPNP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose (electrophoresis grade)	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Agarose (low melting point) electrophoresis grade Eggenstein)	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
L-Alanin	AppliChem, Darmstadt
Ameisensäure (LC-MS grade)	Sigma-Aldrich, Steinheim

p-Aminobenzoessäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ammoniumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumcitrat (tribasisch)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumtartrat (dibasisch)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin, Na-Salz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Antifoam A-Stammlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
D/L-Äpfelsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Asparagin	E. Merck KGaA, Darmstadt
L-Aspartat	AppliChem, Darmstadt
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Benzamidin (Hydrochlorid)	AppliChem, Darmstadt
Bernsteinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Betain (Monohydrat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Biotin	AppliChem, Darmstadt
Dextranblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	E. Merck KGaA, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat- 4-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Calciumacetat	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-(Cyclohexylamino)-2-Hydroxy- 1-Propansulfonsäure (CAPSO)	AppliChem, Darmstadt
3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]- 1-Propansulfonat Hydrat (CHAPS)	AppliChem, Darmstadt
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
D-Desthiobiotin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dichlordimethylsilan (2 % (v/v) in 1,1,1-Trichlorethan)	E. Merck KGaA, Darmstadt

Digoxigenin-3-O-Methylcarbonyl- ε-Amino-Caproinsäure-N-Hydroxy- Succinimide-Ester (DIG NHS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
n-Dodecyl-β-D-Maltosid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylaminoboran (DMAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat) (DTNB; Ellman's Reagenz)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylendinitrilotetraessigsäure-Na ₂ -2H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Essigsäure (99,9 %)	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Ethanol p.a. (99,9 %)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanolamin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 % w/v)	E. Merck KGaA, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Steinheim
Flavin-Adenin-Dinukleotid, Na ₂ -Salz (FADH ₂)	AppliChem, Darmstadt
D(-)-Fructose	E. Merck KGaA, Darmstadt
D(+)-Galactose, Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
D(+)-Glucose, Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin	AppliChem, Darmstadt
L-Glutamat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Helium Gas (Reinheitsgrad IV)	Linde, Weiterstadt
L-Histidin	AppliChem, Darmstadt
p-Hydroxybenzoesäure	AppliChem, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Steinheim
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoesäure (HABA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
L-Leucin	AppliChem, Darmstadt
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid (Hexahydrat)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat (Hydrat)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Maltose	AppliChem, Darmstadt
Maltotriose	AppliChem, Darmstadt
Manganchlorid	AppliChem, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-(Methacryloxy)-Propyltrimethoxysilan	E. Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (Dihydrat)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumformiat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriummalonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumthiocyanat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nickelchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Nickelsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Nicotinamid	AppliChem, Darmstadt
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)	AppliChem, Darmstadt
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
n-Octyl- β -D-Glycosid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol (≥ 99 %, redestilliert)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglycol 400 (PEG 400)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyethylenglycol 3350 (PEG 3350)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyethylenglycol 20000 (PEG 20000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyethylenglycol-Monomethyl-Ether 550 (PEGMME 550)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyethylenglycol-Monomethyl-Ether 2000 (PEGMME 2000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Polyethylenglycol-Monomethyl-Ether 5000 (PEGMME 5000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Schuchardt & Co., Hohenbrunn
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
o-Phenylendimaleimid	Acros Organics, Geel, Belgien
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Riboflavin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure conc. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sauerstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Selenomethionin (SeMet)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Serin	AppliChem, Darmstadt
Spermidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stickstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thiamin, Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Threonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-(+)-Trehalose	AppliChem, Darmstadt
Triethanolamin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris; Ultra-Qualität)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Uracil	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Valin	AppliChem, Darmstadt
Vanillinsäure	AppliChem, Darmstadt
Xanthin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.6 Standards und Kits

DNA Standards

100 bp DNA Standard	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
1 kbp DNA Standard	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Protein-Größenstandards

SDS-PAGE Standard (<i>Low Range</i>)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Prestained</i> SDS-PAGE Standard (Broad Range)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München; New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Electrospray Calibrant Solution (#63606-10ML)	Fluka Analytical/Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)

Kits zur DNA-Isolierung

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden

2.7 Instrumente

Sequenzierer

ABI-Prism™ 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
---------------------------------	---

Autoklaven

Varioklav® Typ 500	H & P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Sanoclav Typ LaS-201	Wolf, Geislingen

Magnetrührer

MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Bio-Mag 10 Magnetrührer	BCC Spezialgeräte, Göttingen

Brutschränke

B 5060 EK	Heraeus Christ GmbH, Osterode
BM800	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Pelion	Bayer, Frankfurt/Main

Durchflußdetektoren

UV/Vis Filter Photometer	Knauer, Berlin
Variable Wavelength Monitor	Knauer, Berlin
2138 Uvicord S	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
2138 Uvicord SII	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
UV/Vis UV-1 Photometer	Rainin, Woburn, MA, USA

Elektrophoresekammern	Eigenbau; Biometra, Göttingen
<u>Fraktionssammler</u>	
Redi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Ultrorac 7000	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
<u>Heizrührer</u>	
IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RCT	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RET	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Variomag Monotherm	H & P Labortechnik GmbH, München
<u>HPLC</u>	
Agilent 1200 Series	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Dynamax® SD-300 (Pumpe)	Rainin, Woburn, MA, USA
Dynamax®UV-1 (Detektor)	Rainin, Woburn, MA, USA
Gradientenmischer	Rainin, Woburn, MA, USA
VP 260/10 NUCLEODUR C18 Gravity	Machery-Nagel, Düren
<u>Metallblockthermostate</u>	
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Metallblockthermostat 2116	Gebrüder Liebisch, Bielefeld
<u>Netzgeräte</u>	
TN 300-120	Heinzinger, West Germany
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Power Pack P30	Biometra, Göttingen
LKB 2197 Power supply	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
PCR-Gerät UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
<u>Peristaltische Pumpen</u>	
Miniplus 2	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
P1	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
<u>pH-Meter</u>	
E512	Metrohm, Herisau
pH 526 und pH531	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
pH27	Knick, Berlin

Pipettierhilfen

Pipetus akku
accu-jet®

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Brand GmbH & Co., Wertheim

Pipetten

Gilson P10, P20, P100, P200
P1000 Langenfeld Multipette 4780
Polaroid-Kamera MP4
Rollenmischer IDL TRM-V

Abimed Analysen-Technik GmbH,
Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA
Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen

Roboter

Tecan Evo Pipettierroboter
Micro Lab Star Plus
Microplate Washer ELx405

Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Hamilton, Reno, NV, USA
BioTek, Winooski, VT, USA

Röntgengenerator

Rigaku RU 300
Mar345 Image Plate Detector
Cryostream Controller 700
Kühlmobil® Typ 544

Rigaku, The Woodlands, Texas, USA
marresearch, Norderstedt
Oxford Cryo Systems, Oxfordshire, UK
Van der Heijden, Dörentrup

Synchrotron

7T-WLS-2 (Strahlungsquelle)

KMC-1 (Monochromator)

KMC-2 (Monochromator)

Rayonix MX-225 (Röntgendetektor)

Beamline 14.1, Beamline 14.2
(BESSY synchrotron, Berlin-Adlershof, Germany)
Beamline 14.1
(BESSY synchrotron, Berlin-Adlershof, Germany)
Beamline 14.2
(BESSY synchrotron, Berlin-Adlershof, Germany)
Rayonix, Evanston, IL, USA

Signalschreiber

REC 112

SE 120
2210
Knauer

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH,
Freiburg
ABB Goerz AG, Wien, Österreich
LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Knauer, Berlin

Schüttelapparate

Wipptisch WT12
Typ 3012
Typ 3017

Biometra, Göttingen
Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Schüttelinkubatoren

Modell G25	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA
Modell TR-125/ITE-K	Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Spektrophotometer

ELISA-Photometer SpectraMax 250	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
UV-Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen

Vakuumpumpen

Drehschieberpumpe RD4	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Drehschieberpumpe RD15	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Membranpumpe MZ2C	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim

Vortexmischer

Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
----------------	--

Waagen

Micro m3p	Sartorius GmbH, Göttingen
PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000C	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
PAG Oerlikon Precisa 125 A	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
R160P-*D1	Sartorius GmbH, Göttingen
U5000D	Sartorius GmbH, Göttingen

Wasserbäder

Haake F6/C25	Thermo Haake, Karlsruhe
Julabo PC/8A	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Julabo UC/5B	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Thermomix 1460	Braun Melsungen AG, Melsungen

Zelldisruptor

French Pressure Cell Press FA-078	SLM Aminco, Rochester, N.Y., USA
-----------------------------------	----------------------------------

Zentrifugen

Biofuge A	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Biofuge pico	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Labofuge 6000	Heraeus Christ GmbH, Osterode
J-21C und J2-21	Beckman Instruments, München
mit Rotoren JA-10 und JA-20	
Sigma 4K10	Sigma GmbH, Osterode

Sigma 4-16K mit Rotor	Sigma GmbH, Osterode
Sigma-11118	
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor	Kendro Laboratory Products GmbH, München
H-6000A/HBB-6	
Sorvall RC 5B und RC 5C Plus mit Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RMC 14	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
Eppendorf 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

2.8 Andere Materialien

Dialyseschläuche

Spectra/Por®, MWCO: 6-8 kDa	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Typ 27, MWCO: 12-16 kDa	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg

Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 60 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen
	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen

Reaktionsgefäße

0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Safelock)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
---------------------------------	---------------------------------------

SDS-PAGE

Apparaturen, Glasplatten, Spacer,	Amersham Pharmacia Biotech Europe
Dichtungen, Kämmen GmbH,	Freiburg;
	Biometra, Göttingen

Größenausschlußchromatographie-Säulen

Superdex 75 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH,
Superdex 200 HR 10/30	Freiburg; GE Healthcare, Buckinghamshire,
Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade	UK
Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade	
Superdex 75 HiLoad 26/60 prep grade	
Superdex 200 HiLoad 26/60 prep grade	

Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
----------------------------------	------------------------------

Ionen-Austauschchromatographie-Säulen

Resource™ Q, 1 ml	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Resource™ Q, 6 ml	
Resource™ S, 1 ml	

Konzentratoren:

Vivaspin 4, MWCO: 10 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Vivaspin 15, MWCO: 10 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Vivaspin 4, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Vivaspin 15, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster

Kunststoffröhrchen

Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar® PP-Röhrchen, 15 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Cellstar® PP-Röhrchen, 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Linbro-Gewebekulturplatte	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen

Membranfilter

Immobilon™-P (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
GVWP (0,22 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Nitrocellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel

Mikrotiter-Platten

Falcon Micro Test III Flexible Becton Assay-Plates	Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA
--	------------------------------------

PD-10 Gelfiltrationssäulen	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
----------------------------	--

Petrischalen aus Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
-----------------------------	------------------------------

Pipetten-Spitzen

blau (200-1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
gelb (5-200 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
kristallklar (0,5-10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Säulenmaterialien

Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
POROS MC/M PerSeptive	Biosystems GmbH, Wiesbaden

Sterilfilter

Filtropur (0,45 und 0,22 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Millex® HV (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Membransterilfilter (0,22 µm; Ø 5 cm)	Schleicher & Schuell, Dassel

Zentrifugenbecher für Beckman-Rotoren
JA-10 und JA-20, sowie für Sorvall-Rotoren
SS-34, SLA-1500 und SLA-3000

Nalgene Company, New York, USA

2.9 Medien, Antibiotika und Puffer

Alle Medien und Lösungen, die für die Arbeit mit Bakterien, Proteinen und/oder DNA benötigt wurden, wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Kulturmedien wurden mit demineralisiertem Wasser (VE-Wasser), alle anderen Lösungen mit Millipore® H₂O angesetzt, sofern nicht explizit anders angegeben. Agar-Kultur-Platten wurden bei 4 °C aufbewahrt. Alle anderen Lösungen wurden bei Raumtemperatur gelagert, wenn es nicht implizit anders erwähnt wird. Antibiotika wurden erst direkt vor dem Gebrauch zu den Medien hinzugefügt.

LB Medium

10 g/l Bacto Trypton

5 g/l Bacto Yeast Extract

5 g/l NaCl

15 g/l Bacto Agar (nur für Agar-Kultur-Platten)

mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

M63 Medium zur Inkorporation von SeMet in das Zielprotein

22 mM KH₂PO₄

40 mM K₂HPO₄

15 mM (NH₄)₂SO₄

0,2 % (w/v) Glucose

1 mM MgSO₄

4,5 µM FeSO₄

0,4 mg/l von jeder proteinogenen Aminosäure mit Ausnahme von Methionin und Tryptophan

0,02 mg/l Tryptophan

50 mg/l Selenomethionin

0,04 mg/l p-Amino-Benzoesäure

0,04 mg/l p-Hydroxy-Benzoesäure

0,4 mg/l Xanthin

0,4 mg/l Uracil

0,01 mg/l Biotin

0,01 mg/l Nicotinamid

1 µg/l Riboflavin

0,01 mg/l Thiamin

Mit 5 N KOH auf pH 7,5 eingestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

Antibiotika

Zur Herstellung von Selektivmedien wurden folgende Antibiotikallösungen benutzt, nachdem sie steril filtriert und bei -20 °C gelagert wurden:

Ampicillin (Amp) 100 mg/ml in H₂O (1:1000 zum Medium)

Chloramphenicol (Cam) 30 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol (1:1000 zum Medium)

Tetracyclin (Tet) 10 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol (1:1000 zum Medium)

Inducer Stammlösungen

Es wurde eine 2 mg/ml Anhydrotetracyclin (aTc) in DMF hergestellt und diese wurde im Verhältnis 1:10.000 zum Medium gegeben. Die aTc Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

TB Puffer

10 mM PIPES pH 6,7

15 mM CaCl₂

55 mM MnCl₂

250 mM KCl

Alle Komponenten mit Ausnahme des MnCl₂ wurden gemischt und der pH Wert wurde mit KOH auf 6,7 eingestellt. Dann wurde das MnCl₂ zugegeben und die Lösung durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Puffer für die Agarose Gel-Elektrophorese

TAE-Puffer

40 mM Tris/HCl pH 8,3

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

TBE-Puffer

90 mM Tris/HCl pH 8,3

90 mM Borsäure

2 mM EDTA

Puffer für die SDS-PAGE:

1x SDS-Laufpuffer (Fling & Gregerson):

50 mM Tris

190 mM Glycin

1 g/l SDS

pH 8,8 stellt sich ein.

4x Lower-Tris:

3 M Tris/HCl pH 8,85

4 g/l SDS

4x Upper-Tris:

0,5 M Tris/HCl pH 6,8

4 g/l SDS

5x Auftragspuffer:

250 mM Tris/HCl pH 8,0

7,5 % (w/v) SDS

25 % (v/v) Glycerin

0,25 mg/ml Bromphenolblau

12,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol (bei reduzierendem Auftragspuffer)

Färbelösungen:

10 % (v/v) Essigsäure

40 % (v/v) Methanol

0,25 % (w/v) Coomassie brilliant blue R-250

Entfärbelösung:

Wurde ebenso zubereitet wie die Färbelösung, nur ohne Zugabe von Coomassie Brilliantblau.

Aufbewahrungslösung:

7 % (v/v) Essigsäure

2 % (v/v) Glycerin

PPA Puffer

500 mM Saccharose

100 mM Tris/HCl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

IMAC Puffer

50 mM HEPES/Na pH 8,0

500 mM NaCl

10 mM Imidazol

IMAC Elutionspuffer

50 mM HEPES/Na pH 8,0

500 mM NaCl

300 mM Imidazol

SAC Puffer

40 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

2 mM β -Mercaptoethanol (BME)

SAC Elutionspuffer

40 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

2 mM β -Mercaptoethanol

5 mM D-Desthiobiotin

AEX Puffer A

20 mM Tris/HCl pH 8,8

AEX Puffer B

20 mM Tris/HCl pH 8,8

1 M NaCl

SEC Puffer

20 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

2 mM β -Mercaptoethanol

HPLC Puffer

10 mM NH_4HCO_3 pH 8,5 (pH wurde mit NH_3 eingestellt)

3 Methoden

3.1 Kultivierung von *E. coli* Stämmen

Um Einzelkolonien von *E. coli* Stämmen zu kultivieren, wurden die Bakterien auf LB Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das zur Selektion auf gewünschte Resistenzmarker benötigte Antibiotikum wurde jeweils zum Kulturmedium gegeben. Danach wurden die Platten für maximal 4 Wochen bei 4 °C gelagert und zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet.

Die Flüssigkulturen wurden in LB Medium unter Zugabe der jeweiligen Antibiotika angesetzt. Die Volumina betragen 4 ml Medium in 13 ml Kulturröhrchen, 50 ml Medium in 100 ml Schüttelkolben und 2 L Medium in 5 L Erlenmeyer Kolben, die mit einer Schicht aus Aluminiumfolie verschlossen wurden. Kulturmedien mit einem Volumen von bis zu 50 ml wurden direkt mit Kolonien von Agar-Platten angeimpft, während für größere Kulturvolumina mit einer stationären Vorkultur im Verhältnis 1:50 angeimpft wurde. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgte bei 180 rpm und 16 °C, 22 °C, 30 °C oder 37 °C. Die optische Zelldichte wurde in 1 cm Mikroküvetten bei einer Wellenlänge von 550 nm (OD_{550}) in Ultrospec 2000 oder 3000 Spektrometern gegen eine Referenzprobe aus Kulturmedium gemessen. Bei optischen Dichten über 1,0 wurden die Proben entsprechend verdünnt. Sobald die OD_{550} einen Wert von 0,6 erreicht hatte wurde Anhydrotetracyclin (aTc) in einer finalen Konzentration von 200 µg/l zugesetzt, um die Expression zu induzieren. Die Expressionsdauer variierte je nach Temperatur zwischen 3 und 16 h.

Einbau von SeMet in das Zielprotein während der Expression

Eine 50 ml Vorkultur in LB Medium mit dem jeweiligen Selektiv-Antibiotikum wurde in einem 100 ml Schüttelkolben mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte Platte angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 2000 ml M63 Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum im Verhältnis 1:50 angeimpft und bei 22 °C und 180 rpm inkubiert bis die OD_{550nm} etwa 1,0 betrug. Zu diesem Zeitpunkt wurde aTC in einer finalen Konzentration von 200 µg/l zugesetzt, um die Expression zu starten. Die Expression wurde über Nacht durchgeführt.

3.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Bakterienzellen wurden mit der $\text{CaCl}_2/\text{MnCl}_2$ -Methode chemisch so verändert, dass sie in der Lage sind Plasmid-DNA aufzunehmen. Zu diesem Zweck wurden 50 ml LB Medium ohne Zusatz von Antibiotikum mit 1 ml einer Vorkultur des entsprechenden *E. coli* Stammes bei 30 °C und 180 rpm inkubiert bis die OD_{550} einen Wert von 0,6 erreicht hatte. Dann wurde die Kultur in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 10 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4 °C, 2500 g, 10 min) sedimentiert und in 15 ml TB Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren 10 minütigen Inkubation auf Eis und einem weiteren Zentrifugationsschritt (4 °C, 2500 g, 10 min) wurde das Zellpellet in 4 ml TB Puffer sowie 300 μl DMSO gelöst und erneut für 10 min auf Eis gelagert. Hiervon wurden 100 μl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt, schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Für den tatsächlichen Transformationsschritt wurden 100 μl Zellsuspension mit ungefähr 2 ng Plasmid-DNA oder 2 μl Ligierungsansatz in einem 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Reaktionsgefäß für 40 s in einem Heizblock auf 42 °C erwärmt und erneut für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 550 μl LB Medium zu der Lösung gegeben und die Probe wurde für 60 min bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. 100 μl dieser Zellsuspension wurden zur Selektion positiver Kolonien auf einer Agar-Nährmediumsplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Platten mit Einzelkolonien wurde bei 4 °C für maximal 3 Wochen gelagert.

3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurden "Miniprep" Kits der Firma Qiagen N.V. genutzt. Dazu wurde eine stationäre 4 ml Kultur von *E. coli* XL1-blue Stämmen, die das spezifische Plasmid enthielten, als DNA-Quelle genutzt. Diese Kits funktionieren nach dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzelle (Birnboim & Doly, 1979), der anschließenden selektiven Immobilisierung der Plasmid DNA an einer stationären Phase (d.h. dem Anionenaustausch-Material, also dem Silikagel), sowie einigen Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA in ddH_2O .

3.4 Gel-Elektrophorese und Reinigung von DNA

Um die doppelsträngigen DNA Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen, wurde die Methode der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid angewendet (Sambrook *et al.*, 1989). Diese Methode wurde sowohl zu analytischen als auch

zu präparativen Zwecken, mit dem Ziel der Isolierung von gereinigten DNA Fragmenten, eingesetzt.

3.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA Fragmente wurde eine 0,8 bis 1,2 % (w/v) Agarose-Suspension in TBE Puffer durch Hitze-Homogenisierung angesetzt und mit etwa 1/10000 des Gesamtvolumens an 1 % (w/v) Ethidiumbromid versetzt. Die Lösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und bei Raumtemperatur abkühlen gelassen. Das feste Gel hatte eine Länge von etwa 10 cm, eine Breite von ca. 7 cm und eine Dicke von etwa 2 cm und wurde in eine Elektrophorese-Kammer überführt, die mit 20 ml TBE Puffer gefüllt war. Durch Einsetzen eines Kammes in die noch flüssige Agaroselösung wurden während des Auskühlens Substrattaschen erzeugt. Dann wurden 20 µl jeder vorher mit 1/6 Ladepuffer gemischten Probe in eine Substrat-Tasche gefüllt. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA Proben wurde ein 100 bp oder 1 kbp DNA Standard genutzt, um die Länge der spezifischen DNA Fragmente zu bestimmen. Die Elektrophorese selbst wurde bei einer Spannung von 90 V für 60 min betrieben. Die DNA Fragmente wurden unter dem Licht einer 312 nm UV Lampe analysiert, denn bei dieser Wellenlänge absorbiert das zwischen den Nukleotidbasen interkalierte Ethidiumbromid. Abschließend wurden photographische Aufnahmen des Gels durch einen Rotfilter aufgenommen.

3.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung der DNA Fragmente

Um eine präparative Agarose-Gelelektrophorese durchzuführen, wurde ein Agarose Gel aus 1,0 g "*Low Melting Point*" Agarose und 60 ml TAE Puffer gegossen. Nach dem Heizen zum Siedepunkt wurden 5 µl 1 % (w/v) Ethidiumbromid zu der Lösung gegeben, die daraufhin in die Elektrophorese-Kammer überführt wurde. Die mit Restriktionsendonukleasen verdaute DNA oder das PCR Produkt wurde in eine 2 cm breite Substrattasche gefüllt und die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 60 V für etwa 100 min durchgeführt. Um den Abbau den Nukleinsäuren aufgrund von Strahlungsschäden zu verhindern, wurde die Analyse bei 312 nm UV Licht mit einer niedrigeren Intensität ausgeführt. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA Proben wurde ein 100 bp oder 1 kbp DNA Standard genutzt, um die Länge der spezifischen DNA Fragmente zu bestimmen. Der Teil des Agarosegels, der die gewünschte DNA-Bande enthielt, wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Agarose von der DNA abzutrennen, wurde ein Qiagen "QIAquick Gel Extraction Kit" entsprechend der Bedienungsanleitung verwendet. Die DNA wurde hierfür an eine Anionen-Austausch-Matrix gebunden, gewaschen und mit ddH₂O eluiert. Die gereinigten DNA Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

3.5 5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die kovalente Ligierung eines (un-)verdauten PCR Produkts mit dem 3' Ende eines Vektorrückgrats zu ermöglichen, wurde das 5' Ende des DNA Inserts mit der T4 Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert. Dafür wurden 28 µl des PCR Produkt, welches durch die präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt worden war, mit 4 µl einer 10 mM ATP-Lösung, 4 µl bidestiliertem Wasser, 4 µl des 10x T4 PNK Puffer A (700 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT) und 1 µl (10 U) der T4 PNK gemischt und anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde daraufhin durch Hitzeschock-Denaturierung der Kinase für 10 min bei 65 °C gestoppt und die DNA wurde mit dem Qiagen "QIAquick PCR Purification Kit" entsprechend der Anleitung gereinigt. DNA Fragmente, die nicht direkt für eine Ligierung verwendet wurden, wurden bei -20 °C gelagert.

3.6 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA Moleküle wurden mit der gewünschten Restriktionsendonuklease jeweils nach Herstellerangaben verdaut. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 2 h in dem Puffersystem durchgeführt, in dem die Aktivität des Restriktionsenzym am höchsten war. Für den simultanen Verdau mit zwei Endonukleasen wurde das Puffersystem gewählt, in dem die höchste Aktivität für beide Enzyme gewährleistet wurde. In Puffersystemen, in denen die Aktivität einer der beiden Restriktionsendonukleasen nur bei 50 bis 75 % lag, wurde diese in einem zweifachen Überschuss zugegeben. Um einen analytischen Verdau durchzuführen, wurden üblicherweise 0,5 µg DNA mit 5 U der Restriktionsendonuklease in einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl verdaut. Für einen präparativen Verdau wurden 2-10 µg Plasmid DNA oder PCR Produkt in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durch 20 U der Restriktionsendonuklease geschnitten.

3.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) wurde verwendet, um definierte DNA Abschnitte selektiv zu amplifizieren. Die dafür paarweise verwendeten flankierenden Oligonukleotide (Primer) hatten eine zur Matrizen DNA komplementäre Sequenz an ihrem 3' Ende von mindestens 17 Nucleobasen. Der Standardansatz einer PCR Reaktion hatte ein Volumen von 50 µl und enthielt 0,01-1 mg der Template DNA. Es wurden außerdem 25 pmol jedes der flankierenden Primer, 5 µl 10x *Pfu*-Ultra II Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix (jeweils 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zu dem Ansatz gegeben. Das Reaktionsvolumen wurde mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Der Reaktionszyklus wurde mit einer Denaturierungsphase von

2 min bei 95 °C gestartet, dann wurden 0,5 µl der *Pfu* Ultra II Polymerase (*Hot Start*) zugegeben.

Tabelle 1: Reaktionszyklus der Polymerase-Kettenreaktion.

Nummer	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
0	Initiale Denaturierung	95	120
1	Denaturierung	95	30
2	Hybridisierung (<i>annealing</i>)	50 - 60 ¹	60
3	Synthese	68 oder 72	60 ²
4	Finale Synthese	72	600

¹ Die Hybridisierungstemperatur der Primer an die Matrix DNA wurde jeweils in Abhängigkeit von der spezifischen Annealingtemperatur jedes Hybrides gewählt.

² Die Synthesedauer ist in s pro kbp der Matrix DNA angegeben.

Üblicherweise wurde nach der Polymerase-Zugabe ein Zyklus aus den Schritten 1 bis 3 dreißigmal wiederholt. Abschließend wurde die DNA Synthese durch Auffüllen der DNA Enden mittels eines finalen, 10 minütigen Inkubationsschrittes bei 72 °C fertig gestellt.

3.8 QuikChange Mutagenese

Zum Austausch einzelner oder weniger benachbarter Nukleotidbasenpaare, der Einführung neuer Nukleotide oder deren Deletion in ein bestehendes Plasmid wurde die Methode der QuikChange Mutagenese verwendet. Diese beruht auf einer PCR mit Primern, die neben einer komplementären, flankierenden DNA-Sequenz auch Nukleotide enthalten, die der Zielsequenz des neuen Plasmids entsprechen. Die neue Plasmid-DNA entsteht im Überschuss und ist im Gegensatz zum parentalen Plasmid nicht methyliert. Daher wird sie bei dem folgenden Restriktionsverdau mit *DpnI* auch nicht abgebaut, sondern angereichert und kann zur Transformation verwendet werden.

Üblicherweise wurden für einen QuikChange Mutagenese PCR-Ansatz 0,01-1 mg der Template DNA, 25 pmol der flankierenden Primer, 5 µl 10x *Pfu*-Ultra II Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix (25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit 0,5 µl der *Pfu* Ultra II Polymerase (*Hot Start*) vermischt. Das Reaktionsvolumen wurde mit bidest H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Der Reaktionszyklus wurde mit einer Denaturierungsphase von 2 min bei 95 °C gestartet, anschließend folgten üblicherweise 18 bis 20 Zyklen aus den drei Phasen 1 bis 3 (siehe Tabelle 1). Nach dem Abschluss der PCR Reaktion, ohne den finalen Synthese Schritt der regulären Polymerase-Kettenreaktion, wurde 1 µl *DpnI* zu dem Ansatz gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurde eine präparative Agarose-Gelelektrophorese

durchgeführt, um die gewünschte DNA-Bande zu isolieren. Die DNA wurde für eine Transformation eingesetzt.

3.9 Dephosphorylierung von DNA

Um die Ausbeute der Ligierung von DNA Fragmenten zu erhöhen, bei denen der Verdau mit Restriktionsendonukleasen zu *blunt* Enden geführt hatte, wurde das Vektorfragment dephosphoryliert, bevor es mit dem phosphorylierten Insert zu einem Ligierungsansatz gegeben wurde. Dazu wurde die alkalische Phosphatase aus Garnelen (*Arctic Shrimp*) benutzt. Hierfür wurde 2 Stunden nach dem Start des Restriktionsverdau 1 µl (1 U) der alkalischen Phosphatase zu dem Restriktionsansatz gegeben und dieser wurde für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch Hitzeschock für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Die DNA wurde danach durch Benutzung des Qiagen "QIAquick PCR Purification Kit" von den verwendeten Enzymen abgetrennt und in ddH₂O eluiert.

3.10 Ligierung von DNA-Fragmenten

Zur Konstruktion neuer Plasmide wurden DNA Fragmente, die durch Restriktionsverdau erhalten wurden, mit Hilfe von T4 DNA Ligase kovalent verknüpft. Üblicherweise wurden dafür 50 fmol des Vektorrückgrats und ein fünffacher Überschuss an Insert DNA mit 1 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer und 0,5 µl T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/µl; Promega) vermischt. Das Reaktionsgefäß wurde in einem Wasserbad für etwa 16 h bei 16 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde 50 fmol des Vektorrückgrats ohne zusätzliche Insert DNA in einem Parallelexperiment inkubiert. Jeweils 1 µl des Ligierungsansatzes wurde dann für die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* XL1-blue Zellen genutzt.

3.11 Sequenzierung von doppelsträngiger DNA

Die DNA Fragmente, welche durch Mutationsansätze verändert wurden oder die durch PCR erhalten wurden, wurden mittels Sequenzanalyse verifiziert. Zu diesem Zweck wurde die zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA nach der Ketten-Terminations-Methode von Sanger analysiert (Sanger *et al.*, 1977). Für die Analyse der DNA Fragmente mit dem ABI PRISM® 310 Sequenzierautomaten wurde das ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit benutzt. Dieses Kit beinhaltet eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase (AmpliTaQ®) (Tabor & Richardson, 1995) und die Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die mit einem jeweils unterschiedlichen Dichlorrhodamin Molekül gekoppelt waren, eingesetzt (Rosenblum *et al.*, 1997). Indem die Amplifikation mit diesen Terminatoren

durchgeführt wird, wird die Verlängerung der naszierenden DNA Kette genau dann zufällig abgebrochen, wenn die Polymerase eine Terminatorbase einbaut. So ist die gebildete DNA an dieser Position durch das entsprechende Fluorophor markiert. Die entstandenen DNA Fragmente wurden durch Kapillarelektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*, POP-6™) nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Fluoreszenzgruppen wurden durch einen Argon Ionen Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz wurde mittels einer CCD (*Charge-Coupled Device*) Kamera detektiert und als digitales Signal an einen Power Macintosh G3 Computer übermittelt. Die entstehenden Rohdaten wurden mithilfe der Software ABI PRISM® DNA Sequencing Analysis 3.3 analysiert und als Elektropherogramm oder Textdatei gespeichert. Die Polymerase-Reaktion erfolgte üblicherweise wie folgt: 4 µl BigDye™ Ready Reaction Mix wurden mit je 2 µl Plasmid-DNA (ca. 1 µg), 2 µl eines geeigneten Primers (1 µM) und 2 µl H₂O zusammengegeben. Die Mischung wurde 25-mal folgendem PCR-Zyklus unterworfen: 30 s bei 96 °C; 15 s bei 55 °C; 4 min bei 60 °C. Danach wurde das PCR-Produkt durch Zugabe von 1 µl 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 25 µl Ethanol (p. a.) für 20 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation sediert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 20 min, 13.000 rpm), mit 70 % (v/v) Ethanol (p. a.) gewaschen, an der Luft für etwa eine halbe Stunde getrocknet und in 14 µl des mitgelieferten TSR-Puffers resuspendiert. Die Probe wurde in einem geeigneten Reaktionsgefäß im ABI PRISM® 310-Sequenziergerät platziert. Das Gerät wurde durch Einbau der Kapillare, Befüllen des Pumpenblocks mit Polymer und Bereitstellung des Elektrophoresepuffers nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Sequenzanalyse wurde schließlich mit Hilfe der Kontroll-Software (ABI PRISM®310 Data Collection) gestartet.

3.12 Zell Extraktion

3.12.1 French Press Zellaufschluss

Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur zügig auf Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, 4 °C, 15 min, 5.000 rpm). Der Medienüberstand wurde abgenommen und verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren und gelagert. Das gefrorene Pellet von einer Expression in 2 L Medium wurde in 18 ml IMAC Puffer A oder SAC Puffer durch Lagerung auf Eis - unterbrochen von kurzem, vorsichtigem Schwenken - resuspendiert. Die Pufferwahl hing davon ab, ob das Protein ein His₆-Affinitätsanhängsel oder einen *Strep*-tag II hatte. Der Zellaufschluss mit der French Press erfolgte dreimal bei 1000 psi. Die erhaltene Suspension wurde zweimal für jeweils 20 min zentrifugiert (SS34, 17000 rpm, 4 °C), um die Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde zweimal durch einen 0,4 µm Filter filtriert, bevor er auf die entsprechende Affinitäts-Chromatographie-Säule aufgetragen wurde.

Um für die SDS-PAGE zur Untersuchung der Expression eine vergleichbare Probe der Gesamtzelle zu erhalten, wurde 1 ml der Kultur in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 13000 rpm, 5 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einem Volumen von $OD_{550} \times 100 \mu\text{l}$ SAC- bzw. IMAC Puffer A resuspendiert. Nach Zugabe von 20 μl 5x reduzierenden Auftragspuffer für SDS-PAGE wurden die Zellen durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min lysiert. Danach wurde das Lysat bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei 4 °C gelagert.

3.12.2 Periplasmatische Extraktion

Die Zellkultur wurde zur Ernte zügig auf Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, 4 °C, 15 min, 5.000 rpm). Der Medienüberstand wurde anschließend vollständig abgenommen und die sedimentierten Zellen unter Kühlung in insgesamt 20 ml eiskaltem Periplasmaaufschluss (PPA)-Puffer resuspendiert und in einem 50 ml Becherglas unter Rühren für die Dauer von 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (Sigma 4K10, 5.000 rpm, 4 °C, 15 min sowie SS-34, 15000 rpm, 4 °C, 15 min). Für die weitere Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie, wurde der periplasmatische Extrakt über Nacht bei 4 °C gegen IMAC-Puffer A bzw. SAC-Puffer dialysiert.

3.13 SDS Polyacrylamid Gel-Elektrophorese

Die Analyse von Proteinen und deren Mischungen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von Fling & Gregerson (Fling & Gregerson, 1986). Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins (Creighton, 1997). Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden 12%ige oder 15%ige SDS-Polyacrylamidtrenngelle verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel in Trenngelen mit einer Größe von 8 x 5 cm bei einer Dicke von 0,75 cm. Zunächst wurde eine Gelkammer aus Glasplatten und Kunststoff-Abstandhaltern zusammengebaut und mit einem Kunststoffband abgedichtet. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 ml enthielt 1,25 ml 4x Lower-Tris sowie einen der gewünschten Prozentigkeit des Gels entsprechenden Anteil einer 30%igen (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid. Zur Herstellung von 12%igen Gelen wurden 2 ml und für 15%ige Gele 2,5 ml Acrylamid-Stammlösung verwendet. Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 8 μl TEMED und 80 μl 10 % (w/v) APS wurden 5 ml der Trenngelmischung zwischen die abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit etwa 1 ml

Wasser oder Isopropanol überschichtet, um Lufteintritt zu vermeiden. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels (ca. 20 min) wurde das Wasser bzw. Isopropanol abgegossen. Für die Herstellung der 5%igen Sammelgelmischung wurden 0,5 ml Acrylamid-Stammlösung und 0,75 ml 4x Upper-Tris mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 8 µl TEMED und 80 µl 10 % (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen, und es wurde ein Taschenformer mit zehn Zähnen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Metallklammern sowie der untere Abstandhalter vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Die nicht sofort benötigten Gele wurden zur Lagerung mit einem feuchten Papierumschlag bei 4 °C für bis zu eine Woche gelagert. Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5x Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. In die Probenaschen des vollständig polymerisierten Gels wurden dann je 20 µl der so vorbereiteten Proteinlösung pipettiert und die Elektrophorese unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer mit Obergrenzen von 120 V und 30 mA betrieben. Nach ca. 2 h hatte der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreicht. Daraufhin wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel entnommen und für 20 min in Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Schwenken in Entfärbelösung sichtbar gemacht und das Gel in Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert. Von dem Gel wurde zur Dokumentation eine photographische Aufnahme gemacht.

3.14 Streptactin-Affinitätschromatographie

Die Isolierung rekombinanter Proteine aus der cytosolischen oder periplasmatischen Zellfraktion einer *E. coli*-Kultur in Form von Fusionsproteinen mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel (Skerra & Schmidt, 2000; Schmidt & Skerra, 2007) erfolgte mit Hilfe der Streptactin-Affinitätschromatographie. Dazu wurde der Zellaufschluss in SAC Puffer durchgeführt bzw. der Periplasmaaufschluss über Nacht bei 4 °C gegen das etwa 100-fache Volumen an SAC Puffer dialysiert und vor dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten steril filtriert (0,45 µm). Eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1.6 (Voss & Skerra, 1997), entsprechend einer Beladung an Streptavidin von 5 mg/ml, wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie – überprüft anhand der Absorption bei 280 nm (A_{280}) – mit SAC Puffer gespült. Die Chromatographie wurde mithilfe einer Säule mit einem Bettvolumen von 7,5 ml bei einer konstanten Flussrate von etwa 60 ml/h betrieben. Das durch die Zellextraktion erhaltene Proteingemisch wurde auf die Säule aufgetragen und anschließend mit SAC Puffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das

Strep-tag II gebundene rekombinante Protein wurde daraufhin mit einer 5 mM Lösung an D-Biotin in SAC Puffer eluiert. Zur Regenerierung wurde das Biotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SAC Puffer verdrängt, bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung annahm. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Spülen mit SAC Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und gegen einen geeigneten Puffer dialysiert und üblicherweise bei 4 °C gelagert.

3.15 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) (Porath *et al.*, 1975) beruht auf der Bindungswechselwirkung von funktionellen Gruppen auf der Proteinoberfläche, vor allem Histidin- oder Cystein-Seitenketten, zu immobilisierten Übergangsmetallionen. Um durch Überexpression produzierte rekombinante Proteine von den anderen Proteinen abtrennen zu können, bietet sich daher die Einführung einer künstlichen Oligohistidin-Sequenz (His₆-tag) an. Solche Fusionsproteine können aufgrund ihrer ausgeprägten Affinität zu den chelatisierten Metallionen gereinigt werden (Hochuli *et al.*, 1988). Die Immobilisierung der Übergangsmetallionen erfolgt dabei durch chelatisierende chemische Gruppen, die auf einem Säulenmaterial fixiert sind. Hier wurde eine Sepharose-Matrix mit gebundenen Iminodiessigsäure-Gruppen (Chelating Ido-Sepharose Fast Flow) als Chelatbildner eingesetzt, und als Übergangsmetallion wurde Zn²⁺ oder Ni²⁺ verwendet. Zur Metallbindung des rekombinanten Proteins diente ein N-terminaler oder C-terminaler His₆-tag.

Die Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflussphotometers bei 280 nm dokumentiert. Die Säule wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zunächst mit einer Flussrate von bis zu 120 ml/h betrieben und mit etwa 3 Säulenvolumina Wasser bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Dann wurde die Säule mit etwa 4 Säulenvolumina 250 mM ZnSO₄ beladen, mit etwa 3 Säulenvolumina Wasser nachgespült und schließlich mit IMAC-Puffer äquilibriert bis die Basislinie erreicht wurde. Anschließend wurde die periplasmatische Proteinfraction bzw. der cytosolische Zellaufschluss aufgetragen und bis zum Erreichen der Basislinie mit IMAC-Puffer nachgespült. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 300 mM Imidazol in IMAC-Puffer über 20 Säulenvolumina. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 2 ml aufgefangen. Nach der Elution wurde die Säule zur Entfernung der Zn²⁺-Ionen mit Regenerierungspuffer (250 mM EDTA pH 8,0) und anschließend mit Wasser gespült. Der Proteingehalt der Eluatfraktionen und deren Reinheit wurde mittels SDS-PAGE bestimmt. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an reinem rekombinanten Protein wurden vereinigt

und mit 2 mM EDTA versetzt, um mögliche co-eluierte Metallionen zu komplexieren. Anschließend wurde das gesammelte Protein gegen einen geeigneten Puffer dialysiert und bei 4 °C gelagert.

3.16 Anionenaustauschchromatographie

Zur Durchführung der Anionenaustausch Chromatographie wurde ein Äkta Purifier oder Äkta Explorer HPLC-System mit einer angeschlossenen Resource™ Q Säule benutzt. Diese Säulen sind mit monodispersen Beads aus Polystyren und Divinylbenzol gepackt. Liegt die Proteinprobe in einer Pufferlösung mit einem pH-Wert oberhalb des eigenen pI-Wertes vor, besitzt das Protein eine negative Gesamtladung. Aufgrund dieser kann es mit den positiv geladenen quartären Aminen wie Trimethylaminomethyl-Resten ($-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) der Chromatographiematrix interagieren. Proteine mit positiver oder neutraler Gesamtladung interagieren nicht mit der Matrix und werden direkt von der Säule eluiert und abgetrennt. Durch Erhöhung der Ionenstärke (z.B. Cl^- Ionen) werden die an die Säule gebundenen Proteine entsprechend ihrer Interaktionsstärke verdrängt und eluiert. Theoretisch ist auch eine Elution durch Änderung des pH-Werts möglich. Zunächst wurden die relevanten Fraktionen der Affinitätschromatographie vereinigt, über Nacht bei 4 °C gegen AEX Puffer A dialysiert und mittels einer 50 ml Probenschleife, je nach Proteinmenge, auf eine 1 ml oder 6 ml Resource™ Q Säule aufgetragen. Die Resource™ Q 1 ml Säule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min betrieben, die Resource™ Q 6 ml Säule mit einer Flussrate von 2 ml/min. Nach dem Auftrag wurde mit AEX Puffer A gewaschen, bis die Basislinienabsorption erreicht wurde. Zur Elution wurde üblicherweise ein Gradient von 0 bis 250 mM NaCl in 20 Säulenvolumina AEX Puffer verwendet. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 1 oder 2 ml aufgefangen. Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden per SDS-PAGE ermittelt, vereinigt, gegen einen geeigneten Puffer dialysiert und üblicherweise bei 4 °C gelagert.

3.17 Gelfiltration von Proteinen

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) ermöglicht die Trennung von Proteinen gemäß ihres hydrodynamischen Radius, der sich aus Größe und Form eines Proteins bzw. Proteinkomplexes ableitet. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Feinreinigung der rekombinanten Proteine verwendet. Die Chromatographie wurde mit einem Äkta Purifier oder Äkta Explorer HPLC-System betrieben. Die verwendeten Chromatographiepuffer wurden steril filtriert und durch Anlegen eines Vakuums für circa 30 min unter Rühren entgast bzw. - sofern möglich - autoklaviert. Zur Reinigung der Proteine wurde die präparative Superdex 75 HiLoad 16/60 *prep grade* Säule oder die präparative

Superdex 200 HiLoad 16/60 *prep grade* Säule verwendet. Diese besitzen jeweils ein Säulenbettvolumen von 124 ml und einen Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa bzw. 10 bis 600 kDa. Beide Säulen wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min betrieben. Für größere Proteinmengen wurde auch eine präparative Superdex 200 HiLoad 26/60 *prep grade* Säule verwendet. Diese hat ein Säulenbettvolumen von 320 ml und wurde mit einer Flussrate von 3 ml/min betrieben. Von der Proteinlösung wurde jeweils ein Volumen von maximal 1/100 des Säulenvolumens über eine Probenschleife aufgetragen. Mittels Fraktionskollektor wurden Fraktionen à 1 ml oder 2 ml gesammelt und anschließend mit SDS-PAGE auf Gehalt und Reinheit des Zielproteins untersucht. Die Säulen wurden durch Spülen mit einem Säulenvolumen an 0,5 M Natronlauge regeneriert und anschließend mit einer Lösung aus 0,02 % NaN₃ sowie 1 mM EDTA gespült und gelagert.

3.18 Bestimmung der Protein-Konzentrationen

Die Konzentration von Lösungen gereinigter Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm – unter Berücksichtigung der Eigenabsorption des für die vorherige Dialyse verwendeten Puffers – mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt:

$$A = \varepsilon * c * d \quad (1)$$

Die dazu notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten wurden jeweils mit Hilfe des Computerprogramms "PROTPARAM" vom SIB Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteiger *et al.*, 2003) berechnet (siehe Tabelle 2). Sie werden dabei näherungsweise als Summe der Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren der vollständig entfalteten Peptidkette bestimmt (Gill & von Hippel, 1989).

Tabelle 2: Molare Extinktionskoeffizienten verschiedener in dieser Arbeit verwendeter rekombinanter Proteine bei 280 nm.

	E [M ⁻¹ cm ⁻¹]	M [Da]	pI
MaIT ₁₋₉₀₁	154810	104316,7	6,05
MaIT ₁₋₈₀₆	143350	93354,2	5,92
MaIT ₁₋₄₃₈	73910	50858,8	5,85
MaIT ₁₋₃₈₀	55920	44120,2	6,09
MaIT ₁₋₃₃₃	44920	38963,3	6,50
MaIM ₂₇₋₂₂₅	14440	22159,9	6,14
MaIM ₂₇₋₃₀₆	15930	30340,2	6,72
MaIM ₂₅₂₋₃₀₆	1490	5862,5	6,09
MaIQ ₁₋₆₈₈	168680	78886,7	6,10

3.19 Konzentrierung von Proteinen

Für verschiedene Experimente – insbesondere für die Kristallisation – waren Lösungen mit hoher Proteinkonzentration notwendig. Dazu wurde das gereinigte Protein zunächst zweimal gegen den gewünschten Puffer dialysiert und die Lösung mittels einer Konzentratoreinheit (Vivaspin) mit einer geeigneten Ausschlussgröße (10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4 °C, 2.500 g) auf ein der jeweiligen Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiertes Protein wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt abgetrennt (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 4 °C, 5 min, 13.000 rpm) und der Überstand abgenommen. Die finale Konzentration der Probe wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm verifiziert. Um die Unversehrtheit der Ultrafiltrationsmembran sicherzustellen, wurde auch der Proteingehalt des Filtrats untersucht. War die erwünschte Proteinkonzentration erreicht, wurde die Lösung bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.20 Massenspektrometrie

Die Proteinproben (100 µl mit einer Konzentration von 1 mg/ml) wurden dreimal über Nacht bei 4 °C gegen 10 mM Ammoniumacetat (pH 6,8 stellt sich automatisch ein) dialysiert, um an die Proteine gebundene Ionen abzutrennen. Anschließend wurden 1/2 des Volumens an 20 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Ameisensäure zugegeben. Die Analysen wurden an einem maXis Q-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ausgestattet mit einer ESI Quelle (Kapillarspannung: 4,5 kV; Endplatten Offset: -500 V; Vernebelungsdruck: 0.4 bar; Trockengasflussrate: 4,0 L/min; Trockentemperatur: 180 °C) durchgeführt. Die Rohdaten wurden mit der Compass Data Analysis Software (Version 4.0) analysiert und dekonvuliert. Das beobachtete m/z Verhältnis lag im Bereich von 500 bis 3000, während die beste Auflösung zwischen 500 und 1500 erzielt wurde. Zur Kalibrierung wurde die Electrospray Calibrant Lösung verwendet.

3.21 ATPase Assay

Die Fraktionen der Größenausschlusschromatographie, die das entsprechende MalT-Fragment enthielten, wurden vereinigt und anschließend auf 4 mg/ml konzentriert. Zur Herstellung des Assaypuffers wurden 0,1 mg/ml BSA, 2,5 µg/ml Laktatdehydrogenase, 2,5 µg/ml Pyruvatkinase, 1 mM ATP, 2 mM Phosphoenolpyruvat und 0.2 mM NADH in einem Puffer gelöst, der aus 20 mM HEPES/Na pH 7,5, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT und 0,1 mM ATP bestand. In einigen Experimenten wurde 1 mM Maltotriose zu den Ansätzen gegeben. Um den Assay durchzuführen, wurden 0, 25, 50 oder 75 µl der MalT-Lösung in

einem Gesamtvolumen von 250 μl Assay-Puffer in einer 96 Well Platte vermischt und für 3 h bei 22 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Alle 10 Minuten wurde durch den Hamilton Micro Lab Star Plus Roboter ein NADH Absorptionsspektrum von 220 bis 400 nm gemessen.

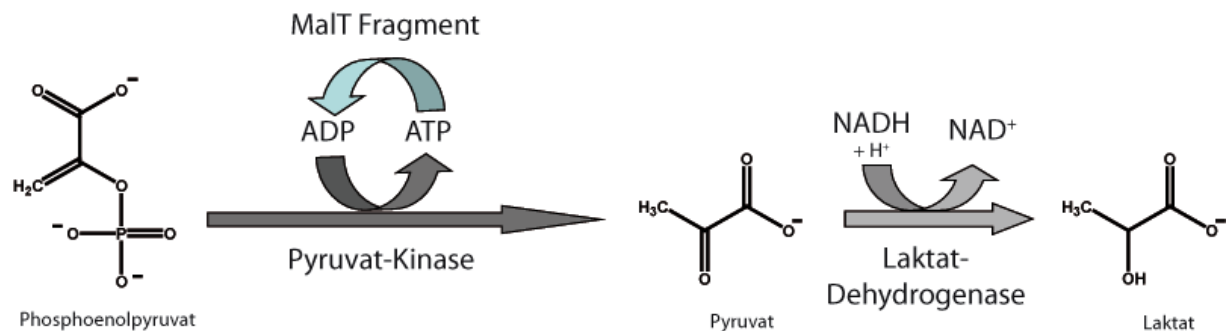


Abbildung 7: Prinzip des angewendeten ATPase Assays. Über die Abnahme der Absorption bei 339 nm kann auf die ATPase-Aktivität von MalT geschlossen werden.

3.22 Erstellung eines *E. coli* Zellextraktes zur Stabilisierung von MalT-Fragmenten

Es wurde eine Kultur eines *E. coli* BL21 Stammes in 2 L LB Medium für 6 Stunden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 8 min, SLA-3000) sedimentiert und in 18 ml 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl resuspendiert. Nach dem Zellaufschluss durch French Press und anschließender Zentrifugation (1 Stunde, 17.000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, SS-34) wurde der Überstand für 1 Stunde bei 95 $^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad inkubiert, um Proteasen und andere Protein zu inaktivieren. Die Lösung wurde zweimal durch Filtration mit einem 0,2 μm Filter sterilisiert. Von dieser Lösung wurden unterschiedliche Volumina zu 100 μl einer 1 mg/ml Proteinlösung der zu stabilisierenden Probe (durch Affinitätschromatographie gereinigte MalT-Fragmente) gegeben und das Laufverhalten auf der SEC-Säule beobachtet.

3.23 Thermofluor Assay

Die Erfolgswahrscheinlichkeit von Proteinkristallisationsexperimenten hängt stark von der Homogenität, Stabilität und Löslichkeit der Proteinprobe ab. Die Optimierung dieser Parameter sollte also die Chancen einer erfolgreichen Kristallisation erhöhen. Die Methode des Thermofluor Assays (US Patent 6,020,141 von Pantoliano *et al.*) erlaubt dabei die schnelle Identifizierung einer Pufferzusammensetzung mit stabilisierendem Effekt, indem die durch Erhitzen bewirkte Schmelztemperatur des untersuchten Proteins in verschiedenen Puffersystemen und unter Zugabe verschiedener Additive bestimmt wird. Das Prinzip dieser

Methode beruht darauf, dass die Entfaltung von Proteinen zu einer verstärkten Exposition hydrophober Bereiche führt. Der Fluorophor liegt dabei in wässriger Lösung in gequenchtem Zustand vor. Bindet er dagegen an die neu exponierten hydrophoben Bereiche des sich entfaltenden Proteins, verringert sich das Quenching und es resultiert eine Zunahme der Fluoreszenz. In Folge dessen lässt sich die Entfaltung in Abhängigkeit von Pufferbedingungen und Temperatur messen. Die Schmelztemperatur T_M ist dabei als Mittelpunkt der Temperatur der Proteinentfaltung definiert und korreliert gut mit der über andere thermische Entfaltungsmethoden - z.B. Circular Dichroismus (CD) oder Differential Scanning Calorimetry (DSC) - bestimmten T_M (Ericsson *et al.*, 2006).

Zur Durchführung der Thermofluor-Experimente wurden 96 Puffer-Bedingungen ausgewählt, die einen größeren Bereich an pH-Werten abdecken und Additive enthalten, die vermutlich einen stabilisierenden Effekt auf MalT-Fragmente haben könnten (Tabelle 15). Zur Durchführung des eigentlichen Thermofluor-Experiments wurden 12,5 μ l Puffer, 5 μ l einer 2,5 mg/ml Lösung des MalT-Fragments und 7,5 μ l 300 x SYPRO® Orange in eine dünnwandige 96 Well PCR Platte gegeben. Die Platte wurde mit Optical-Quality Sealing Tape verschlossen und in einem iCycler iQ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) in 0,2 °C Schritten von 20 °C auf 95 °C erhitzt. Dabei wurde die Fluoreszenzänderung bei Wellenlängen von 490 nm (Anregung) und 575 nm (Emission) mit einer *charge-coupled device* (CCD) Kamera gemessen. Die jeweilige Schmelztemperatur wurde durch den Fit mittels eines Boltzmann Modells mithilfe der Software Kaleidagraph™ (Tellinghuisen, 2000) bestimmt.

$$I = A + \frac{(B-A)}{1 + e^{(T_M - T)/C}} \quad (2)$$

I steht dabei für die Fluoreszenzintensität bei einer Temperatur T, A und B für die *pretransitional* und *posttransitional* Fluoreszenzintensitäten und C für den Steigungskoeffizienten.

3.24 Methylierung von Lysin Resten

Die Methode der reduktiven Methylierung von Lysin Resten wurde eingesetzt, um die Löslichkeit von Proteinen zu erniedrigen. Lysin-Reste, die zwei- oder dreifach methyliert vorliegen, zeigen eine deutlich geringere Löslichkeit in wässrigen Puffern als die entsprechenden primären Amine (Walter *et al.*, 2006). Derartige Veränderungen der Proteinoberfläche können zur Bildung anderer bzw. stabilerer Kristallpackungen als für das native Protein führen. In manchen Fällen kann so auch die Kristallisationswahrscheinlichkeit insgesamt erhöht werden (Means & Feeney, 1968; Rauert *et al.*, 2007).

Zur Durchführung der Methylierung wurde zuerst die entsprechende Proteinprobe über Nacht bei 4 °C gegen einen Puffer aus 20 mM HEPES/Na pH 8,0 und 150 mM NaCl

dialysiert, um sicherzustellen dass sich kein Tris mehr im Puffer befindet. Anschließend wurde die Probe - falls nötig - soweit eingeeengt, dass die Protein-Konzentration 2,5 mg/ml betrug. Von dieser Lösung wurden jeweils 10 ml in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt und zwei Zyklen der folgenden Prozedur unterzogen: 1. Es wurden 800 μ l 3 % (w/v) Formaldehyd-Lösung zugesetzt. 2. Die Lösung wurde durch viermaliges kurzes Vortexen vermischt. 3. Es wurden 400 μ l einer 58 mg/ml Dimethylaminoboran (DMAB) Lösung zugegeben. 4. Die Lösung wurde erneut durch viermaliges Vortexen vermischt. Nach dem ersten Zyklus wurde die Probe für eine Stunde auf Eis gelagert. Nach dem zweiten Zyklus wurde die Proteinlösung über Nacht bei 4 °C gegen SEC Puffer dialysiert und durch SEC gereinigt, um überschüssiges DMAB und Formaldehyd abzutrennen.

3.25 Verdau von Protein mit der SUMO Protease

Um das Expressionslevel bzw. die Löslichkeit einiger, insbesondere sehr kleiner Proteine zu erhöhen, wurde ein Plasmid konstruiert, das für ein N-terminales His₆-Affinitätsanhängsel, den *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) sowie das Zielprotein kodiert. Denn es ist gezeigt worden, dass sich sehr kleine Proteine und Peptide nur schlecht in Bakterienkulturen produzieren lassen bzw. schnell wieder abgebaut werden (Cheng *et al.*, 2003; Li, 2011). Durch Kopplung mit einem gut löslichen Fusionspartner lässt sich jedoch die Ausbeute drastisch erhöhen (Bell *et al.*, 2013). Besonders gut geeignet erscheint hier das SUMO Protein, dessen dreidimensionale Struktur durch SUMO-Protease Ulp1 erkannt wird und so leicht während der Reinigung wieder vom Zielprotein abgespalten werden kann (Mossessova & Lima, 2000; Wang *et al.*, 2010). Das Fusionskonstrukt wurde nach der Affinitätschromatographie über Nacht bei 4 °C gegen SEC Puffer dialysiert, um das für die SUMO-Protease störende Imidazol zu entfernen. Anschließend wurden 5 ml 2 mg/ml SUMO-Protease zu den gesammelten und dialysierten IMAC-Fraktionen gegeben und die Lösung über Nacht bei 22 °C zum Verdau inkubiert. Danach wurde die Probe erneut auf die IMAC-Säule aufgetragen, um SUMO und Zielprotein voneinander zu trennen. Das gewünschte Protein befand sich nun im Durchlauf der IMAC und wurde über Nacht bei 4 °C gegen einen geeigneten Puffer dialysiert.

3.26 Glucoseoxidase/Peroxidase Assay der Amylomaltase

Die Fraktionen der SEC (in einem Puffer aus 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 2 mM BME), die das MalQ Protein enthielten, wurden vereinigt. Anschließend wurde in SEC Puffer gelöstes TCEP dazugegeben, sodass die finale Konzentration 2 mM betrug. Nun wurde die Lösung soweit eingeeengt, dass die Proteinkonzentration 0,8 mg/ml betrug. Es wurden 2 mg/ml p-Hydroxybenzoesäure und 0,1 mg/ml Aminoantipyrin in 200 mM Natrium

Phosphate Puffer pH 7,2 gelöst. Ebenso wurden 30 U Glucoseoxidase (GOD) und 6 U Peroxidase (POD) in 1 ml 200 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,2 gelöst. Außerdem wurden auch jeweils 100 mM der Zucker Maltose, Maltotriose bzw. Acarbose in SEC Puffer gelöst. Für die Erstellung des Reaktionsansatzes wurde 500 μ l der Zucker Lösung (für einige Experiment wurden zusätzlich 10 μ l einer 100 μ M Maltotriose Lösung in SEC Puffer zugegeben), 50 μ l GOD/POD mit 100 μ l der MalQ Lösung sowie 350 μ l SEC Puffer für mehrere Stunden bei 22 °C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß inkubiert und der mögliche Farbwechsel zu rot beobachtet. Die Bildung des roten Farbstoffs deutet darauf hin, dass sich Glucose gebildet hat. Für eine Positivkontrolle wurden 50 μ l einer 100 mM Glucose-Lösung zu einem Reaktionsansatz gegeben.

3.27 Enzymatischer Assay für MalQ

Die Fraktionen der SEC, die monomeres MalQ enthielten (in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 2 mM BME) wurden vereinigt. Dann wurde so viel einer 200 mM TCEP Lösung in SEC Puffer zugegeben, dass die finale Konzentration 2 mM betrug. Nun wurde das Protein soweit eingeeengt, dass die Protein-Konzentration bei 1,3 mg/ml lag. Die Zucker Maltose, Maltotriose und Acarbose wurden zu je 100 mM in SEC Puffer gelöst und es wurde eine 4 % (w/v) TCA in Wasser hergestellt. Außerdem wurde 10 mg/ml Dansylhydrazin in 99 % (v/v) Ethanol gelöst. Für den Assay wurden 100 μ l der jeweiligen Zuckerlösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben (bei einigen Experimenten wurde zusätzlich 1 μ l 100 μ M Maltotriose in SEC Puffer zugefügt), anschließend mit 1,5 μ l der MalQ Lösung versetzt und für 3 min bis 16 h bei 30 °C im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem MalQ durch einen drei minütigen Hitzeschock bei 95 °C denaturiert wurde. Durch anschließende Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 13000 rpm, 5 min) wurde das denaturierte Enzym sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 100 μ l der TCA-Lösung und 200 μ l der Dansylhydrazin-Lösung zugegeben und zur Bildung der Zuckerhydrazone für 10 min bei 80 °C inkubiert (Abbildung 8) (Avigad, 1977).

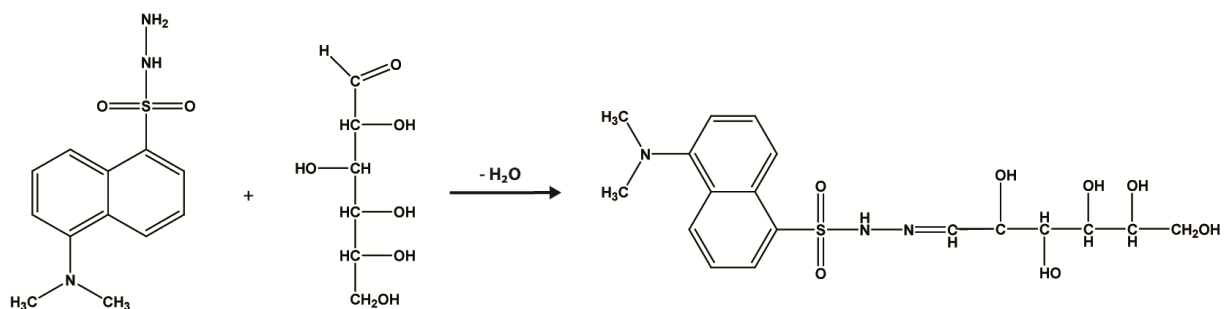


Abbildung 8: Dansylhydrazin-Kopplung. Die Kopplung eines reduzierenden Zuckers mit Dansylhydrazin zum Hydrazone am Beispiel von Glucose.

Die derivatisierten Zucker wurden bis zur HPLC Analyse weitestgehend vor Lichteinstrahlung geschützt und bei 4 °C gelagert.

3.28 HPLC von Maltodextrinderivaten

Die Auftrennung der durch den MalQ enzymatischen Assay erhaltenen Maltodextrine erfolgte durch eine HPLC. Dafür wurden 5 µl der jeweiligen Hydrason-Probe mit einem Puffer aus 10 % Acetonitril in 10 mM NH₄HCO₃ Puffer mit pH 8,5 auf eine VP 260/10 NUCLEODUR C18 Gravity Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten von 10 bis 30 % Acetonitril in einem 10 mM NH₄HCO₃ Puffer mit pH 8,5 über eine Laufzeit von 30 min. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 340\text{nm}$. Zur Kalibrierung der Säule wurden Glucose, Maltose und Maltotriose mit Dansylhydrazin gekoppelt und ihr Laufverhalten auf der identischen C18-Säule mit demselben Programm untersucht.

3.29 Kristallisation von Proteinen

Grundlage für die Röntgenstrukturanalyse sind Einkristalle ausreichender Größe und hoher Qualität. Die Züchtung solcher Proteinkristalle erfolgt aus strukturell homogenen übersättigten Proteinlösungen, in denen Nukleation und Kristallwachstum stattfinden können. Erreicht wird diese Übersättigung in Gegenwart eines Fällungsmittels durch allmählichen Entzug von Wasser. Die am häufigsten angewandte Technik zur Züchtung von Proteinkristallen ist die Dampfdiffusion. Hierbei wird einem Tropfen aus Protein/Fällungsmittelgemisch Wasser entzogen, indem er über einem Reservoir mit höherer Fällungsmittelkonzentration inkubiert wird. Leider ist Proteinkristallisation bisher nicht vorhersagbar, weshalb eine große Anzahl an Versuchen nötig ist, um gut streuende Proteinkristalle zu erzielen (Rupp, 2010).

Die Proteinfractionen der Gelfiltration wurden über Nacht bei 4 °C gegen einen geeigneten Puffer dialysiert. Bei Proteinen mit freien Cysteinresten wurde der Puffer mit 2 mM TCEP versetzt. Die Proteinlösung wurde anschließend konzentriert, um die gewünschte Proteinkonzentration einzustellen. Eventuelles Proteinaggregat wurde kurz vor der Kristallisation durch Zentrifugation (5 min, 13.0000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Um initiale Kristallisationsbedingungen zu identifizieren wurden sogenannte Vector-Screens mit insgesamt 480 Reservoirbedingungen verwendet. Diese Bedingungen leiten sich aus früheren erfolgreichen Kristallisationsexperimenten ab. Mithilfe eines "Tecan Evo" Roboters (Tecan) wurden dazu 100 µl der jeweiligen Reservoirlösung in die Reservoirvertiefung einer Greiner 96-Well Platte gegeben. Anschließend wurden 200 nl Proteinlösung mit 200 nl Reservoirlösung in einem sitzenden Tropfen vermischt. Die Platten wurden anschließend mit einer Kunststoffolie verschlossen und bei 20 °C oder 4 °C gelagert. Die Tropfen wurden in

regelmäßigen Intervallen unter dem Lichtmikroskop auf Präzipitat- und Kristallbildung überprüft. Für die Kristallisation von MalT-Fragmente wurde teilweise ADP, ATP oder das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon AMPPNP in einer Konzentration von 2 mM zu der Proteinlösung gesetzt. Zu den Kristallisationsansätzen von MalQ wurden in einigen Fällen 2 mM Maltotriose oder 2 mM des Inhibitors Acarbose zugegeben. Für die Kristallisation von MalM wurden teilweise 2 mM Maltose zu den Ansätzen zugefügt.

Vielversprechende Bedingungen aus den Vector-Screens wurden manuell in Ansätzen mit hängenden Tropfen verfeinert. Dazu wurden 24-Wellplatten mit 1 ml Reservoirlösung verwendet. Üblicherweise wurde eine Matrix aus Fällungsmittelkonzentration und pH-Wert um die Originalbedingung gewählt. Um die Ansätze luftdicht zu verschließen, wurde eine viskose Mischung aus Vaseline und Mineralöl auf den Rand des Wells gestrichen. Für die Kristallisation wurden 1 μ l Proteinlösung mit 1 μ l Reservoirlösung auf einem silanisierten Deckgläschen vermischt und kopfüber auf dem Well platziert, um den hängenden Tropfen in einer geschlossenen Atmosphäre zu inkubieren. Die Platten wurden ebenfalls bei 20 °C oder 4 °C inkubiert und der Fortschritt der Kristallisationsexperimente regelmäßig überprüft.

3.30 Röntgenbeugungsexperimente

Röntgenbeugung ist eine leistungsfähige, zerstörungsfreie Methode zur strukturellen Charakterisierung kristalliner Materialien (Bunaciu *et al.*, 2014). Sie beruht auf der Interaktion des elektromagnetischen Feldvektors E der Röntgenstrahlen mit den Elektronen der zu untersuchenden kristallinen Probe. Die Streuung der Röntgenstrahlen erfolgt dabei in alle Richtungen und die Streuungsstärke ist proportional zu der Anzahl der Elektronen eines Atoms. Die Intensität der gestreuten Strahlung ist jedoch für einzelne Moleküle so gering, dass sie mit heutigen Detektoren nicht messbar ist (Rhodes, 2010). Durch die regelmäßige Anordnung der Probenmoleküle innerhalb eines Kristallgitters verstärkt sich die Beugung und führt gemäß der Braggschen Gleichung, in Abhängigkeit des Beugungswinkels, zu diskreten Beugungsmaxima. Die Braggsche Gleichung beschreibt, unter welchen Bedingungen es zu konstruktiver Interferenz der gestreuten Wellen kommt (Bragg, 1913). Sobald die zurückgelegte Strecke zweier Wellen einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge entspricht, ist die Phase der beiden gebeugten Wellen identisch und ihre Amplituden addieren sich. Weil die Gesamtbeugung durch einen Kristall in einer bestimmten reziproken Gitterrichtung proportional zur Summe aller an der Beugung beteiligten Elemente ist, trägt jedes Atom des kristallisierten Moleküls in der Einheitszelle zu jedem Reflex des Diffraktionsbildes bei. Der Strukturfaktor beschreibt hierbei die Gesamtheit des Streuvermögens der kleinsten sich periodisch wiederholenden Einheit von Atomen des Kristalls (Messerschmidt, 2007). Die Reflexintensität wird allerdings durch positionelle

Verschiebung der Atome um ihre mittlere Position geschwächt. Diese Schwächung wird durch den B-Faktor beschrieben.

Eine anschauliche Darstellung der Braggschen Gleichung bietet die Ewald-Kugel (Ewald, 1969). Reflexe treten demnach nur auf, wenn ein reziproker Gitterpunkt auf der Ewald-Kugel zu liegen kommt. Durch kontinuierliche Drehung des Kristalls mittels eines Goniometers schneiden jedoch nach und nach alle reziproken Gitterpunkte die Ewald-Kugel und können als Reflex detektiert werden. Um den gesamten reziproken Raum abzubilden, werden bei kontinuierlicher Rotation des zu untersuchenden Kristalls mehrere Diffraktionsbilder gesammelt, die anschließend zu einem kompletten Datensatz zusammengefügt werden.

Während eines Beugungsexperiments kann allerdings nur die Amplitude des Strukturformfaktors gemessen werden, denn sie ist direkt proportional zur Intensität des gemessenen Reflexes. Dadurch dass es keine Möglichkeit gibt aus dem Beugungsbild auf die Phase der Welle zu schließen, fehlen wichtige Informationen, um die Position der Elektronen in der Einheitszelle zu rekonstruieren. Diese Tatsache wird als Phasenproblem der Kristallographie bezeichnet und kann durch verschiedene Methoden, wie *multiple isomorphous replacement* (MIR), *single wavelength anomalous dispersion* (SAD), *multiple wavelength anomalous dispersion* (MAD) oder *molecular replacement* (MR) gelöst werden (Rupp, 2010).

In dieser Arbeit wurde ein MAD Experiment zur Lösung des Phasenproblems durchgeführt. Trifft Röntgenstrahlung auf Elektronen, so wird sie normalerweise elastisch gestreut. Entspricht die Energie eines elektronischen Übergangs in einem der Atomorbitale allerdings genau der Energie der Röntgenstrahlung, kommt es zu Absorptionseffekten bei kernnahen Elektronen. Misst man die Diffraction eines Kristalls bei verschiedenen Wellenlängen, so ändern sich aufgrund der anomalen Streuung die Intensitäten bestimmter Reflexe abhängig von der Wellenlänge. Diese Intensitätsunterschiede sind dann besonders hoch, wenn ein Diffractionsexperiment bei einer Wellenlänge nahe eines elektronischen Übergangs des jeweiligen Elements durchgeführt wird. Eine weitere Folge der anomalen Streuung ist, dass die Zentrosymmetrie des reziproken Raumes gebrochen wird. Somit sind die Intensitäten eines Friedels Paares F_h und F_{-h} nicht mehr identisch und es ergeben sich daraus die sogenannten Bijvoet Differenzen. Diese charakteristische anomale Streuungsdifferenz kann dazu verwendet werden, die Position der anomalen Streuzentren im Kristall zu bestimmen. Ausgehend von dieser Substruktur können die Phasen für alle Reflexe bestimmt werden und somit die Struktur gelöst werden (Hendrickson, 1991; Hendrickson & Ogata, 1997; Hendrickson, 2000).

Das Energieniveau der elektronischen Übergänge in den leichten Atomen biologischer Makromoleküle (H, C, N, O, S und P) liegt aber nicht in dem Bereich der Röntgenstrahlung (etwa 12.000 eV oder 1 Å) und daher kommt es bei Röntgenbeugungsexperimenten an "normalen" Proteinkristallen mit einer "üblichen" Röntgenstrahlungs-Wellenlänge auch nicht

zu signifikanter anomaler Streuung. Da die Absorptionskante des Selens (λ etwa 0,98 Å) in einem Bereich liegt, der durch Synchrotron-Röntgenstrahlung erreicht werden kann (Doublet, 1997), wurde ein Selenomethionin-Derivat von MalQ kristallisiert. Von diesem Proteinkristall wurden vier Datensätze gesammelt: ein *low-energy remote* ($\lambda = 0,9821$ Å), ein *peak* ($\lambda = 0,9798$ Å), ein *inflection point* ($\lambda = 0,9800$ Å) und ein *high-energy remote* ($\lambda = 0,9786$ Å) Datensatz.

Die Röntgenbeugungsexperimente zum Testen der Qualität der Proteinkristalle und Eigenschaften der Cryoprotektionsmittel wurden an der Rigaku Heimanlage durchgeführt. Die Röntgenbeugungsdiffraktionsdaten zur Lösung der Amylomaltase-Strukturen wurden an den Beamlines 14.1 und 14.2 des BESSY Synchrotrons gesammelt (Berlin, Germany) (Mueller *et al.*, 2012).

3.31 Auswertung von Röntgenbeugungsdaten

Die Datensätze wurden mit dem XDSAPP Paket indiziert, integriert (Krug *et al.*, 2012) und anschließend mit XSCALE skaliert (Kabsch, 2010). Die Phasen der Datensätze der MalQ Struktur mit Acarbose wurden mithilfe des Programms HKL2MAP (Pape & Schneider, 2004) bestimmt. Das Ausgangsmodell der Proteinstruktur wurde mit der Software BUCCANEER (Cowtan, 2006) gebaut. Das Phasenproblem der MalQ-apo und MalQ•Maltose Datensätze wurden durch *molecular replacement* (MR) mit den Koordinaten der MalQ•AGA Struktur mithilfe der Software PHASER (McCoy *et al.*, 2007) gelöst.

Der sogenannte Matthews-Koeffizient V_M gibt an, wie groß das Kristallvolumen pro Einheit an Proteinmolekulargewicht in einem Proteinkristall ist (Matthews, 1968).

$$V_M = \frac{V}{n \cdot m} \quad (3)$$

Dabei bezeichnet V das Volumen der Einheitszelle, n gibt an wie viele Monomere in der asymmetrischen Einheit vorkommen und M steht für das Molekulargewicht des Proteins. Nimmt man an, dass alle Proteine ein spezifisches Volumen von $0,74 \text{ cm}^3/\text{g}$ aufweisen (Quillin & Matthews, 2000; Perkins, 1986), kann man aus dem V_M Wert den Lösungsanteil eines Proteinkristalls berechnen. Durch Untersuchungen in den Jahren 1968 und 1976 konnte Brian W. Matthews zeigen, dass sich V_M in einem Bereich von etwa $1,68 \text{ Å}^3/\text{Da}$ bis $3,53 \text{ Å}^3/\text{Da}$ bewegt und damit der Anteil des Lösungsmittels etwa 27 bis 78 % beträgt (Matthews, 1968; Matthews, 1976). Am häufigsten tritt dabei ein Lösungsanteil um etwa 43 % auf (Kantardjieff & Rupp, 2003). Dies gilt insbesondere für annähernd globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von unter 70 kDa. Matthews konnte des Weiteren zeigen, dass der Lösungsanteil unabhängig vom Volumen des Proteinkristalls ist und vermutete, dass er mit steigendem Molekulargewicht des kristallisierten Proteins zunimmt. Spätere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass der Einfluss des

Molekulargewichts nur minimal ist und der V_M Wert hauptsächlich mit der Auflösung korreliert (Kantardjieff & Rupp, 2003). Je höher die Packungsdichte im Proteinkristall ist, desto besser ist die Streuqualität des Kristalls.

Sind also für einen Proteinkristall Raumgruppe, Achsenlängen und Molekulargewicht des Proteins bekannt, kann man abschätzen wie viele Moleküle (n) sich in der asymmetrischen Einheit befinden. Dabei werden die erhaltenen V_M -Werte mit denen anderer Proteinkristalle verglichen, um so eine Wahrscheinlichkeit für die Anzahl an Monomeren in der asymmetrischen Einheit zu erhalten.

3.32 Struktur-Verfeinerung

Das Ausgangsmodell wurde durch manuelles Anpassen an die Elektronendichtekarten mithilfe des Programms COOT verbessert (Emsley *et al.*, 2010). Durch die Software REFMAC5 (Vagin *et al.*, 2004; Murshudov *et al.*, 2011) wurden die Strukturen durch Zyklen eines Maximum-Likelihood-Refinement unter Berücksichtigung von TLS-Gruppen (Translation, Libration, Screw-axis) automatisch evaluiert und verbessert. Die Auswahl der TLS-Gruppen wurde durch den TLSMD-Server unterstützt (Painter & Merritt, 2006). Die verfeinerten Strukturmodelle wurden mittels COOT und MolProbity (Davis *et al.*, 2007) evaluiert. Für Strukturvergleiche wurden ähnliche Proteinstrukturen mittels DALI-Server (Holm & Rosenström, 2010) oder PDBeFold-Server (Krissinel & Henrick, 2004) ermittelt. Abbildungen der Proteinstrukturen wurden mithilfe der Software PyMOL erstellt (DeLano, 2002). Die Sekundärstrukturelemente der MalQ-Strukturen wurden mittels des DSSP-Algorithmus bestimmt (Kabsch & Sander, 1983).

3.33 Monte Carlo Simulation der MalQ Reaktion

Zur Simulation der MalQ Reaktion wurde mithilfe der Software Turbo Pascal 7.0 (Borland, Austin, TX, USA) ein Computerprogramm geschrieben (siehe Anhang). Zu Beginn der Simulation wurde ein Array aus 1000 Substratmolekülen, z.B. Maltose oder Maltotriose, definiert. Aus diesem Array wurden ein Donormolekül sowie eine seiner glycosidischen Bindungen zufällig ausgewählt. Anschließend wurde ein Akzeptormolekül ebenfalls zufällig ausgewählt. Daraufhin wurde die MalQ Reaktion simuliert, indem die Anzahl der respektiven Donor- und Akzeptormoleküle um jeweils 1 erniedrigt wurde, während die Anzahl der beiden gebildeten Produkte um jeweils 1 erhöht wurde. Da Glucose keine glycosidische Bindung enthält, ist es verboten, dass sie als Donormolekül ausgewählt wird. Mit dieser Methode wurde eine Abfolge von einer Million MalQ Reaktionen durchgeführt, um das Erreichen des Gleichgewichtszustands zu simulieren.

3.34 Statistische Simulation der MalQ Reaktion

Die Maltodextringleichgewichtskonzentrationen wurden auch mithilfe einer Kreuztabelle berechnet, indem alle möglichen MalQ Reaktionen bis zu Maltodecaose in der Software MS Office Excel 2007 (Microsoft, Redmont, WA, USA) tabelliert wurden. Aus praktischen Gründen wurde das Set der Akzeptor- und Donormoleküle auf eine maximale Länge von 10 Glucose-Einheiten begrenzt. Der Angriff jeder glycosidischen Bindung innerhalb eines Donoroligosaccharids wurde als gleichwahrscheinlich betrachtet, nur für Glucose als Donormolekül wurde keine Reaktion angenommen. In jeder Zelle der Kreuztabelle wurde die Maltodextrinkonzentration als mathematisches Produkt der Donor- und Akzeptorkonzentration dividiert durch die Anzahl der glycosidischen Bindungen des Donormoleküls berechnet (um so die gleichmäßige Verteilung der möglichen Reaktionsprodukte zu gewährleisten). Die sich ergebenden Maltodextrinproduktkonzentrationen wurde für jede Kettenlänge aufsummiert. Diese Summen dienten dann als Startkonzentration für eine weitere Berechnungsrunde. Die finalen Gleichgewichtskonzentrationen wurden nach 10 Wiederholungen erhalten.

4 Ergebnisse

4.1 Strukturelle und funktionelle Analyse des Regulators MaT

4.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von MaT und MaT-Fragmenten

Der Regulator MaT ist mit 901 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 103 kDa ein relativ großes Protein. Das gesamte Protein zu kristallisieren ist verhältnismäßig schwierig, da es aus mehreren Domänen aufgebaut ist, deren Orientierung zueinander möglicherweise sehr flexibel ist. Neben dem Vollängen MaT wurden daher auch verkürzte Fragmente von MaT produziert, um so die Chance einer erfolgreichen Kristallisation zu erhöhen. Der strukturell interessanteste Teil von MaT ist seine N-terminale NOD-Domäne, da sie für die regulatorischen Eigenschaften von MaT am wichtigsten ist. Folglich wurden mehrere verkürzte MaT Varianten mit C-terminalem Affinitätsanhängsel kloniert, die alle die N-terminale NOD beinhalten. Die Festlegung der Domänengrenzen erfolgte anhand der bereits bekannten Kristallstruktur der Sensordomäne (Aminosäuren 437 bis 806) und von MaT-Strukturmodellen. Das Strukturmodell für die NOD- und Arm-Domäne (MaT₁₋₄₃₆) wurden mittels des SWISS-MODEL Servers (<https://swissmodel.expasy.org>; (Biasini *et al.*, 2014)) berechnet. Die humane APAF-1 Struktur (PDB code 1Z6T; (Riedl *et al.*, 2005)) wurde dafür als Referenzstruktur gewählt, da es bei einer sequenzbasierten Suche mithilfe des HHpred Servers (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>; (Meier & Soding, 2015)) als ähnlichste Struktur ermittelt wurde. Die Aussagekraft dieses Modells ist allerdings begrenzt, da beide Strukturen lediglich 5,3 % identische und 14,5 % ähnliche Aminosäureseitenketten im genannten Bereich haben.

Um Interaktionen mit Malk, MaY und AES besser untersuchen zu können und die Affinitätsreinigung von Komplexen zu ermöglichen, wurde ein C-terminaler *Strep*-tag II als Affinitätsanhängsel gewählt, während die Interaktionspartner jeweils ein His₆-Affinitätsanhängsel aufweisen. Folgende fünf Konstrukte wurden kloniert (siehe Abbildung 9): 1. Das Vollängen MaT (Aminosäuren 1 bis 901), 2. MaT ohne LuxR-Domäne (Aminosäuren 1 bis 806), 3. NOD mit Arm (Aminosäuren 1 bis 438), 4. NOD mit einem Teil des Arms (Aminosäuren 1 bis 380) und 5. NOD (Aminosäuren 1 bis 333).

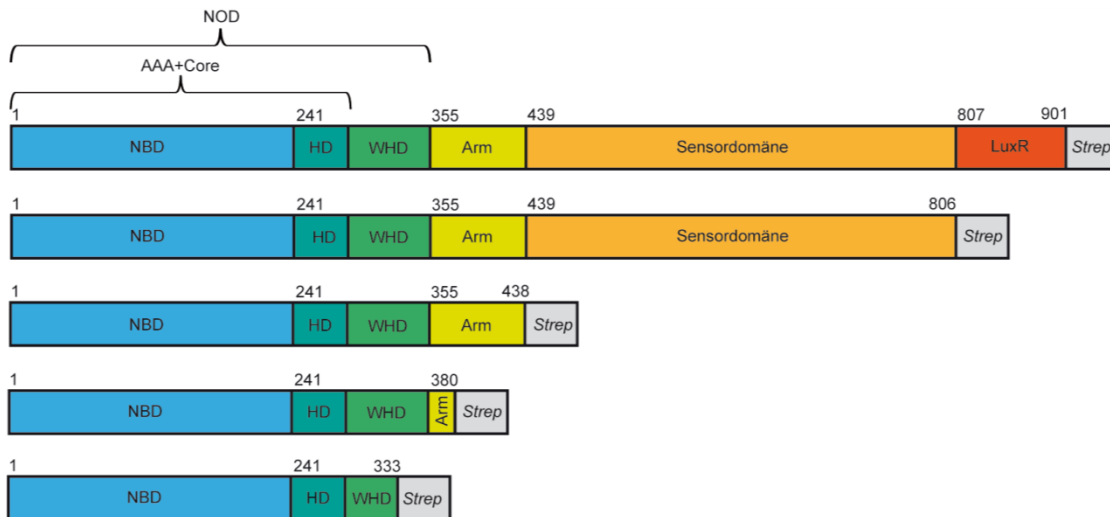


Abbildung 9: MaIT Konstrukte der ersten Generation. Der *Strep*-tag II ist nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Für die Amplifikation von *malT*- und *malT*-Fragmenten mittels PCR wurde der pOM2MaIT Vektor als Template verwendet. Das PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuklease *NdeI* geschnitten und das so erzeugte DNA-Insert anschließend in einen pASK75Strep Vektor, der zuvor mit *AfeI* und *NdeI* verdaut worden war, ligiert. Die MaIT-Fragmente wurden in *E. coli* BL21, unter Verwendung von LB-Medium, bei 22 °C, 30 °C und 37 °C für 6 Stunden produziert und ihr Expressionsverhalten anhand von SDS-PAGE analysiert. *E. coli* BL21 Stämme mit für das Vollängen MaIT kodierenden Plasmiden konnten nur bis zu einer OD_{550nm} von maximal 0,5 kultiviert werden. Selbst nach der Induktion mit aTc konnte keine signifikante Menge an MaIT produziert werden. Dies liegt vermutlich an der Kombination aus geringerer *E. coli* Wachstumsrate bei niedrigen Temperaturen und zusätzlichem Stress durch Aktivierung der *mal*-Gene durch überschüssiges MaIT. Dagegen ließen sich die vier verkürzten MaIT Konstrukte auch bei 22 °C und 30 °C in größeren Mengen produzieren. Es zeigte sich aber, dass alle Proteine überwiegend in Form von unlöslichen Einschlusskörpern gebildet wurden. Insbesondere MaIT₁₋₃₃₃ und MaIT₁₋₄₃₈ wurden praktisch ausschließlich als Einschlusskörper produziert. Um den größten Anteil an löslichem Zielprotein zu erzielen, wurde eine Expressionsstrategie mit *E. coli* BL21 in 4 L LB Medium für 6 Stunden bei 22 °C gewählt.

Für die anschließende Reinigung wurde das Zellpellet einer solchen Expression jeweils in 20 ml eines Puffers aus 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂ und 2 mM BME resuspendiert und über eine Streptactin-Affinitäts-Chromatographie (SAC) gereinigt (siehe Abbildung 10).

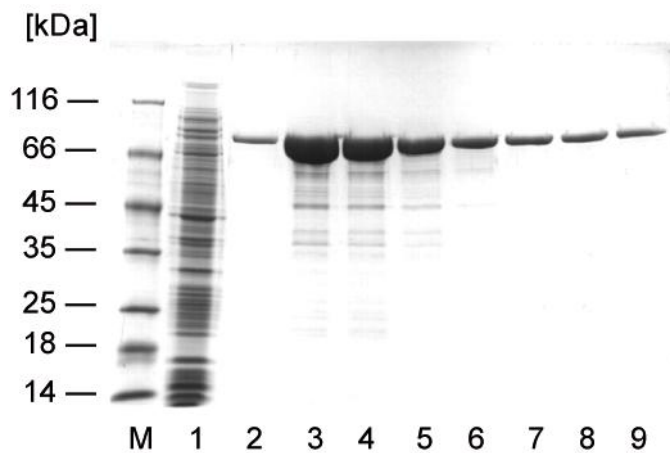


Abbildung 10: Streptactin-Affinitäts-Reinigung am Beispiel des MalT₁₋₈₀₆ Fragments. Spur 1: Durchlauf, Spuren 2 bis 9: Elutionsfraktionen, Spur M: Marker.

Nach SAC ergab sich eine Ausbeute von etwa 4 mg MalT₁₋₈₀₆ und MalT₁₋₃₈₀ pro Liter Expressionsmedium. Doch weder die Durchführung von Anionenaustausch- oder Kationenaustausch-Chromatographien in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂ und 2 mM BME noch von SEC in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl und 2 mM BME ermöglichten es monomeres MalT₁₋₈₀₆ oder MalT₁₋₃₈₀ zu reinigen. Vielmehr eluierten die Proteine bei der SEC vollständig im Ausschlussvolumen und lagen somit als lösliche Proteinaggregate vor. Interessanterweise zeigten diese löslichen Aggregate keine Bindung an das jeweilige Säulenmaterial der verwendeten Ionenaustauschsäulen, sondern befanden sich komplett im Durchlauf. Für die Konstrukte MalT₁₋₃₃₃, MalT₁₋₄₃₈ und MalT₁₋₉₀₁ konnte nach einer Expression in *E. coli* BL21 bei 22 °C (bzw. 37 °C für MalT₁₋₉₀₁) für 6 Stunden mit anschließender SAC unter gleichen Bedingungen kein lösliches Protein gereinigt werden.

Die *E. coli* BL21 Stämme, die mit den für das Volllänge MalT₁₋₉₀₁ kodierenden Plasmiden pASK75MalTF5 bzw. pOM2MalT transformiert worden waren, konnten in einem Schüttelkolben mit 2 L LB Medium nach der Induktion selbst bei Inkubation für 16 h bei 22°C nicht über eine OD_{550nm} von 0,5 kultiviert werden. Im Gegensatz dazu erreichten mit dem Plasmid pOM2MalT transformierte *E. coli* RD130 Stämme eine OD_{550nm} von 1,5. Obwohl das auf diese Weise produzierte MalT₁₋₉₀₁ keinen Affinitätstag besitzt, konnte es dennoch in einem Puffer aus 50 mM HEPES/Na pH 8,5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 10 % Glycerol über eine mit Ni²⁺-Ionen beladene Ida-Sepharose-Säule angereichert werden. Leider war es nicht möglich MalT₁₋₉₀₁ über eine AEX zu reinigen, da es trotz eines pI-Wertes von 6,0 in einem Puffer aus 20 mM HEPES pH 8,5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % Glycerin, 0,1 mM ATP und 2 mM BME keine Bindung an das Säulenmaterial zeigte. Daraufhin wurde eine SEC in 20 mM HEPES/Na pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % Glycerin, 0,1 mM ATP und 2 mM BME durchgeführt, aber leider co-eluierte MalT₁₋₉₀₁ mit praktisch allen Proteinverunreinigungen, die nicht über SAC und AEX abgetrennt werden konnten, in einem einzigen Peak (Abbildung 11). Es war daher wenig überraschend, dass die folgenden

Kristallisationsexperimente nicht erfolgreich waren. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Reinigung sowie der vermuteten hohen Flexibilität einhergehend mit geringen Erfolgsaussichten für die Kristallisation, wurden keine weiterführenden Versuche mit MalT₁₋₉₀₁ unternommen.

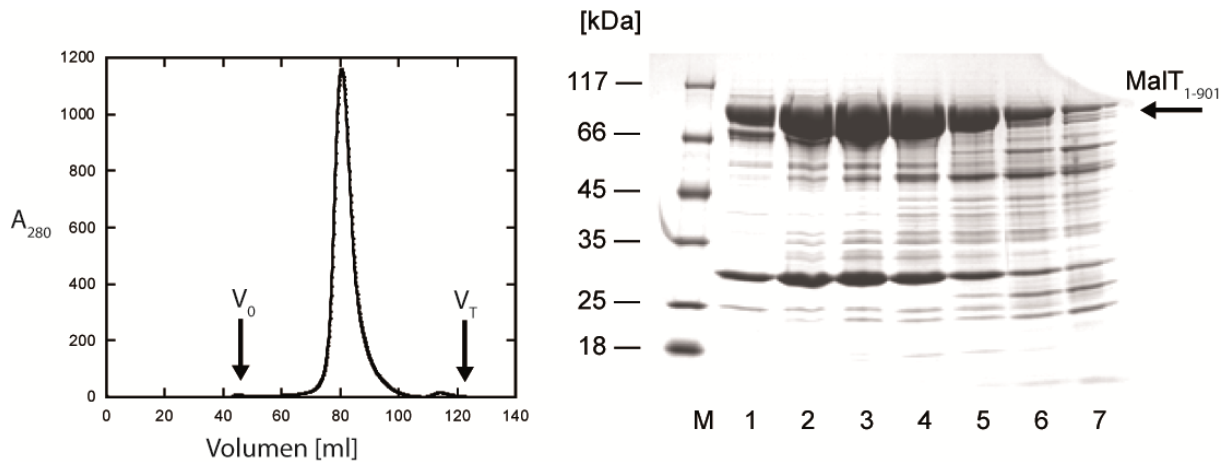


Abbildung 11: SEC von MalT₁₋₉₀₁. Absorptionsprofil und SDS-PAGE der SEC von MalT₁₋₉₀₁.

4.1.2 Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die Proteinstabilität

Löslichkeit und Stabilität eines Proteins sind Grundvoraussetzung für dessen Kristallisation. Diese Eigenschaften werden auch maßgeblich durch den Puffer beeinflusst. Um den Effekt unterschiedlicher löslichkeitsfördernder Additive auf MalT₁₋₈₀₆ zu testen, wurde das Protein nach SAC gegen verschiedene Puffer dialysiert. Getestet wurde zunächst die Zugabe von ATP, verschiedene Konzentrationen Betain, Saccharose und Glycerin sowie NaCl oder KCl, wobei der Anteil an monomeren MalT mittels analytischer SEC abgeschätzt wurde. Dialyse von MalT₁₋₈₀₆ gegen 50 mM Na-Malonat pH 5,0 führte zur vollständigen Präzipitation. Die Anwesenheit von ATP sorgte in allen getesteten Puffern für eine erhöhte Monomerausbeute an MalT₁₋₈₀₆. Weiterhin erhöhte die Anwesenheit von Glycerin, Saccharose sowie NaCl bzw. KCl-Konzentrationen von 500 mM signifikant den Anteil an monomeren MalT₁₋₈₀₆. Dagegen zeigten Maltose und Betain einen geringeren stabilisierenden Effekt. Am besten geeignet waren Puffer mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP, 2 mM BME und 7,5 % (v/v) Glycerin oder 225 mM Saccharose, in denen sich MalT₁₋₈₀₆ als Monomer stabil über einen Zeitraum von über einer Woche lagern ließ (siehe Abbildung 12). In diesen Puffern konnte das Protein auch über eine ResourceQ™-Anionenaustausch-Säule gereinigt werden. Hierbei ergaben sich zwei Elutionspeaks bei NaCl-Konzentrationen von etwa 225 bzw. 350 mM NaCl, wenn in einem Gradienten von 0 bis 500 mM NaCl eluiert wurde. Dabei zeigte die SDS-PAGE Analyse nur im zweiten Peak MalT₁₋₈₀₆ bzw. überhaupt eine Proteinspezies. Möglicherweise handelt es sich bei dem ersten der beiden

Elutionspeaks um Mono- oder Oligonukleotide, die aufgrund ihrer negativen Ladung ebenfalls an die Anionenaustausch-Säule binden können. Die anschließende Gelfiltration ergab ein identisches Elutionsverhalten von MalT₁₋₈₀₆ verglichen mit SEC Läufen direkt nach SAC und zeigte, dass MalT₁₋₈₀₆ vollständig und stabil als Monomer vorlag.

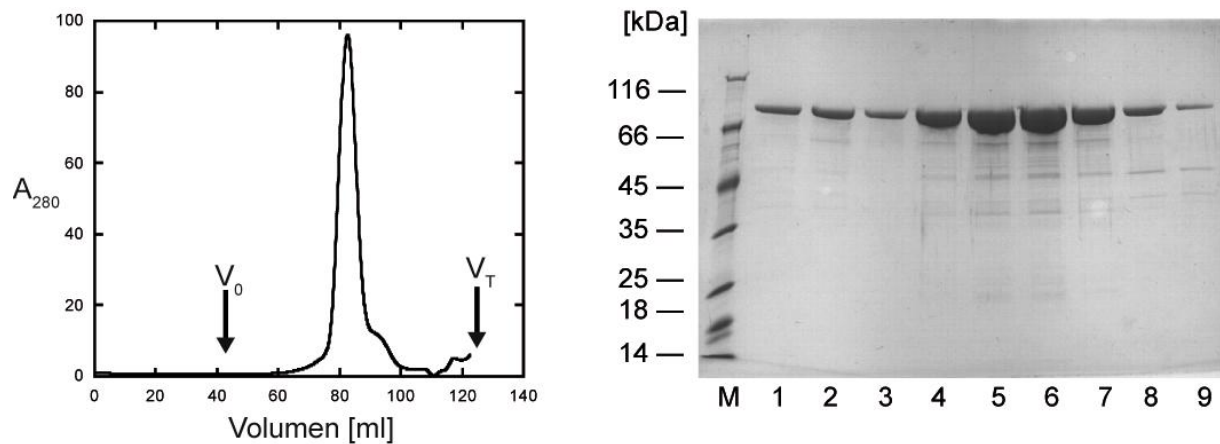


Abbildung 12: Größenausschluss-Chromatographie von MalT₁₋₈₀₆. Absorptionsprofil der SEC in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 7,5 % (v/v) Glycerin, 150 mM KCl, 0,1 mM ATP und 2 mM BME und SDS-PAGE Analyse der SEC Fraktionen von MalT₁₋₈₀₆.

Um eine mögliche Multimerisierung des Proteins zu untersuchen, wurde ein Teil des per SEC gereinigten Monomers mit 2 mM Maltotriose für 3 h bei 4 °C inkubiert und erneut eine SEC durchgeführt (siehe Abbildung 13). Da die MalT-Fragmente sich insgesamt als relativ instabil erwiesen, wurde die Probe bei 4°C und nicht bei einer höheren Temperatur mit Maltotriose inkubiert. Die Zugabe von Maltotriose bewirkte zwar eine leichte Verschiebung des Elutionsvolumens von 14,5 ml zu 13,7 ml auf einer analytischen Superdex 200 HR 10/300 Säule, diese entsprach aber lediglich einer Änderung des scheinbaren Molekulargewichts von 112 kDa (ohne Maltotriose) auf 143 kDa (mit Maltotriose). Diese Differenz von nur etwa 30 kDa ist viel zu gering, um als Beweis für die Multimerisierung von MalT interpretiert zu werden. Auch die Verbreiterung des Elutionspeaks deutet darauf hin, dass sich kein MalT-Multimer bildete. Für die Interpretation dieser Werte ist allerdings zu berücksichtigen, dass die K_D von monomerem MalT zu Maltotriose bei etwa 20 mM liegt (Dardonville & Raibaud, 1990) und die K_D zu ATP 0,4 mM beträgt (Richet & Raibaud, 1989). Die K_D für das oligomere, ATP-gebundene MalT liegt bei etwa 200 μ M (Schreiber & Richet, 1999). Somit sind die aus Kostengründen sehr niedrig gewählten ATP- sowie Maltotriosekonzentrationen möglicherweise nicht ausreichend, um eine Oligomerisierung von MalT₁₋₈₀₆ zu beobachten.

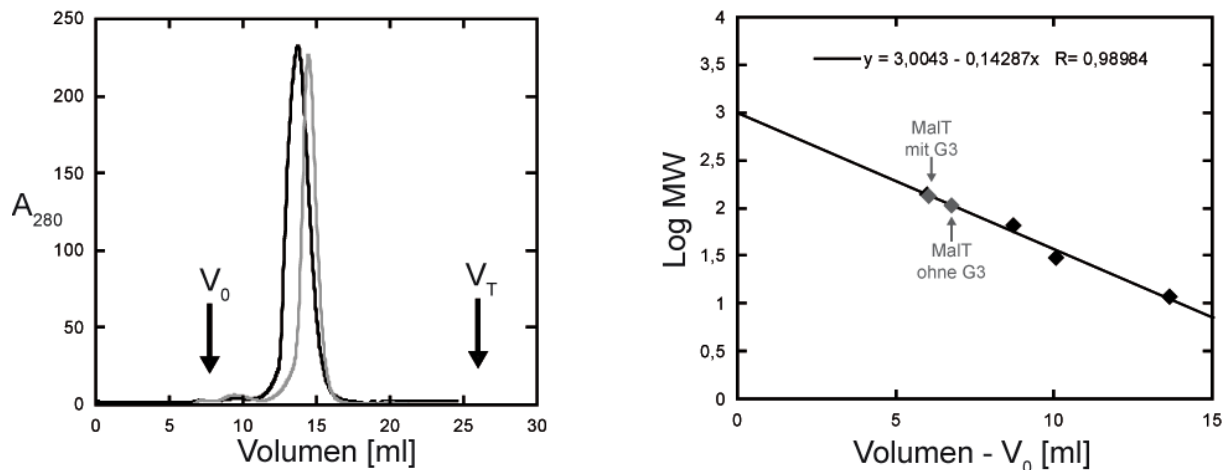


Abbildung 13: SEC von MaIT₁₋₈₀₆ mit und ohne Maltotriose. Absorptionsprofil der SEC von MaIT₁₋₈₀₆ in 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 10 % (v/v) Glycerin, 2 mM BME und 0,1 mM ATP nach Zugabe von Maltotriose (schwarz) und ohne Zugabe von Maltotriose (grau). Die rechte Teilabbildung zeigt die Bestimmung der apparenten Molekulargewichte im Vergleich zu Standardproteinen.

Nachdem MaIT₁₋₈₀₆ mit Glycerin oder Saccharose stabilisiert werden konnte, wurde auch das MaIT₁₋₃₈₀ Fragment nach SAC Reinigung gegen einen Puffer mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 7,5 % (v/v) Glycerin (oder 225 mM Saccharose), 150 mM KCl, 0,1 mM ATP und 2 mM BME dialysiert, um den Effekt auf die Stabilität des Fragments darin zu untersuchen. Auch MaIT₁₋₃₈₀ lag mit 225 mM Saccharose größtenteils als Monomer vor. Dagegen zeigte sich mit 7,5 % (v/v) Glycerin neben hauptsächlich monomerem Protein auch etwa 20 % Aggregat. Beide Puffer eigneten sich auch für die weitere Reinigung von MaIT₁₋₃₈₀ über AEX mittels ResourceQ™. Dabei eluierte MaIT₁₋₃₈₀ in einem einzigen Proteinpeak. Auch hier zeigten sich analog zu MaIT₁₋₈₀₆ zwei definierte Absorptionspeaks, von denen einer MaIT₁₋₃₈₀ entsprach und der andere vermutlich mitgereinigten Nukleotiden.

Nachdem die MaIT₁₋₃₈₀ und MaIT₁₋₈₀₆ Fragmente zumindest zu Teilen löslich exprimiert und gereinigt werden konnten, jedoch bei der Dialyse gegen physiologische Standardpuffer zur Aggregation neigten, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, ob MaIT im Cytoplasma der *E. coli* Zelle durch niedermolekularen Substanzen stabilisiert wird. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Volumina eines sterilfiltrierten, hitzebehandelten *E. coli* Zellextrakts (siehe Abschnitt 3.21) zu SAC gereinigtem MaIT₁₋₈₀₆ gegeben und Unterschiede im Laufverhalten mittels analytischer SEC ausgewertet. Doch die Zugabe dieses Zellextraktes führte nicht zu einer nennenswerten Stabilisierung von MaIT₁₋₈₀₆.

Die Zugabe von Saccharose oder Glycerin zu MaIT-Fragmenten stabilisierte diese zwar, ermöglichte aber nicht deren Kristallisation. Daher wurde eine Möglichkeit gesucht, eine größere Anzahl von Verbindungen und Pufferbedingungen auf die Stabilisierung von MaIT-Fragmenten durchzumustern. Zu diesem Zweck wurde ein Thermofluor-Assay mit MaIT₁₋₈₀₆ durchgeführt (siehe Tabelle 3 & Tabelle 15).

Tabelle 3: Thermofluor-Assay für MalT₁₋₈₀₆ mit ausgewählten Schmelztemperaturen T_m.

T _m [°C]	Bedingung	T _m [°C]	Bedingung	T _m [°C]	Bedingung
56,81	20 mM Tacsimat pH 9,0	55,18	225 mM Saccharose	53,43	5 % (v/v) Glycerin
56,13	20 % (v/v) Glycerin	54,45	10 % (w/v) Galactose	53,34	20 mM Tris/HCl pH 7,5
56,10	20 mM Na Phosphat pH 7,5	54,37	100 mM NaSCN	52,93	10 % (v/v) Betain
56,06	20 mM Tacsimat pH 7,0	54,32	5 % (w/v) Galactose	52,89	20 mM HEPES/Na pH 8,0
55,90	500 mM NaCl	53,70	10 mM Arginin	52,84	10 % (v/v) Saccharose
55,65	7,5 % (v/v) Glycerin	53,54	200 mM NaCl	52,39	2 mM ATP
55,63	20 mM Tacsimat pH 8,0	53,45	10 mM MgCl ₂	52,12	10 mM Maltotriose

Der Thermofluor-Assay bestätigte vorherige Befunde, dass die Zugabe hoher Konzentrationen an NaCl, Glycerin oder Saccharose MalT₁₋₈₀₆ stabilisieren. Außerdem stellte sich heraus, dass Tacsimat (McPherson, 2001) bei hohem pH Wert ebenfalls stabilisierend auf MalT wirkt. Tacsimat ist eine Lösung aus 1,8 M Malonat, 0,25 M Succinat, 0,3 M Malat, 0,4 M Natrium-Acetat, 0,5 M Natrium-Formiat und 0,16 M Ammonium-Tartrat. Somit hat eine 10%ige Tacsimat-Lösung eine Ionenstärke von 0,67 M. Phosphat basierte Puffer bewirkten zwar auch eine erhöhte Schmelztemperatur, sind allerdings bei Kristallisationsexperimenten unerwünscht, da viele Phosphate aufgrund ihrer niedrigen Löslichkeitsprodukte zur Salzkristallbildung neigen. Einige der getesteten Pufferbedingungen ergaben allerdings keine messbare Schmelzkurve, da bereits bei 22 °C ein zu hohes Fluoreszenzsignal auftrat. Dies deutet darauf hin, dass MalT₁₋₈₀₆ unter diesen Bedingungen bereits teilweise entfaltet vorliegt, wodurch der verwendete Farbstoff SYPRO® Orange bereits an exponierte hydrophobe Bereiche binden kann. Somit ist das Quenching bereits vor der Temperaturerhöhung unterdrückt. Hauptsächlich kam es bei Bedingungen mit niedrigem pH-Wert und geringer Ionenstärke zu solchen Effekten. Ausgehend von den Ergebnissen der Thermofluor-Messung wurde MalT₁₋₈₀₆ nach der SAC gegen 10 % (v/v) Tacsimat pH 9,0, 5 mM MgCl₂ und 0,1 mM ATP dialysiert und diese eine SEC durchgeführt (siehe Abbildung 14). In diesem Puffer lag MalT₁₋₈₀₆ zu über 90 % als Monomer vor und blieb auch für mindestens zwei Wochen bei 4 °C stabil. Die Fraktionen der SEC wurden zum Ansetzen von Kristallisationsexperimenten verwendet. Auch MalT₁₋₃₈₀ konnte in einem entsprechenden Tacsimat-Puffer als monomeres Protein gereinigt werden und wurde für Kristallisationsexperimente verwendet.

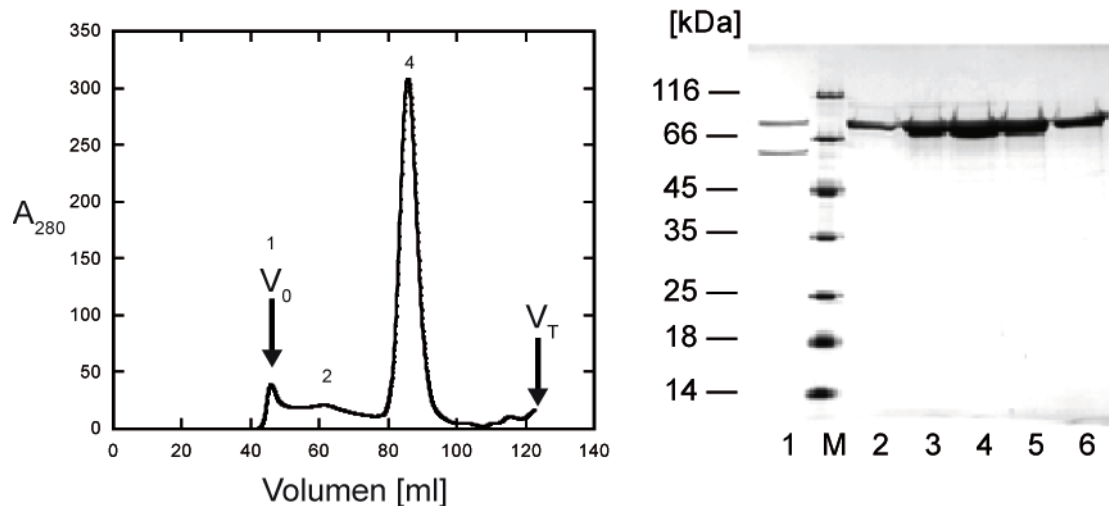


Abbildung 14: SEC von MalT₁₋₈₀₆ in Tacsimat-Puffer. Absorptionsprofil der SEC von MalT₁₋₈₀₆ in 10 % (v/v) Tacsimat pH 9,0, 5 mM MgCl₂ und 0,1 mM ATP sowie das zugehörige SDS-Gel. Spur 1: Aggregat, Spur 2 bis 6: weitere SEC Fraktionen, Spur M: Marker.

4.1.3 Konformationelle Stabilisierung von MalT durch systematische Verkürzung

Nachdem bestimmte Pufferzusätze zwar die MalT₁₋₃₈₀ und MalT₁₋₈₀₆ Fragmente über einen gewissen Zeitraum stabilisierten, jedoch deren Kristallisation erfolglos verlief, wurde nun versucht MalT-Fragmente durch Verkürzung für die Kristallisation zu optimieren. Basierend auf der Struktur von APAF-1 (PDB-Code: 3SFZ; (Riedl *et al.*, 2005)) wurden MalT₁₋₂₄₆ und MalT₁₋₃₃₆ konstruiert, wobei das Fragment MalT₁₋₂₄₆ nur noch die Nukleotid-bindende Domäne aber nicht mehr die *helical domain* und *winged helical domain* der NOD umfasst. Außerdem wurden beide Fragmente sowohl mit *Strep*-tag II als auch mit His₆-Affinitätsanhängsel kloniert, die sowohl am N- als auch C-Terminus positioniert wurden, denn die Art und Position des Affinitätsanhängsels haben bei der Überproduktion von Proteinen in *E. coli* teilweise einen großen Einfluss auf die Ausbeute und Löslichkeit des rekombinanten Proteins (LaVallie & McCoy, 1995; Makrides, 1996; Nilsson *et al.*, 1997; Baneyx, 1999). Darüber hinaus können sie auch die Qualität der Röntgenbeugung von Proteinkristallen beeinflussen (Bucher *et al.*, 2002). Durch diese jeweils vier Varianten der Positionierung und Art des Affinitätsanhängsels wurde versucht, dessen eventuell störenden Einfluss bei der Ausbildung von Kristallkontakten zu minimieren.

Für die Klonierung dieser Konstrukte wurde eine PCR mit dem Plasmid pASK75StrepMalT806 als Template durchgeführt. Die Klonierung der N-terminalen Affinitätsanhängsel erfolgte über die Restriktionsendonukleasen *SfoI* und *HindIII* auf pASKIBA5plus bzw. pASKIBA35plus. Zur Klonierung der Fragmente mit C-terminalen Affinitätsanhängseln wurden die PCR-Produkte mit *NdeI* geschnitten und über *NdeI* und *AfeI* auf pASK75Strep bzw. pASK75His kloniert. Die acht Konstrukte wurden in *E. coli* BL21 bei 22 °C und 30 °C für 6 Stunden, sowie bei 16 °C über Nacht exprimiert. MalT₁₋₃₃₆ wurde

unabhängig von Art und Position des Affinitätsanhängsels bei allen Temperaturen in großen Mengen ausschließlich als Einschlusskörper in *E. coli* BL21 produziert. Im Fall der MalT₁₋₂₄₆ Fragmente ließ sich durch Erniedrigung der Expressionstemperatur der Anteil an löslichem Protein für die Konstrukte mit C-terminalem Affinitätsanhängsel erhöhen, jedoch lag auch hier der größte Teil des Proteins als unlösliche Einschlusskörper vor.

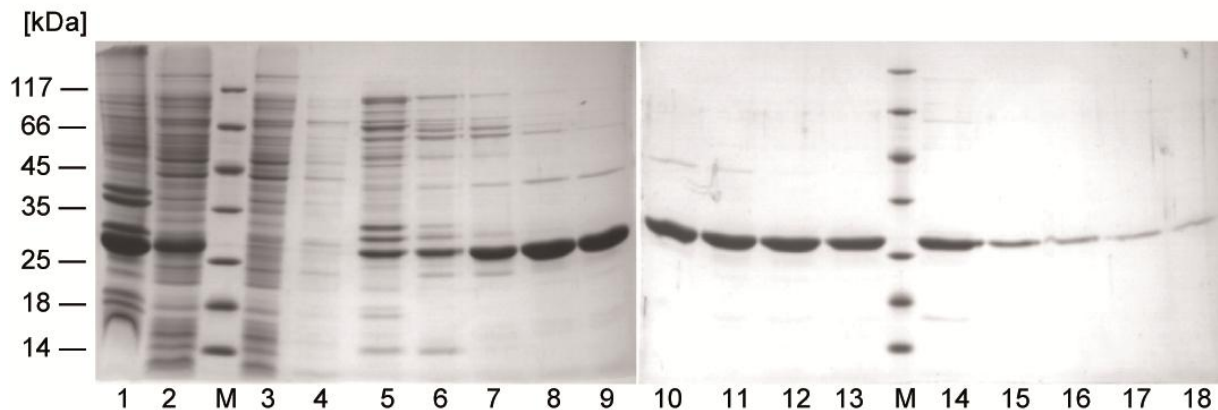


Abbildung 15: IMAC-Reinigung des MalT₁₋₂₄₆ Fragments. Spur 1: unlöslicher Anteil, Spur 2: löslicher Anteil, Spur 3: Durchlauf, Spur 4: Waschfraktion, Spur 5 bis 18: Elutionsfraktionen, Spur M: Marker.

MalT₁₋₂₄₆ konnte in 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 8,0, 500 mM KCl und 2 mM BME sowohl mit C- als auch N-terminalem His₆-Affinitätsanhängsel über Affinitätschromatographie gereinigt werden (Abbildung 15). Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP und 2 mM BME, wie auch gegen diesen Puffer mit entweder 225 mM Saccharose, 500 mM KCl oder 7,5 % (v/v) Glycerin versetzt, führte jedoch zur Präzipitation eines Großteil des Proteins. Das Proteinpräzipitat wurde daraufhin durch Zentrifugation abgetrennt. Bei der anschließenden Konzentration des verbliebenen Proteins für die SEC begann aber auch das restliche MalT₁₋₂₄₆ auszufallen, so dass in keinem der Puffer monomeres MalT-Fragment erhalten wurde.

In wieweit die auf rationalem Konstruktdesign basierenden MalT-Fragmente tatsächlich günstig gewählt wurden, blieb unklar. Die Aussagekraft der für die Konstruktplanung verwendeten Strukturmodelle, die mit dem SwissProt Modelling Server berechnet wurden (Benkert *et al.*, 2011), ist mit Vorsicht zu betrachten (vgl. Abschnitt 4.1.1). Es ist daher anzunehmen, dass sich die Struktur der MalT NOD in Teilen erheblich von dem theoretischen Strukturmodell unterscheidet. So könnten ungünstige Verkürzungen zur Exponierung größerer hydrophober Bereiche führen, die sich normalerweise im Proteininneren befinden, und so die Aggregationstendenz erhöhen.

Da die bisherigen Versuche über rationales Konstruktdesign kristallisierbare MalT-Fragmente zu produzieren nicht erfolgreich war, wurde MalT₁₋₃₃₆ nun systematisch vom C-

Terminus her um je drei Aminosäuren verkürzt. Auf diese Weise sollte eine Stelle in der MalT-Struktur ausfindig gemacht werden, an der die dreidimensionale Proteinstruktur unterbrochen werden kann, ohne dadurch größere hydrophobe Bereiche des Proteins zu generieren. Die Klonierung erfolgte durch eine Deletions-QuikChange Mutagenese ausgehend von pASKIBA35plusMalT336 (mit N-terminalem His-tag), wodurch die insgesamt 29 Konstrukte MalT₁₋₃₃₀ bis MalT₁₋₂₄₉ sowie MalT₁₋₂₄₇ erzeugt wurden. Expressionstests wurden in *E. coli* BL21 in LB Medium im 50 ml Maßstab bei 22 °C für 6 Stunden durchgeführt. Die anschließende SDS-PAGE Analyse zeigte, dass sich die meisten dieser MalT-Fragmente mit hoher Ausbeute produzieren lassen, jedoch war der Anteil an löslichem Protein in fast allen Fällen sehr gering. Die Fragmente MalT₁₋₃₀₆, MalT₁₋₃₀₃, MalT₁₋₂₇₆, MalT₁₋₂₆₄ und MalT₁₋₂₅₈ zeigten zumindest einen geringen Anteil löslichen Proteins. Insbesondere MalT₁₋₂₅₈ schien in einem Verhältnis von etwa 1:1 in der löslichen und der unlöslichen Fraktion vorzuliegen. MalT₁₋₂₅₈ war auch das einzige dieser Fragmente, das über IMAC in 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 8,0, 500 mM KCl und 2 mM BME angereichert werden konnte. Im Gegensatz zu MalT₁₋₂₄₆ konnte die IMAC sowohl in HEPES-basierten als auch in Phosphat-basierten Puffern mit vergleichbarer Ausbeute durchgeführt werden. Die MalT₁₋₂₅₈ enthaltenden IMAC Fraktionen wurden vereinigt und für die SEC dialysiert. Doch die Dialyse gegen 50 mM HEPES/Na pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP und 2 mM BME sowohl ohne als auch mit 7,5 % (v/v) Glycerin, führte zur Präzipitation eines Großteils des Proteins. Die anschließende SEC zeigte, dass das restliche Protein als lösliches Aggregat vorlag. Grund für den Pufferwechsel waren die im Anschluss geplanten Kristallisationsexperimente. Phosphat basierte Puffer neigen zur Salzkristallbildung und sind deshalb unerwünscht. Außerdem vermindert eine relativ hohe KCl Konzentration von 500 mM in Anwesenheit von 7,5 % Glycerin die Dampfdiffusion im Kristallisationsansatz, was sich negativ auf Nukleation und Kristallwachstum auswirkt.

Die MalT-Fragmente MalT₁₋₂₅₈, MalT₁₋₂₆₄, MalT₁₋₂₇₆, MalT₁₋₃₀₃ und MalT₁₋₃₀₆, die sich bei der Testexpression als am besten löslich herausstellten, wurden auch auf Vektoren kloniert, die C-terminale His₆- bzw. *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel kodieren. Auf diese Weise sollte der oben beschriebene möglicherweise störende Einfluss des Affinitätsanhängsels auf die Kristallisation minimiert werden. Nach PCR Amplifizierung der entsprechenden Genfragmente, wurden diese über *Nde*I und *Afe*I auf die Vektoren pASK75Strep und pASK75His kloniert. Doch wieder konnten nur die beiden MalT₁₋₂₅₈ Konstrukte als lösliches Protein exprimiert und über IMAC gereinigt werden. MalT₁₋₂₅₈ mit C-terminalen Affinitätsanhängsel-Varianten präzipitierte allerdings wie die Variante mit N-terminalen His₆-Affinitätsanhängsel beim Konzentrieren für die anschließende SEC in allen getesteten Puffern.

4.1.4 Mutagenese von MalT-Fragmenten

Alle bisherigen Reinigungs- und Kristallisationsversuche mit MalT-NOD Fragmenten haben gezeigt, dass diese nur sehr schwer zu handhaben sind. Um die Chancen für eine erfolgreiche Kristallisation zu erhöhen, wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht MalT-Fragmente zu stabilisieren. Ein Vergleich der MalT Sequenzen aus *E. coli* und *Salmonella typhimurium* zeigte, dass beide Proteine eine Sequenzidentität von 91 % und eine Ähnlichkeit von 98 % aufweisen (Abbildung 16). Interessanterweise besitzt *E. coli* MalT drei freie Cystein-Reste (Cys93, Cys197 und Cys319) mehr als *Salmonella* MalT. Cysteine sind leicht oxidierbar und können dadurch einen destabilisierenden Effekt auf die Proteinstruktur haben. Außerdem können Cysteine zur Ausbildung unerwünschter intermolekulare Disulfidbrücken führen. Insbesondere die Region beginnend mit Cys90 ist in *Salmonella* (CSTS) deutlich hydrophiler als in *E. coli* (CAIC). Daher wurden über QuikChange-Mutagenese basierend auf dem Plasmid pASK75HisMalT336 die Cysteine 93, 197 und 319 gegen hydrophilere Serin-Reste ausgetauscht. Außerdem wurden Cys90 und Ile92 entsprechend der *Salmonella* Sequenz gegen die hydrophileren aber ähnlich großen Aminosäuren Serin und Threonin ersetzt. Die resultierenden Varianten wurden auch auf die Vektoren pASK75Strep, pASK75His, pASKIBA5plus und pASKIBA35 subkloniert. Die entsprechenden Proteine wurden dann in *E. coli* BL21 bei 16 °C über Nacht produziert. Die Expression aller MalT-Fragment-Varianten zeichnete jedoch ein ähnliches Bild wie die jeweiligen nativen Fragmente. Die MalT₁₋₃₃₃, MalT₁₋₃₃₆ und MalT₁₋₄₃₈ Varianten wurden in großen Mengen produziert, lagen allerdings immer noch ausschließlich in Einschlusskörpern vor. Selbst MalT₁₋₂₄₆, welches vorher teilweise löslich war, lag nun fast vollständig in Einschlusskörpern vor. Stattdessen wurden bei einer IMAC-Reinigung der Mutante von MalT₁₋₂₄₆ sowohl für das N- als auch das C-terminalen His₆-Affinitätsanhängsel zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von etwas über bzw. etwas unter 66 kDa angereichert (siehe Abbildung 17). Diese beiden Proteine konnten sogar über AEX und SEC voneinander getrennt und gereinigt werden. Leider ergab die massenspektroskopische Untersuchung keinen Aufschluss über die Identität der beiden Proteine.

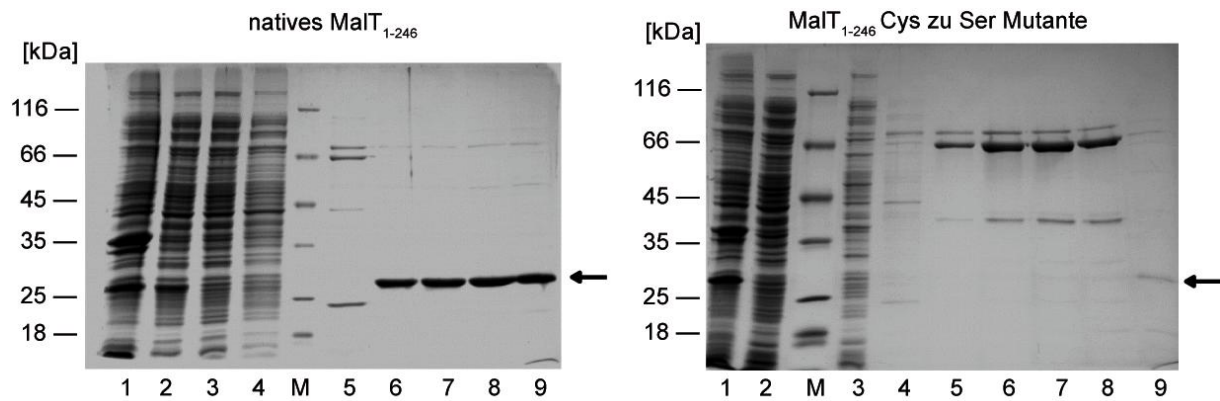


Abbildung 17: Vergleich der Affinitätsreinigungen von MaIT₁₋₂₄₆ und MaIT₁₋₂₄₆ Ser. IMAC- des nativen MaIT₁₋₂₄₆ (links) und der Ser-Variante (rechts), jeweils mit N-terminalem His₆-tag. Spur 1: komplette Zellfraktion, Spur 2: löslicher Anteil, Spur 3: Durchlauf, Spur 4: Wasch-Fractionen, Spur 5 bis 9: Elutionsfraktionen, Spur M: Marker.

Die Ser-Varianten von MaIT₁₋₂₄₆ und MaIT₁₋₃₈₀ wurden wie die nativen Fragmente in großen Mengen produziert, lagen aber trotzdem nur zu einem geringen Teil als lösliches Protein vor. Im Gegensatz dazu zeigte die MaIT₁₋₈₀₆ Ser-Variante vergleichbare Proteinausbeuten wie das entsprechende Wildtyp Fragment bei der SAC. Die Proteinfraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 7,5 % (v/v) Glycerin, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP und 2 mM BME dialysiert, um eine SEC durchzuführen. Auch für die Ser-Variante lag MaIT₁₋₈₀₆ in dem Puffer mit Glycerin und ATP überwiegend als Monomer vor, wenngleich der Monomeranteil im Vergleich zum nativen Fragment etwas geringer war (siehe Abbildung 12 und Abbildung 18). Der negative Einfluss der eingeführten Mutationen auf MaIT₁₋₈₀₆ ist jedoch wesentlich geringer als für MaIT₁₋₂₄₆, und MaIT₁₋₃₈₀, was vermutlich auf die Größe des Fragments zurückzuführen ist. Mit MaIT₁₋₈₀₆ wurden deshalb Kristallisationsexperimente durchgeführt.

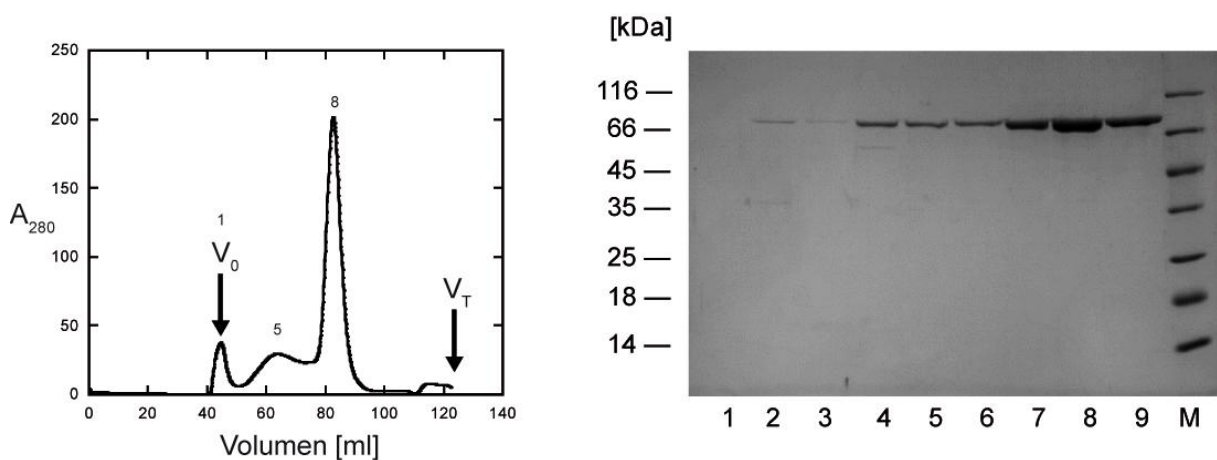


Abbildung 18: SEC der Ser-Variante von MaIT₁₋₈₀₆. Absorptionsprofil der SEC des MaIT₁₋₈₀₆ Fragments mit weniger Cysteinen und das zugehörige SDS-PAGE Gel. Spur 1 bis 9: SEC-Fractionen, Spur M: Marker.

4.1.5 Reinigung von MalT-Fragmenten in Gegenwart von MalY

Versuche verschiedene MalT-Fragmente durch rationales Konstruktdesign, systematische Verkürzung, Einführung von Mutationen und Optimierung der Pufferbedingungen führten teilweise zu einer Stabilisierung des Proteins. Dennoch verliefen die Kristallisationsexperimente nicht erfolgreich. Daher wurde versucht einzelne MalT-Fragmente durch Interaktion mit natürlichen Proteininteraktionspartnern zu stabilisieren und die entsprechenden Komplexe zu kristallisieren. Diese Methode hätte außerdem den Vorteil, dass sie zusätzlich Aussagen über die Interaktionen zwischen MalT und seinen regulatorischen Partnern ermöglichen würde. Gut charakterisierte Interaktionspartner von MalT sind MalK, der cytoplasmatische Teil des Maltose-Transporters, die β -Cystathionase MalY und die Acyl-Esterase Aes. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Gene mittels PCR von bestehenden Plasmiden (vgl. Abschnitt 2.2 Plasmide) amplifiziert und das PCR-Produkt mit *HindIII* verdaut. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden auf die Vektoren pASKIBA5plus und pASKIBA35plus über *SfoI* und *HindIII* kloniert. Auf diese Weise konnten alle drei Interaktionspartner entweder mit N-terminalen His₆-oder *Strep* II- Affinitätsanhängsel exprimiert werden. Zusätzlich wurden für MalK drei verschiedene Fragmente der C-terminalen Domäne kloniert (Aminosäuren 218 bis 371, Aminosäuren 225 bis 371 und Aminosäuren 237 bis 371), da diese für die Interaktion mit MalT verantwortlich ist. Die Proteine wurden in *E. coli* BL21 bei 22 °C exprimiert und ihr Expressionsverhalten durch SDS-PAGE analysiert. Alle drei Interaktionspartner konnten in großer Menge in *E. coli* produziert werden. Ein bedeutender Anteil der Proteine lag nach Zellaufschluss mittels French Press in der löslichen Fraktion vor. Für Aes und MalK war allerdings trotzdem die größte Menge des Proteins in der unlöslichen Fraktion zu finden. MalY hingegen zeigte nur eine geringe Menge des überexprimierten Proteins in der unlöslichen Fraktion. Alle drei Proteine ließen sich mit N-terminalem His₆-Affinitätsanhängsel besser produzieren als mit einem N-terminalen *Strep*-tag II. Die Art des Anhängsels schien jedoch keinen Einfluss auf das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Protein zu haben. MalY schien am besten für die Stabilisierung der MalT-Fragmente geeignet, da es die höchsten Ausbeute zeigte und vermutlich ausschließlich mit der NOD Domäne von MalT interagiert. Das Pellet einer 2 L Expressionskultur von MalY mit N-terminalem His₆-Affinitätsanhängsel wurde in 18 ml 40 mM HEPES/Na pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol und 2 mM BME resuspendiert und nach einem Zellaufschluss mit der French Press über IMAC gereinigt. Aus der 2 L Expression bei 22 °C wurden etwa 35 mg MalY nach der IMAC erhalten. Da nach der IMAC praktisch keine anderen Proteine mehr in der Lösung erhalten waren, wurde in 20 mM HEPES/Na pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl und 2 mM BME eine SEC durchgeführt. Dazu wurde eine Superdex 200 16/60 Säule verwendet.

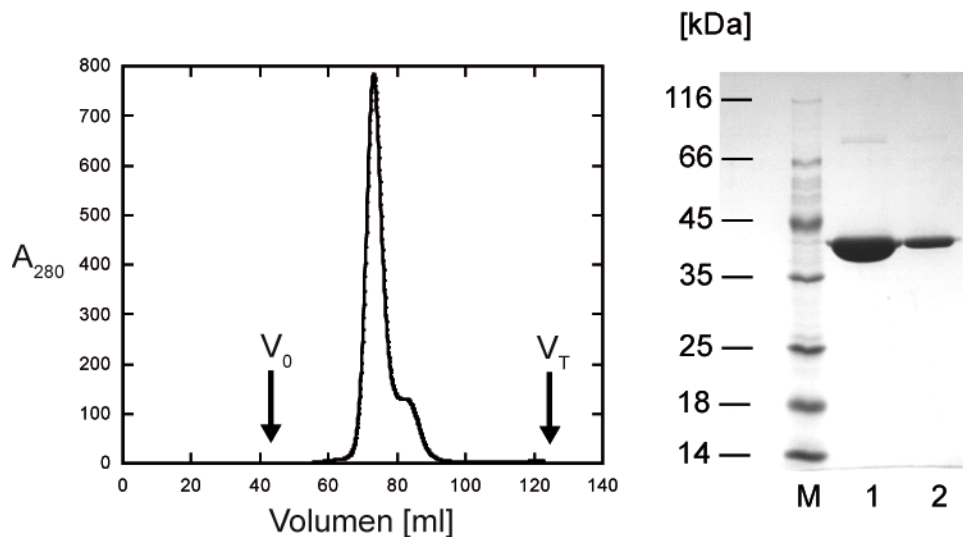


Abbildung 19: Größenausschluss-Chromatographie von MalY. Absorptionsprofil der SEC von MalY und zugehörige SDS-Gele. Spur 1: Hauptpeak, Spur 2: Schulter, Spur M: Marker.

Die SEC zeigte, dass kein Aggregat vorliegt und der Hauptpeak von MalY bei einem Volumen von 73,1 ml eluiert, das einem Molekulargewicht von 88,1 kDa und damit in etwa dem erwarteten Wert von 90 kDa für das Dimer entspricht (siehe Abbildung 19). In zweiter - wesentlich kleinerer - Elutionspeak bei 81,9 ml (43,8 kDa) entspricht vermutlich dem monomeren MalY. Auch in der Literatur ist beschrieben ist, dass MalY in Lösung als Dimer vorliegt (Schreiber *et al.*, 2000; Schlegel *et al.*, 2002b).

Da sich die Fragmente MalT₁₋₂₄₆ und MalT₁₋₈₀₆ verhältnismäßig stabil über SAC reinigen ließen, wurden sie für die Komplexbildung mit MalY ausgewählt. Zunächst wurden die MalT-Fragmente über den C-terminalen *Strep*-tag II auf einer Streptactin (SA) Säule Mutante 1.6 gebunden und nach dem Waschen mit einem Überschuss an gereinigtem His₆-MalY versetzt und erneut gewaschen, bevor die Elution mit 5 mM Biotin erfolgte. Da His₆-MalY keinerlei Affinität für das SA Material aufweist, würde eine Co-Elution mit dem jeweiligen MalT-Fragment die Interaktion zwischen den beiden Proteinen belegen. Die SDS-PAGE der SAC zeigte für beide MalT-Fragmente, dass sich ein großer Teil des MalY im Durchlauf befand. Dies war allerdings zu erwarten, da MalY im großen Überschuss zu MalT aufgetragen wurde. Dagegen zeigten die Elutionsfraktionen eindeutig die Anwesenheit beider Proteine. Die Co-Elution von MalY/MalT₁₋₂₄₆ und MalY/MalT₁₋₈₀₆ belegt weiterhin, dass für die Interaktion der beiden Protein die ersten 246 Aminosäuren von MalT ausreichend sind. Die in der SDS-PAGE vergleichsweise deutlich stärkeren Banden von MalT₁₋₈₀₆ deuteten allerdings daraufhin, dass sich im Gegensatz zu MalT₁₋₂₄₆ kein äquimolarer Komplex aus MalT₁₋₈₀₆ und MalY bildet. Die Elutionsfraktionen der SAC wurden jeweils vereinigt und gegen einen Puffer aus 20 mM HEPES/Na pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0,1 mM ADP und 2 mM BME dialysiert, eingengt und durch SEC auf ihren hydrodynamischen Radius bzw. ihr Molekulargewicht untersucht (Abbildung 20). Im Absorptionsprofil der SEC auf der Superdex

200 16/60 Säule treten für beide MalT-Fragmente jeweils mehrere Peaks auf. Im Fall von MalT₁₋₈₀₆ sind es vier Peaks, von denen der erste dem Ausschlussvolumen entspricht. Die weiteren Peaks entsprechen Elutionsvolumina von 69,1 ml, 74,5 ml bzw. 81,4 ml was Molekulargewichten von 309 kDa, 191 kDa bzw. 104 kDa entspricht. Die SDS-PAGE zeigt, dass sich im Aggregat-Peak und dem vierten Peak nur MalT befand. Dagegen enthielten die beiden mittleren Peaks sowohl MalT₁₋₈₀₆ als auch MalY. Zum einen bedeutet das, dass nicht jedes der MalT₁₋₈₀₆ Fragmente im Komplex mit MalY vorliegt. Außerdem zeigen der zweite (309 kDa) und dritte (191 kDa) Peak unterschiedliche stöchiometrische Verhältnisse mit 2:2 und 2:1 von MalY:MalT₁₋₈₀₆, was darauf hindeutet, dass der Komplex zwischen MalT₁₋₈₀₆ und MalY leicht dissoziieren kann. In früheren Arbeiten wurde vermutet, dass jede Untereinheit eines MalY Dimers jeweils mit einem Molekül Volllänge MalT interagiert (Schreiber *et al.*, 2000; Schlegel *et al.*, 2002a; Schlegel *et al.*, 2002b), d.h. es würde sich ein stöchiometrisches Verhältnis von 2:2 bilden. Im Fall von 2MalY/2MalT₁₋₈₀₆ würde das einem Molekulargewicht von 274 kDa entsprechen. Wäre dagegen nur ein MalT₁₋₈₀₆ gebunden würde sich das Molekulargewicht auf 180 kDa verringern. Die experimentell ermittelten Werte von 309 kDa bzw. 191 kDa entsprechen näherungsweise einem 2:2 bzw. 2:1 Komplex von MalY und MalT₁₋₈₀₆. Die Interaktion der beiden Proteine scheint aber nur schwach und reversibel zu sein, so dass sich möglicherweise ein Gleichgewicht zwischen beiden Formen einstellt, was hier aber nicht weiter untersucht wurde.

Das Verhalten des Komplexes aus MalT₁₋₂₄₆ mit MalY unterschied sich deutlich vom MalY/MalT₁₋₈₀₆ während der SEC. So traten nur drei Proteinpeaks auf, im Ausschlussvolumen, bei 71,5 ml und bei 83,0 ml. Die beiden letzten Peaks entsprechen einem Molekulargewicht von 205 kDa bzw. 76 kDa. Der Peak bei 83 ml entspricht vermutlich einem MalY-Dimer, da die SDS-PAGE hier einen deutlichen Überschuss an MalY zeigt. Das für den mittleren Peak berechnete Molekulargewicht ist für einen Komplex im Verhältnis 2:2 zu hoch (205 kDa statt der erwarteten 144 kDa) und würde eher einem MalY Dimer und vier MalT₁₋₂₄₆ entsprechen (202 kDa). Ob sich ein solcher Komplex aber tatsächlich gebildet hat, bleibt fraglich. Es ist wahrscheinlicher, dass es sich bei diesem relativ breiten Peak um eine bereits beginnende Aggregation des Komplexes handelte. Der SDS-PAGE war zu entnehmen, dass nun sowohl MalT₁₋₂₄₆ als auch MalY im Aggregatpeak vorkamen, wobei der Anteil an MalT₁₋₂₄₆ überwog. Möglicherweise zieht eine Aggregation von MalT₁₋₂₄₆ die teilweise Aggregation von MalT•MalY nach sich. Weder der Komplex aus MalT₁₋₂₄₆ und MalY, noch der Komplex aus MalT₁₋₈₀₆ und MalY war über einen längeren Zeitraum stabil. Eine erneute Gelfiltration des jeweiligen isolierten Komplexpeaks nach zwei wöchiger Lagerung bei 4 °C zeigte, dass diese größtenteils aggregierten und in Lösung verbliebene Komplexe deutlich früher eluieren. Dies kann daraufhin deuten, dass die Affinität zwischen den MalT-Fragmenten und MalY eher gering ist und der Komplex leicht zerfallen kann. Daraufhin würde das nun freie MalT, wie in

den Reinigungen der ungebundenen MaIT-Fragmente beobachtet, vermutlich aggregieren. Es wäre aber auch denkbar, dass MaIT bereits im Komplex mit MaLY so instabil ist, dass der gesamte Komplex aggregieren kann. Die ursprünglich erhoffte Stabilisierung der MaIT-Fragmente durch Komplexbildung war daher leider nicht erfolgreich.

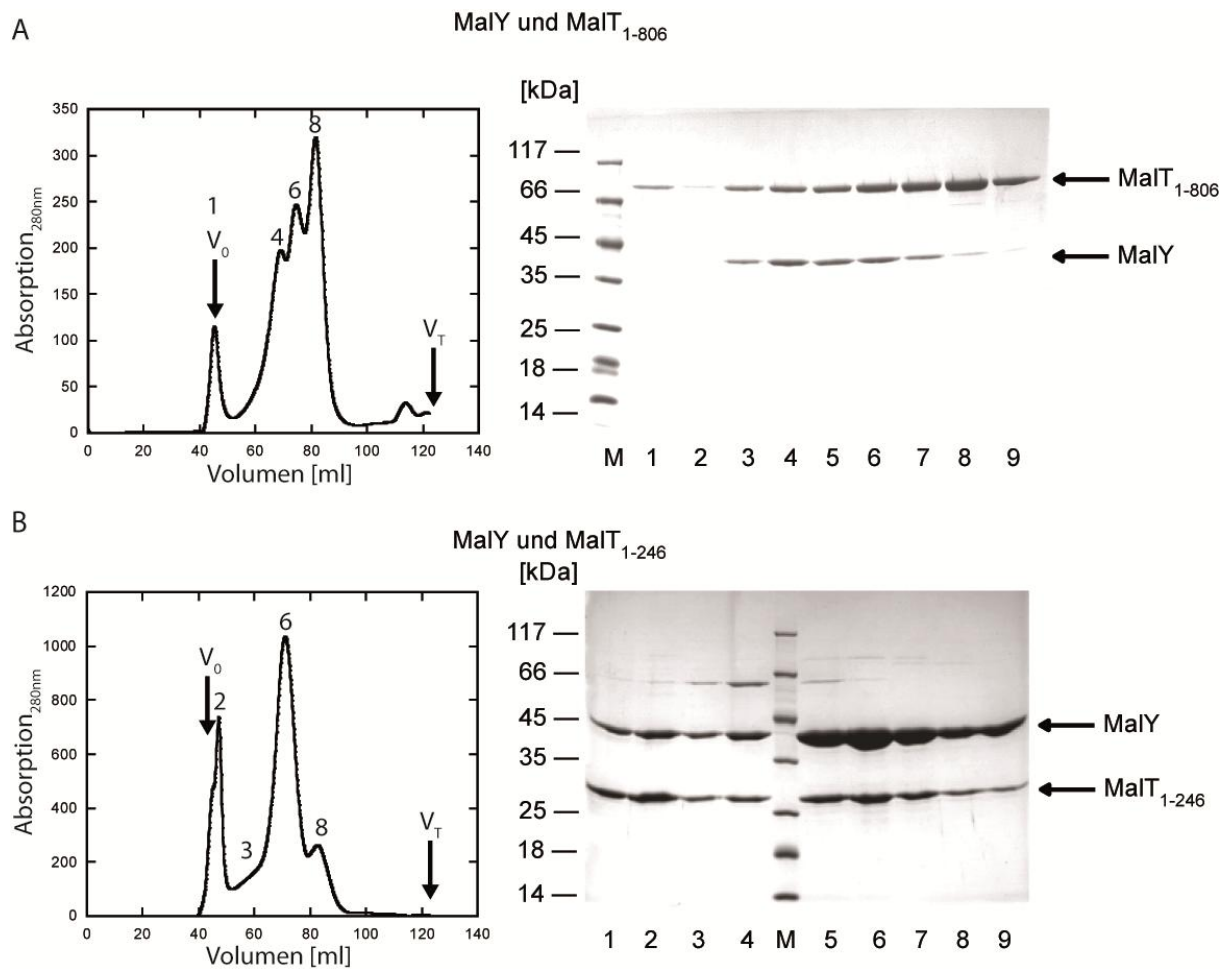


Abbildung 20: Co-Reinigung von MaLY und MaIT. (A) Absorptionsprofil der SEC von MaIT₁₋₈₀₆ mit MaLY und das zugehörige SDS-Gel. Spur 1 bis 9: SEC-Fractionen, Spur M: Marker. (B) Absorptionsprofil der SEC von MaIT₁₋₂₄₆ mit MaLY und zugehörige SDS-Gele. Spur 1 bis 9: SEC-Fractionen, Spur M: Marker.

4.1.6 ATPase Aktivität von MaIT-Fragmenten

Um die ATP Hydrolyse-Aktivität der MaIT-Fragmente zu bestimmen, wurde ein gekoppelter optischer Test angewendet. Hierfür wurden die MaIT-Fragmente mit ATP, Pyruvatkinase (PK), Phosphoenolpyruvat (PEP), Laktatdehydrogenase (LDH) und NADH bei 22 °C inkubiert und alle 10 Minuten die Absorption bei 339 nm, einem Absorptionsmaximum von NADH, gemessen. Durch ATP-Hydrolyse der MaIT-Fragmente wird ADP gebildet, das zusammen mit dem PEP als Substrat der PK dient. Durch dessen Katalyse bildet sich Pyruvat und ATP wird regeneriert. Das entstandene Pyruvat wird schließlich durch LDH

unter NADH-Verbrauch zu Laktat reduziert, wodurch die Absorption bei 339 nm abnimmt. Die Absorptionsänderung ermöglicht somit die Bestimmung der ATP-Hydrolyse-Rate.

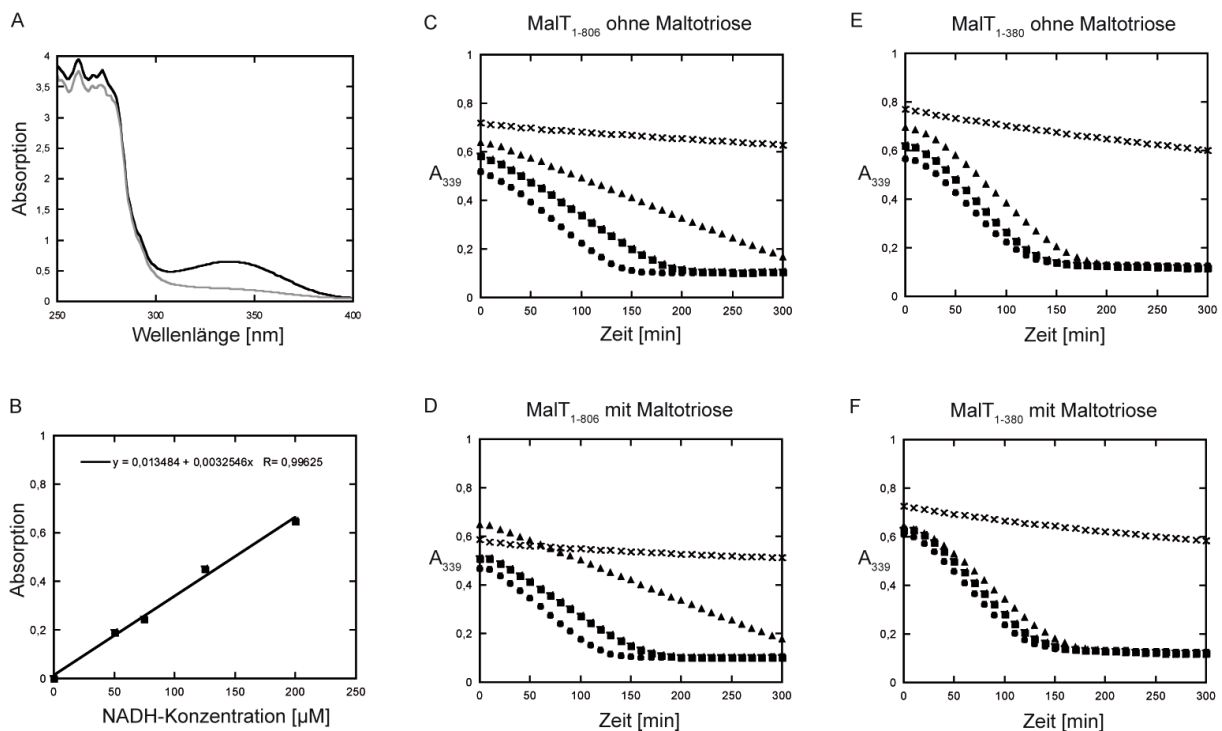


Abbildung 21: ATPase Aktivität von MaIT-Fragmenten. (A) Ein typisches gemessenes Absorptionsspektrum von 220 bis 400 nm in einem der Wells, in dem MaIT enthalten war, zu Beginn der Messung (schwarz) und nach 300 Minuten (grau). (B) Die Kalibrierungsgerade mit NADH. (C) ATPase Assay mit MaIT₁₋₈₀₆ (D) ATPase Assay mit MaIT₁₋₈₀₆ und 1 mM Maltotriose (E) ATPase Assay mit MaIT₁₋₃₈₀ und (F) ATPase Assay mit MaIT₁₋₃₈₀ und 1 mM Maltotriose. Für beide MaIT-Fragmente wurden die bei 339 nm gemessenen Absorptionswerte gegen die Zeit aufgetragen. Kreuze symbolisieren die Werte ohne MaIT (negativ Kontrolle), Dreiecke stehen für die niedrigste, Quadrate für die mittlere und Kreise für die höchste verwendete MaIT Konzentration (siehe Abschnitt 3.21).

Sowohl in Anwesenheit von MaIT₁₋₈₀₆ als auch MaIT₁₋₃₈₀ ergab sich im Vergleich zur Negativkontrolle eine deutlich stärkere Abnahme der NADH-Absorption (siehe Abbildung 21 und Tabelle 4). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl MaIT₁₋₈₀₆ als auch MaIT₁₋₃₈₀ in der Lage sind ATP zu binden und zu hydrolysieren. Daher müssen beide Fragmente im verwendeten Puffer mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 7,5 % (v/v) Glycerin, 5 mM MgCl₂ und 2 mM BME zumindest partiell korrekt gefaltet sein. Für den linearen Anfangsbereich jeder Messung wurde mittels linearer Regression die Steigung bestimmt und diese mithilfe der Steigung der Kalibrierungsgeraden in eine Aktivität mit der Einheit $\mu\text{M}/\text{min}$ umgerechnet. Über das Volumen wurde dann der Wert in $\mu\text{mol}/\text{min}$ erhalten und dieser durch die eingesetzte Menge an MaIT-Fragment dividiert (Tabelle 4). Die ATP-Hydrolyse-Aktivität des MaIT₁₋₃₈₀ Fragments ist etwa viermal größer als die des MaIT₁₋₈₀₆ Fragments. Überraschenderweise hatte die Anwesenheit von Maltotriose für beide Fragmente keinen Einfluss auf die ATP-Hydrolyse-Aktivität (siehe Abschnitt 5.1.1). Allerdings muss man wie

auch bei der geringen bzw. fehlenden Oligomerisierungstendenz von MalT₁₋₈₀₆ (Abschnitt 4.1.2) die - im Verhältnis zur K_D - sehr geringen eingesetzten ATP bzw. Maltotriose-Konzentrationen (Dardonville & Raibaud, 1990; Richet & Raibaud, 1989; Schreiber & Richet, 1999) berücksichtigen.

Tabelle 4: ATPase Aktivitäten der MalT₁₋₈₀₆ und MalT₁₋₃₈₀ Fragmente.

Fragment	1 mM Maltotriose	mol ATP / (mol MalT * min)
MalT ₁₋₈₀₆	-	0,0811 ± 0,0122
MalT ₁₋₈₀₆	+	0,0857 ± 0,0119
MalT ₁₋₃₈₀	-	0,3616 ± 0,1078
MalT ₁₋₃₈₀	+	0,3692 ± 0,0830

4.1.7 Kristallisationsexperimente mit MalT-Fragmenten

Alle MalT-Fragmente, die als stabile Monomere über SEC gereinigt werden konnten, wurden für Kristallisationsexperimente herangezogen. Gleiches gilt für die nach Gelfiltration erhaltenen Komplexe zwischen MalT und MalY sowie definierte molare Verhältnisse für MalT₁₋₈₀₆ und Aes bzw. MalY. Kristallisationsansätze wurden standardmäßig mit den Screens VS 1 bis 5 durchgeführt. Dazu wurden 200 nl Protein- mit 200 nl Reservoirlösung gemischt und im Sitting Drop bei 4 °C oder 22 °C über dem jeweiligen Reservoir inkubiert. Eine Übersicht zu allen durchgeführten Kristallisationsexperimenten ist in Tabelle 5 zusammengestellt. In keinem der Kristallisationsansätze kam es zur Bildung von Proteinkristallen. In über 80 % der Kristallisationstropfen bildete sich innerhalb von zwei Wochen Proteinniederschlag.

Tabelle 5: Kristallisationsansätze von MalT-Fragmenten.

Protein	Puffer	Temperatur	Reinigungsschritte	Additiv
MalT ₁₋₃₈₀	20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 2 mM DTT	22 °C	SAC, SEC	Apo
MalT ₁₋₈₀₆	20 mM HEPES/Na pH 7,5, 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 500 mM KCl, 10 % Glycerin, 2 mM DTT	4 °C, 22 °C	SAC, SEC	Apo, ADP, ATP
MalT ₁₋₃₈₀	20 mM HEPES/Na pH 7,5, 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 500 mM KCl, 10 % Glycerin, 2 mM DTT	4 °C, 22 °C	SAC, SEC	Apo, ADP, ATP
MalT ₁₋₈₀₆	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 150 mM KCl, 7,5 % Glycerin, 2 mM DTT	4 °C, 22 °C	SAC, SEC	Apo, ADP, ATP, AMPPNP
MalT ₁₋₃₈₀	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 150 mM KCl, 7,5 % Glycerin, 2 mM DTT	4 °C, 22 °C	SAC, SEC	Apo, ADP, ATP, AMPPNP

Fortsetzung Tabelle 5: Kristallisationsansätze von MalT-Fragmenten.

Protein	Puffer	Temperatur	Reinigungsschritte	Additiv
MalT ₁₋₈₀₆	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 150 mM KCl, 7,5 % Glycerin, 2 mM DTT	4 °C, 22 °C	SAC, SEC	ADP und Aes (1:1 und 1:2)
MalT ₁₋₈₀₆	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 150 mM KCl, 7,5 % Glycerin, 2 mM DTT	4 °C, 22 °C	SAC, SEC	ADP und MalY (1:1 und 1:2)
MalT ₁₋₈₀₆	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 150 mM KCl, 7,5 % Glycerin, 2 mM BME	4 °C, 22 °C	SAC, SEC	Apo, ADP, ATP
MalT ₁₋₃₈₀	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 150 mM KCl, 7,5 % Glycerin, 2 mM BME	4 °C, 22 °C	SAC, AEX	Apo, ADP, ATP
MalT ₁₋₈₀₆	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 150 mM KCl, 225 mM Saccharose, 2 mM BME	4 °C, 22 °C	SAC, AEX	Apo, ADP, ATP
MalT ₁₋₃₈₀	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 150 mM KCl, 225 mM Saccharose, 2 mM BME	4 °C, 22 °C	SAC, AEX	Apo, ADP, ATP
MalT ₁₋₈₀₆ -MalY Komplex	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ADP, 150 mM KCl, 2 mM BME	22 °C	SAC, SEC	-
MalT ₁₋₂₄₆ -MalY Komplex	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ADP, 150 mM KCl, 2 mM BME	22 °C	SAC, SEC	-
MalT ₁₋₈₀₆ CAIC90SATS, C197S, C319S	20 mM HEPES/Na pH 7,5 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 150 mM KCl, 7,5 % Glycerin, 2 mM BME	22 °C	SAC, SEC	Apo, ADP, ATP
MalT ₁₋₃₈₀	10 % Tacsimat pH 9,0, 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 2 mM BME	22 °C	SAC, SEC	Apo, ADP, ATP
MalT ₁₋₈₀₆	10 % Tacsimat pH 9,0, 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, 2 mM BME	22 °C	SAC, SEC	Apo, ADP, ATP
MalT ₁₋₉₀₁	20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 10 % Glycerin, 0,1 mM ATP, 2 mM DTT	22 °C	SAC, SEC	Apo

4.2 Das periplasmatische Protein MalM mit unbekannter Funktion

4.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung des Volllängen MalM

Über das MalM Protein ist außer der Tatsache, dass es sich um ein periplasmatisches Protein handelt, wenig bekannt. So variieren auch die Angaben zur Länge des Signalpeptids (Rousset *et al.*, 1986; Gilson *et al.*, 1986). Aus diesem Grund wurde das gesamte *malM* aus genomischer DNA eines XL1-blue Stammes mittels PCR amplifiziert und über *NdeI* und *AfeI* auf die Vektoren pASK75Strep und pASK75His kloniert. Eine Sequenzierung dieser MalM Konstrukte zeigte einen Polymorphismus bei Ala44Val des XL1-blue Stammes im Vergleich zu der in UniProt (<http://www.uniprot.org>) (Consortium, 2008) hinterlegten *E. coli* K12 MalM Sequenz (UniProt-ID: P03841).

Das Konstrukt pASK75HisMalM wurde in *E. coli* JM83 Zellen bei 22 °C für 4 Stunden produziert. Anschließend wurde die periplasmatische Fraktion isoliert, wobei sich eine sehr starke Überexpressionsbande zeigte. Ein geringer Teil des Zielproteins befand sich aber auch in der unlöslichen Fraktion. Der periplasmatische Extrakt wurde zweimal bei 4 °C gegen einen Puffer bestehend aus 50 mM HEPES/Na pH 8,0, 500 mM NaCl und 10 mM Imidazol/Cl dialysiert und über eine mit Zn²⁺-Ionen beladene Ida-Sepharose Säule gereinigt. Das Volllängen MalM Protein eluierte erst bei einer relativ hohen Imidazol-Konzentration über 200 mM von der Affinitätssäule. Dabei zeigte sich eine leichte Schulter vor dem Elutionspeak, was beides auf eine mögliche Multimerisierung des Proteins hinweist. Die MalM-enthaltenden Fraktionen des Hauptpeaks wurden gegen 25 mM Tris/HCl pH 8,8 dialysiert und anschließend wurde eine AEX durchgeführt. MalM eluierte in einem scharfen Peak bei einer Konzentration von etwa 90 mM NaCl (Abbildung 22). Die Fraktionen des MalM Proteinpeaks wurden vereinigt und eine SEC in 20 mM HEPES/Na pH 8,0 und 150 mM NaCl durchgeführt.

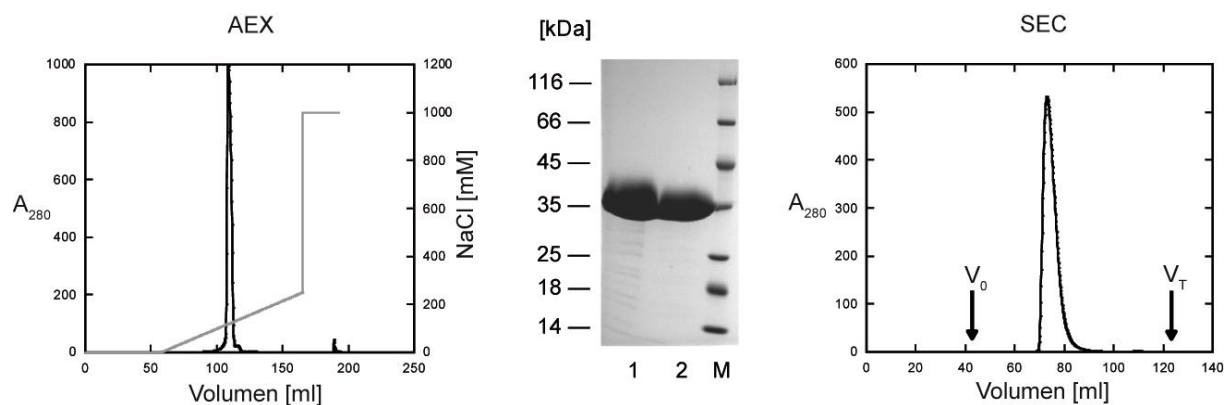


Abbildung 22: Reinigung des Volllängen MalM. Absorptionsprofil der AEX und der SEC von MalM₂₇₋₃₀₆ sowie das zugehörige SDS-Gel. Spur 1: AEX-Peak, Spur 2: SEC-Peak, Spur M: Marker.

Die SEC auf einer Superdex 200 16/60 Gelfiltrationssäule ergab die Elution des gesamten MalM Proteins in einem einzigen Peak mit leichtem Tailing-Effekt bei einem Volumen von 73,0 ml. Das entspricht einem Molekulargewicht von etwa 180 kDa, was auf ein MalM Hexamer schließen lässt (Abbildung 22). Auch die IMAC-Fraktionen aus der Schulter des Elutionspeaks, in denen sich ebenfalls MalM Protein befindet, zeigen ein vergleichbares Laufverhalten auf der SEC. Die Fraktionen der SEC, die das MalM Protein enthielten, wurden vereinigt, über Nacht gegen einen Puffer aus 10 mM Tris/HCl pH 8,0 dialysiert und für den Ansatz von Kristallisationsexperimenten verwendet. Aus einer Expressionskultur in 2 L LB Medium konnten so etwa 60 mg gereinigtes MalM erhalten werden.

Über eine Suche mittels des HHpred Servers (Soding *et al.*, 2005) wurde α_2 u-Globulin aus der Ratte (PDB-Code: 2A2U) (Chaudhuri *et al.*, 1999) als ähnlichste bekannte Proteinstruktur

zu MalM identifiziert. Jedoch weist dieses lediglich eine Sequenzidentität von etwa 12 % zu den 169 N-terminalen Aminosäuren von MalM auf. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass sich das Phasenproblem durch MR lösen lässt. Zu diesem Zweck sollte ein Selenomethioninderivat des Proteins hergestellt werden. Möglicherweise würde dies auch die extrem gute Löslichkeit von MalM (mindestens 100 mg/ml) etwas herabsetzen, was sich positiv auf die Kristallisation auswirken könnte. Hierfür wurde die Expression des Volllängen MalM in M63 Medium unter Zugabe von SeMet durchgeführt. Auch das SeMet-Derivat des Volllängen MalM wird in einer hohen Ausbeute von den *E. coli* JM83 Zellen im Periplasma produziert und verhielt sich während der chromatographischen Reinigung vergleichbar zu nativem MalM. Auf diese Weise konnten etwa 10 mg des gereinigten SeMet Derivats von MalM aus einer 2 L Expressionskultur gewonnen werden. Leider wurden weder für natives noch für SeMet-markiertes Volllängen MalM initiale Kristallisationsbedingungen gefunden.

4.2.2 Produktion von MalM Fragmenten

MalM weist im Bereich der Aminosäuren 226 bis 251 mehrere Alanine und Proline auf. Vermutlich verbindet dieser erwartungsgemäß strukturell flexible Bereich eine N-terminale und eine C-terminale Domäne miteinander. Auf Grund dieser Flexibilität könnte das Volllängen MalM schwer zu kristallisieren sein. Zusätzlich zum Volllängen MalM wurden daher sowohl ein N- als auch ein C-terminales MalM Fragment kloniert (Abbildung 23).

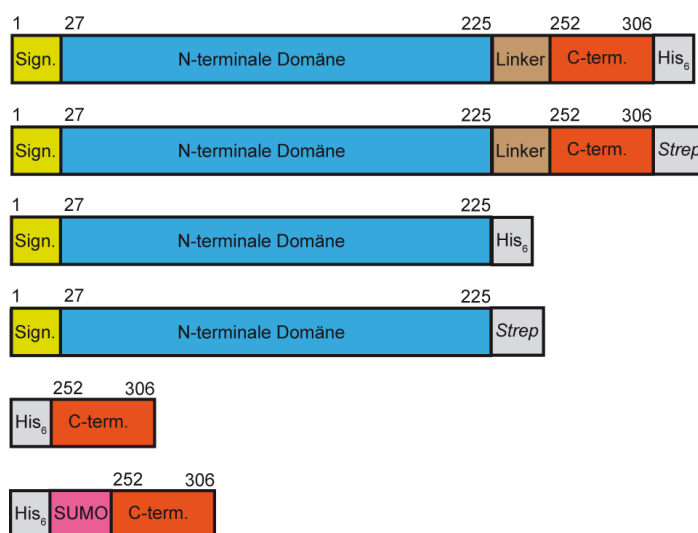


Abbildung 23: Klonierte MalM Konstrukte. Oben ist das Volllängen MalM zu sehen, in der Mitte das Konstrukt der N-terminalen Domäne (blau) und unten das Konstrukt der C-terminalen Domäne (orange). Sign. (gelb) bezeichnet das Signalpeptid, Linker (braun) den vermutlich flexiblen Bereich mit einer hohen Anzahl an Alaninen und Prolinen (vgl. Abbildung 28), His₆ bzw. Strep das Affinitätsanhängsel und SUMO (pink) das *small ubiquitin-like modifier* Protein. Die Zahlen oberhalb der Konstrukte entsprechen der jeweils ersten bzw. letzten Aminosäure des jeweiligen Bereichs.

Auch das N-terminale MalM Fragment wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *E. coli* XL1-blue amplifiziert und anschließend über *Nde*I und *Afe*I auf die Vektoren pASK75Strep und pASK75His kloniert. Das Konstrukt pASK75-MalM225-His wurde in *E. coli* JM83 Zellen bei 22 °C für 4 Stunden in LB Medium exprimiert. Dabei zeigte sich wie für das Volllängen MalM im Periplasmaextrakt eine sehr starke Überexpressionsbande in der periplasmatischen Fraktion sowie einen geringen Teil des Zielproteins in der unlöslichen Fraktion. Der Periplasmaextrakt wurde zweimal bei 4 °C gegen einen Puffer bestehend aus 50 mM HEPES/Na pH 8,0, 500 mM NaCl und 10 mM Imidazol dialysiert und auf eine mit Zn²⁺-Ionen beladene Ida-Sepharose Säule aufgetragen, um eine IMAC durchzuführen. Anschließend wurde MalM₂₇₋₂₂₅-His über eine AEX in einem Puffer mit 25 mM Tris/HCl pH 8,8 und eine SEC in einem Puffer mit 20 mM HEPES/Na pH 8,0 und 150 mM NaCl gereinigt. Bei der AEX eluierte MalM₂₇₋₂₂₅-His als scharfer Peak bei einer Konzentration von etwa 90 mM NaCl (Abbildung 24). Die SEC auf einer Superdex 200 26/60 ergab die Elution des gesamten MalM Proteins in einem einzigen Peak mit leichtem Tailing-Effekt bei einem Volumen von 238,1 ml, der einem Molekulargewicht von etwa 17 kDa und damit dem eines Monomers der N-terminalen Domäne (22 kDa) entspricht (Abbildung 24). Die Ausbeute pro Liter Expressionsmedium betrug etwa 40 mg MalM₂₇₋₂₂₅. Das Protein wurde über Nacht gegen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 dialysiert, konzentriert auf 5 bis 100 mg/ml und für Kristallisationsansätze verwendet (Abschnitt 4.2.6).

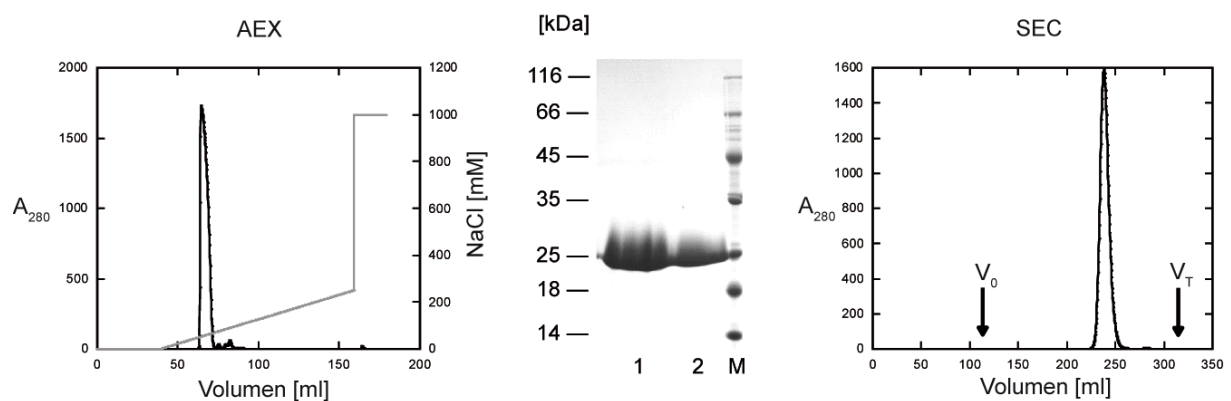


Abbildung 24: Reinigung von MalM₂₇₋₂₂₅. Absorptionsprofil der AEX und der SEC von MalM₂₇₋₂₂₅ sowie das zugehörige SDS-Gel. Spur 1: nach der AEX, Spur 2: nach der SEC, Spur M: Marker.

Auch MalM₂₇₋₂₂₅-His wurde für die Phasenbestimmung als Selenomethionin-Derivat produziert. Auch hier verlief die Reinigung vergleichbar mit der des nativen N-terminalen MalM Fragments. Die entsprechenden AEX wurden vereinigt, gegen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 dialysiert, konzentriert und für Kristallisationsexperimente genutzt.

Der kodierende Bereich der C-terminalen MalM Domäne (Aminosäuren 252–306) wurde mittels PCR von pASK75MalM-His amplifiziert und über *Sfo*I und *Hind*III auf die Vektoren pASKIBA5-plus bzw. pASKIBA35-plus kloniert. Das Affinitätsanhängsel wurde am N-

Terminus des Fragments platziert, wo sich im Volllängen MalM der vermutlich flexible Linker befindet (Abbildung 23). Diese Konstrukte wurden in *E. coli* BL21 bei 22 °C für 6 Stunden exprimiert. In der SDS-PAGE war jedoch keine Überexpressionsbande für dieses Fragment zu erkennen, weder für die Variante mit dem *Strep*-tag II noch für die mit dem His₆-Tag. Auch in den Elutionsfraktionen der SAC fand sich folglich kein lösliches Protein der erwarteten Größe.

Da sich die C-terminale Domäne von MalM also nicht als eigenständiges Protein produzieren ließ, wurde der Versuch unternommen dieses Fragment als Fusionsprotein mit dem *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) zu produzieren (siehe Abschnitt 3.25). Hierfür wurde das Plasmid iba5MalMCDomCyt mit den Restriktionsendonukleasen *SfoI* und *HindIII* verdaut und das entstandene Fragment in einen pSUMO Vektor mit pET Promotor ligiert. Das Konstrukt His-SUMO-MalM₂₅₂₋₃₀₆ wurde in *E. coli* BL21 (DE3) nach Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bei 30 °C für 3 Stunden exprimiert. Das Zellpellet wurde mittels French Press aufgeschlossen und der Überstand über eine mit Zn²⁺-Ionen beladene Ida-Sepharose Säule gereinigt. Dabei zeigte sich, dass das Fusionsprotein in großer Menge produziert wird und fast ausschließlich als lösliches Protein vorliegt. Anschließend wurde in 20 mM HEPES/Na pH 8,0 und 150 mM NaCl eine SEC durchgeführt (Abbildung 25).

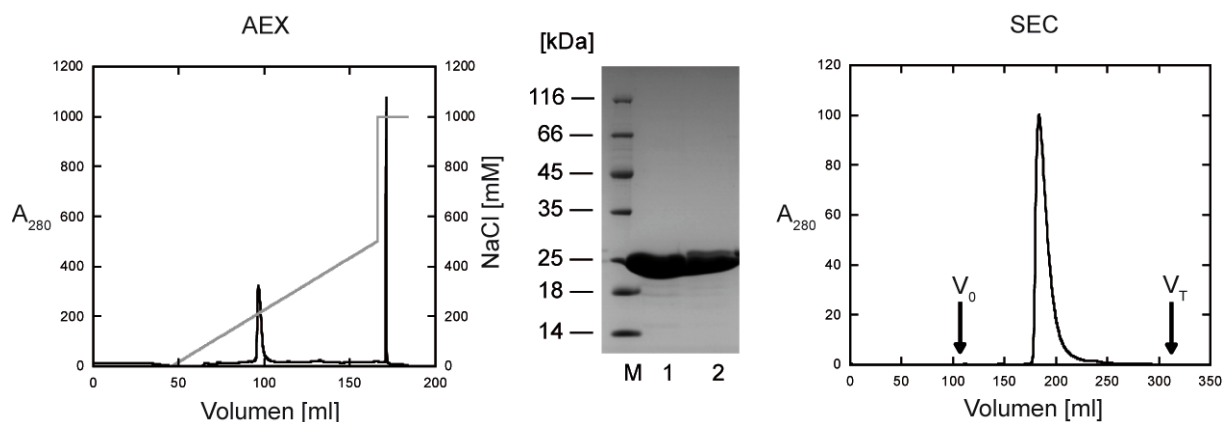


Abbildung 25: Reinigung des Fusionsproteins His-SUMO-MalM₂₅₂₋₃₀₆. Absorptionsprofil der AEX und der SEC des Fusionsproteins aus MalM₂₅₂₋₃₀₆ und SUMO sowie die SDS-Gel der AEX. Spur M: Marker, Spur 1 und 2 entsprechen dem Hauptpeak der AEX.

Das Fusionsprotein His-SUMO-MalM₂₅₂₋₃₀₆ eluiert bei einem Volumen von 183,6 ml, das einem Molekulargewicht von 87 kDa entspricht und damit deutlich mehr als dem Monomer des Fusionsproteins (18 kDa). Das Gewicht von 87 kDa liegt zwar näher am Molekulargewicht eines Pentamers (90 kDa) als dem eines Hexamers, zeigt aber dennoch eine klare Multimerisierung, die augenscheinlich durch die C-terminale Domäne von MalM bewirkt wird. Aus einer 2 L Expressionskultur konnten etwa 20 mg lösliches Fusionsprotein nach der SEC erhalten werden. In 20 mM HEPES/Na pH 8,0 und 150 mM NaCl wurde das so erhaltene Fusionsprotein über Nacht bei 22 °C durch Zugabe von 10 µl (0,7 mg/ml)

SUMO-Protease Ulp1 gespalten und anschließend erneut durch eine "negative" IMAC gereinigt, um abgeschnittene His-SUMO Fragmente, ungeschnittene Fusionsproteine sowie Ulp1, die ein His-Affinitätsanhängsel trägt, abzutrennen. MaIM₂₂₅₋₃₀₆ befindet sich hierbei im Durchlauf der IMAC (Abbildung 26).

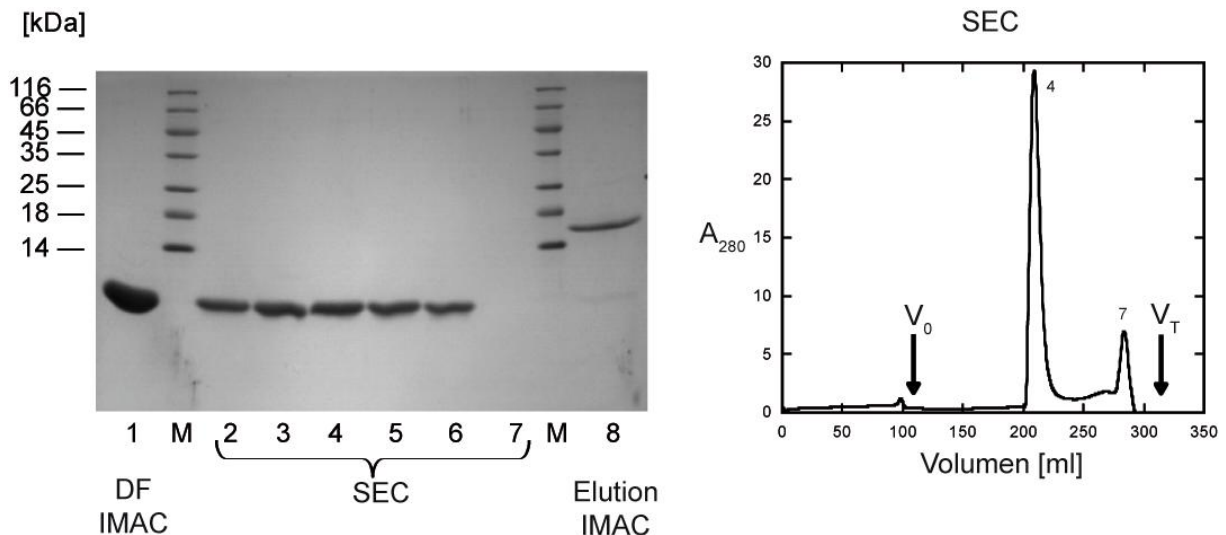


Abbildung 26: Spaltung des Fusionsproteins His₆-SUMO-MaIM₂₅₂₋₃₀₆. Absorptionsprofil der SEC nach der Spaltung des Fusionsproteins His₆-SUMO-MaIM₂₅₂₋₃₀₆ und das zugehörige SDS-Gel. Spur 1: Durchlauf der IMAC direkt nach der Spaltung (MaIM₂₅₂₋₃₀₆), Spuren 2 bis 7: SEC-Fraktionen, Spur 8: Elutionsfraktion der IMAC (His₆-SUMO), Spuren M: Marker.

SEC des IMAC Durchlaufs in 20 mM HEPES/Na pH 8,0 und 150 mM NaCl auf einer Superdex 75 26/60 ergab ein Elutionsvolumen von 209,1 ml für MaIM₂₅₂₋₃₀₆ mit leichtem Tailing-Effekt. Das entspricht einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 6 kDa, was auf ein Monomer schließen lässt. Zusammengefasst heißt das, dass das Vollängen MaIM sowie das Fusionsprotein aus SUMO und der C-terminalen Domäne von MaIM als Hexamer vorliegen, aber sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Domäne alleine als Monomer auftreten. Dies bedeutet, dass die Anwesenheit der C-terminalen Domäne von MaIM zur Hexamerisierung notwendig aber nicht hinreichend ist. Denkbar ist auch, dass die Multimerisierung konzentrationsabhängig ist. So wurden das Vollängen MaIM sowie SUMO-MaIM₂₅₂₋₃₀₆ in einer Konzentration von mindestens 20 mg/ml in den Probenloop für die SEC injiziert, während MaIM₂₅₂₋₃₀₆ in Konzentrationen von weniger als 10 mg/ml aufgetragen wurde.

Fraktionen von MaIM₂₅₂₋₃₀₆ wurden vereinigt, gegen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 oder 20 mM Tris/HCl pH 8,0 und 150 mM NaCl dialysiert, konzentriert und für Kristallisationsexperimente verwendet (Abschnitt 4.2.6).

Da auch für Kristalle des nativen MaIM₂₅₂₋₃₀₆ Fragments das Phasenproblem vermutlich nicht durch MR gelöst werden kann, muss hier ebenfalls ein entsprechendes Schweratomderivat hergestellt werden. Allerdings kommt in der gesamten C-terminalen Domäne nur ein

Methioninrest (Met255) vor. Falls dieser relativ flexibel wäre, könnte das anomale Signal eines SeMet-Derivats zu gering für die Lösung des Phasenproblems sein (Abbildung 28). Deshalb wurden für zukünftige MAD Experimente die Rest Leu280 und Leu282 über QuikChange-Mutagenese zu Methionin mutiert. Die Wahl fiel hierbei auf Leucine, da Leucin und Methionin ähnliche Hydrophobizität und Raumerfüllung aufweisen. Daher sollte ein Austausch vermutlich keine signifikanten Änderungen der Struktur zur Folge haben.

4.2.3 Methylierung von Lysinseitenketten

Aufgrund der guten Löslichkeit von MalM₂₇₋₃₀₆ und MalM₂₇₋₂₂₅ führten die Kristallisationsexperimente mit den nativen Proteinen, selbst bei sehr hohen Proteinkonzentration von bis zu 100 mg/ml und sehr geringer Ionenstärke von 10 mM Tris/HCl, in keiner der getesteten Bedingungen zur Kristallbildung. Außerdem kam es auch nur in sehr wenigen Kristallisationsbedingungen zur Bildung von Präzipitat. Um die Löslichkeit des Proteins zu erniedrigen und die Chancen der Ausbildung von hydrophoben Kontakten der Proteinketten untereinander während der Kristallisation zu erhöhen, wurden die besonders flexiblen Lysinseitenketten methyliert (Abschnitt 3.24). Nach der Methylierung wurden MalM₂₇₋₃₀₆-His und MalM₂₇₋₂₂₅-His in 20 mM HEPES/Na pH 8,0 und 150 mM NaCl gefiltert, um Stabilität und Oligomerisierungsverhalten zu überprüfen, aber auch um überschüssiges Methylierungsreagenz abzutrennen (Abbildung 27).

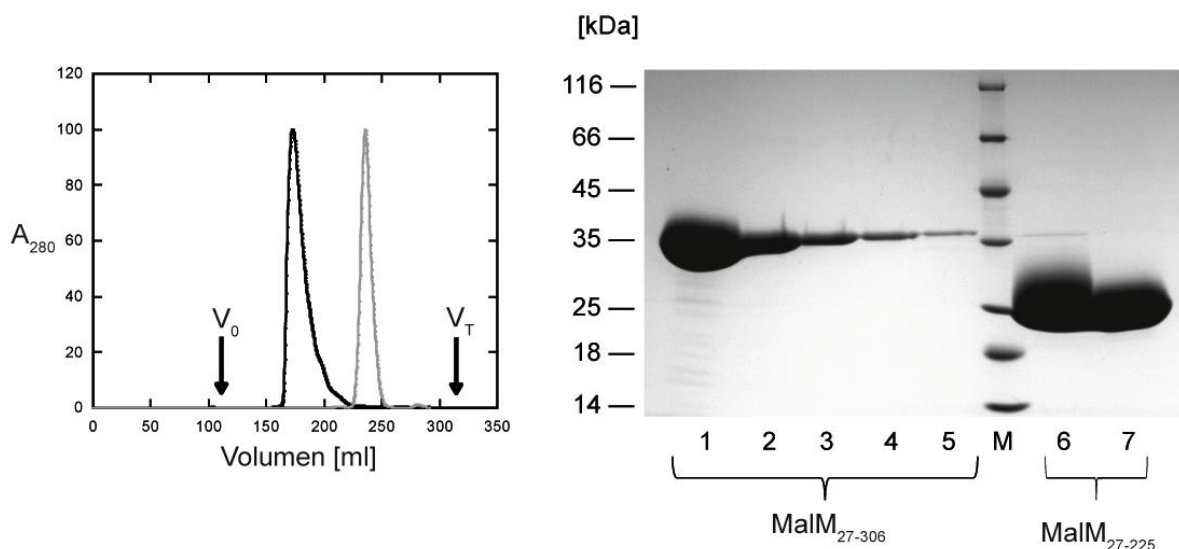


Abbildung 27: SEC der methylierten MalM₂₇₋₃₀₆-His und MalM₂₇₋₂₂₅-His Konstrukte. SEC Absorptionsprofil von MalM (schwarz) und der N-terminalen Domäne von MalM (grau) nach der Methylierung sowie die zugehörigen SDS-PAGE Analysen. Spur 1 und 6: vor der Methylierung, Spur 2 bis 5 und 7: SEC Fractionen nach der Methylierung, Spur M: Marker.

Sowohl für das Volllängen-Konstrukt von MalM als auch die N-terminale Domäne zeigte sich kein Unterschied im Laufverhalten während der SEC zwischen methylierter und nicht-

methylierter Form. Die N-terminale Domäne liegt auch nach der Methylierung noch als Monomer vor, während das Volllänge MalM immer noch ein Hexamer bildet. Um die Effizienz der Proteinmethylierung zu bestimmen, wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass für beide Fragmente jeder Lysin-Rest erwartungsgemäß zweifach methyliert wurde (Abschnitt 4.2.5). Sowohl mit methyliertem MalM₂₇₋₃₀₆-His und MalM₂₇₋₂₂₅-His wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt (Abschnitt 4.2.6).

4.2.4 Reduzierung der Seitenkettenflexibilität an der Proteinoberfläche durch Mutagenese

Da die Erniedrigung der Hydrophilie der Proteinoberfläche durch Methylierung der Lysin-Seitenketten von MalM₂₇₋₂₅₂ und MalM₂₇₋₃₀₆ keinen nennenswerten Effekt auf deren Kristallisierbarkeit hatte, wurde versucht durch Reduzierung der Seitenkettenflexibilität an der Proteinoberfläche von MalM die Kristallisationseigenschaften zu verbessern. Zu diesem Zweck wurden Bereiche in denen sich hydrophile, flexible Aminosäuren wie Lysin, Glutaminsäure und Glutamin in direkter Nachbarschaft zueinander befinden durch hydrophobere, weniger flexible Aminosäuren ausgetauscht (Abbildung 28).

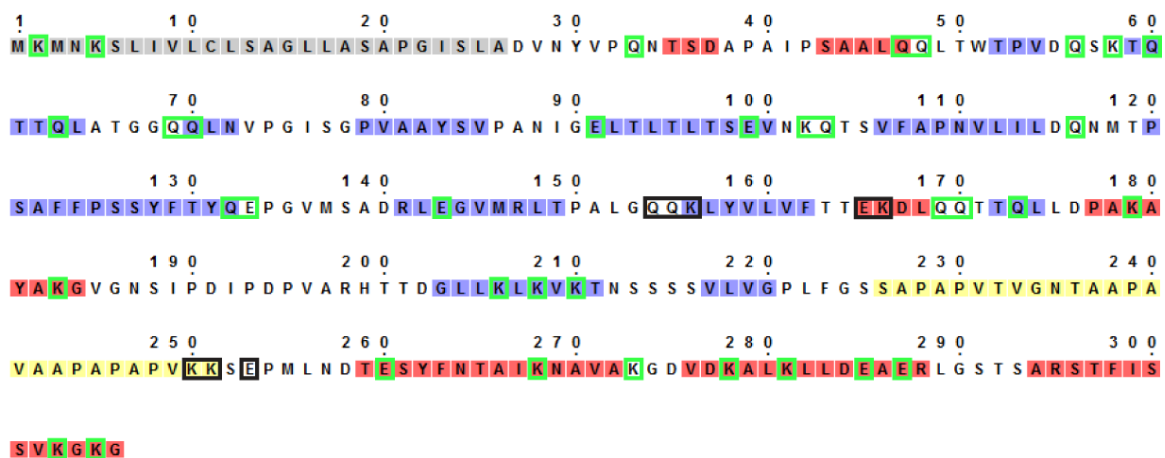


Abbildung 28: Aminosäure-Sequenz von MalM. Das Signalpeptid ist grau unterlegt, der vermutlich flexible, Alanin und Prolin reiche Bereich gelb. Durch den XtalPred-Server (Slabinski *et al.*, 2007b; Jahandideh *et al.*, 2014) vorhergesagte α -helikale Bereiche sind rot unterlegt, β -Strang-Abschnitte blau. Alle Lysine, Glutamine und Glutaminsäuren sind hellgrün umrandet. Die zu Alanin mutierten Aminosäuren sind schwarz umrandet (Q154, Q155, K156, E165, K166, K250, K251 und E253).

Neben der Gitterenthalpie spielt der entropische Beitrag, durch Freisetzung geordneter Wassermoleküle von der Proteinoberfläche eine wichtige Rolle bei der Kristallisation. Dieser wird jedoch durch die Ausbildung definierter Konformationen von ursprünglich flexiblen Aminosäureseitenketten gemindert (Abschnitt 5.2.3) (Derewenda & Vekilov, 2006). Am besten geeignet für die Minimierung dieses entropischen Verlusts schienen die Positionen 154QQK, 165EK und 250KKSE. Alle Glutamin-, Glutaminsäure- und Lysinseitenketten in

diesen Bereichen wurden dabei jeweils durch Alanin ersetzt. Der Austausch der entsprechenden Basentriplets erfolgte durch QuikChange-Mutagenese sowohl für die N-terminale Domäne als auch für das Volllänge MalM. Durch weitere Runden der QuikChange Mutagenese wurden Plasmide mit allen möglichen Kombinationen der drei entsprechenden Mutationsbereiche erzeugt.

Analog zu nativem MalM wurden auch diese Konstrukte in *E. coli* JM83 produziert. Alle Alaninvarianten des Volllänge-MalM zeigten immer noch hohe Ausbeuten in der periplasmatischen Fraktion von *E. coli* JM83. Die gewonnene Menge war jedoch mit 10 mg pro Liter Kulturmedium nach IMAC und SEC vergleichsweise geringer als beim Wildtyp-Protein. Dabei entsprach das Laufverhalten auf der Gelfiltrationssäule für alle Varianten des Volllänge-MalM immer noch dem eines Hexamers (Abbildung 29). Eine erhöhte Tendenz zur Aggregation wurde nicht beobachtet.

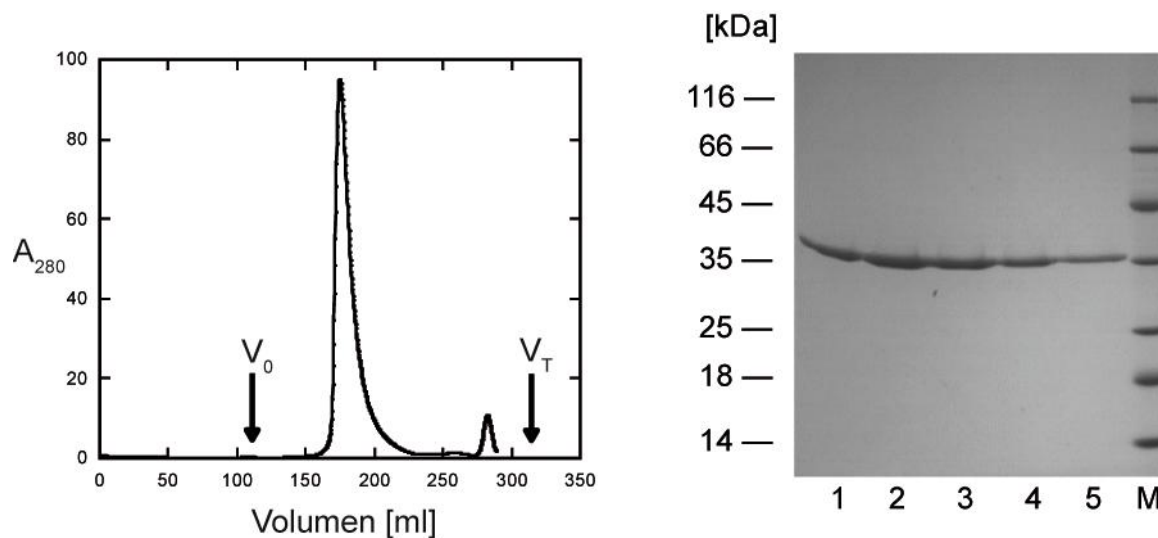


Abbildung 29: Reinigung der Alanin-Mutanten des Volllänge MalM. Absorptionsprofil und SDS-PAGE der SEC der MalM_{27-306, 165AA} Mutante. Spur 1 bis 5: SEC-Faktionen, Spur M: Marker.

Vergleichbar geringere Ausbeuten wurden auch für die Alanin-Varianten der N-terminalen Domäne von MalM nach IMAC und SEC beobachtet. Aber auch diese Proteine zeigen eine vergleichbare Stabilität wie der Wildtyp. Sie eluieren ebenfalls in einem einzigen Peak bei einer NaCl-Konzentration von etwa 90 mM von der AEX Säule und ihr Laufverhalten in der SEC entspricht einem Monomer (Abbildung 30).

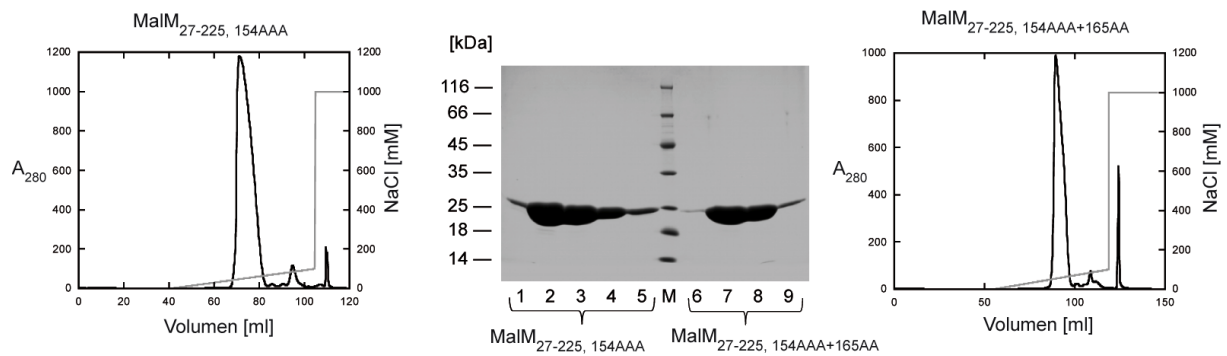


Abbildung 30: Reinigung der Alanin-Mutanten der N-terminalen Domäne von MalM. AEX-Chromatogramme und das zugehörige SDS-Gel der MalM_{27-225, 154AAA} und MalM_{27-225, 154AAA+165AA} Varianten. Spur 1 bis 9: AEX Fraktionen, Spur M: Marker.

Die gereinigten Alanin-Varianten der N-terminalen Domäne von MalM und des Volllängen MalM wurden gegen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 dialysiert, konzentriert und für Kristallisationsexperimente verwendet. Im Fall der N-terminalen Domäne ermöglichte die Einführung der Alanine 154-156 und die Kombination aus 154-156 sowie 165 und 166 die Kristallisation (Abschnitt 4.2.6). Da diese Kristalle jedoch nur eine schwache Diffraktion von Röntgenstrahlung zeigten (siehe Abbildung 34), wurde versucht die Qualität der Kristallpackung zu verbessern. Ein möglicher Ansatz hierfür schien die Einführung von Tyrosin-Resten an den Stellen, an denen sich die neuen Alanine befinden. Diese Mutationen würden den hydrophoberen Charakter der Alanine verstärken, auf der anderen Seite aber auch zwei zusätzliche Rotationsfreiheitsgrade einführen. Möglicherweise sorgen diese Eigenschaften für eine bessere Packung der Protein-Moleküle im Kristall und damit für ein verbessertes Diffraktionsverhalten. Zu diesem Zweck wurde durch QuikChange Mutagenese ein Plasmid erzeugt, das für MalM_{27-225, 154YYY} kodiert. Auch dieses Konstrukt wurde in *E. coli* JM83 für 4 Stunden bei 22 °C produziert. Dabei verhält es sich während der Expression und Reinigung analog zu MalM_{1-225, 154AAA} (siehe Abbildung 31).

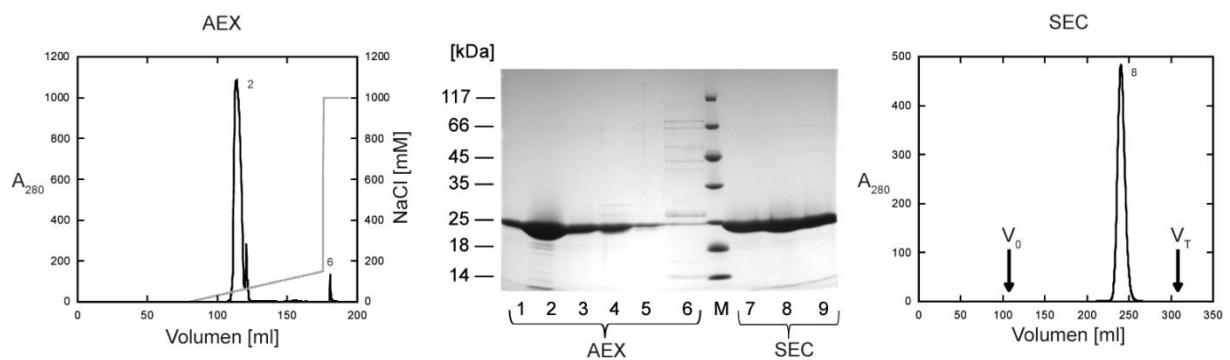


Abbildung 31: Reinigung der Tyrosin Mutante von MalM₂₇₋₂₂₅. AEX und SEC Absorptionsprofil sowie das zugehörige SDS-Gel für MalM_{27-225, 154YYY}. Spur 1 bis 6: AEX-Faktionen, Spur 7 bis 9: SEC-Faktionen, Spur M: Marker.

Auch die Tyrosin-Variante verhielt sich vergleichbar zur nativen N-terminalen Domäne von MalM. Sie liegt ebenfalls als stabiles Monomer vor. Auch dieses Protein wurde gegen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 dialysiert und zum Ansetzen von Kristallisationsexperimenten verwendet.

4.2.5 Bestimmung der MalM Signalpeptid-Sequenz durch Massenspektrometrie

Um die Identität der gereinigten Fragmente von MalM zu überprüfen, wurden die Proteine durch Massenspektrometrie analysiert. Dazu wurden 100 μ l einer durch SEC gereinigten Proteinprobe mit einer Konzentration von etwa 1 mg/ml dreimal gegen einen Puffer aus 10 mM Ammoniumacetat dialysiert und durch ESI-MS untersucht. Das dekonvolvierte Massenspektrum der N-terminalen Domäne von MalM zeigt, dass nur ein Massenpeak bei einem Molekulargewicht von 22187,4 Da beobachtet wurde (Tabelle 6 und Abbildung 32A), während für das Vollängen MalM ein Massenpeak bei 30368,3 Da beobachtet wurde (Tabelle 6 und Abbildung 32B). Die erwartete Masse für die N-terminale Domäne MalM₁₋₂₂₅ beträgt jedoch 24744,2 Da und für das Vollängen MalM₁₋₃₀₆ 32924,4 Da (Werte jeweils inklusive des His₆-Affinitätsanhängsels). Somit ergibt sich eine Massedifferenz von 2556,8 Da für die N-terminale Domäne und 2556,1 Da für das Vollängen MalM. Diese Differenzen entsprechen fast exakt der erwarteten Masse von 2556,2 Da für die ersten 26 Aminosäuren von MalM. Da MalM als periplasmatisches Protein aus dem Cytoplasma in den periplasmatischen Raum exportiert wird, muss es ein Signalpeptid (SP) aufweisen. Die massenspektrometrische Untersuchung legt daher nahe, dass die ersten 26 Aminosäuren dieses Signalpeptid bilden und es beim Export ins Periplasma abgespalten wird, sodass dort dann das reife MalM vorliegt.

Die massenspektrometrische Untersuchung wurde ebenfalls verwendet, um die Effizienz der Methylierung von Lysinseitenketten zu überprüfen. Die gemessene Masse des Hauptpeaks des methylierten MalM₂₇₋₃₀₆ beträgt 30816,3 Da. Dies ergibt eine Differenz von 448,1 Da zum nicht methylierten MalM₂₇₋₃₀₆.

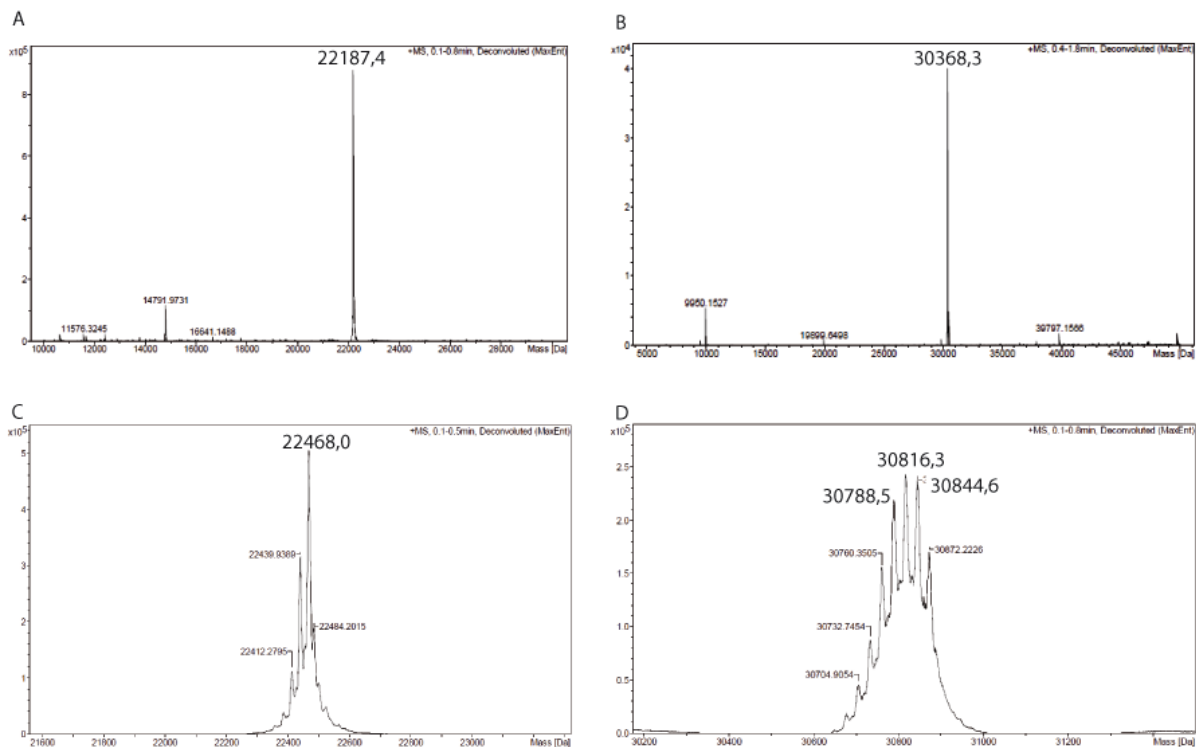


Abbildung 32: Massenspektrometrische Untersuchungen von MaIM. Dekonvolvierte Massenspektren (A) der N-terminalen Domäne von MaIM (B) des reifen MaIM (C) der methylierten N-terminalen Domäne von MaIM (D) des methylierten reifen MaIM.

Jede übertragene Methylgruppe hat ein Molekulargewicht von 15 Da, da aber jeweils ein Wasserstoffatom am Stickstoff der Lysinseitenkette ersetzt wird, bewirkt die Übertragung einer Methylgruppe nur eine tatsächliche Erhöhung der Masse um 14 Da. Die Massendifferenz von 448,1 Da entspricht also genau 32 übertragenen Methylgruppen. Das reife MaIM hat 16 Lysinreste, somit liegt jeder Lysinrest im Durchschnitt doppelt methyliert vor. Die Methylierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins erfolgt dabei über die initiale Bildung einer Schiff'schen Base und deren anschließender Reduktion. Da der pKa Wert des Monomethyl-Lysins etwas geringer ist als der des nicht methylierten Lysins, kommt es schnell zur Bildung des dimethylierten Produkts (Rayment, 1997). Die erhaltenen Massenspektren zeigen das Auftreten von mehreren Nebenpeaks, die jeweils um 28 Da geringer bzw. größer sind als der Hauptpeak. Diese Differenzen entsprechen jeweils zwei Methylgruppen. Eine kleinere Masse entspricht einer unvollständigen Methylierung, während eine erhöhte Masse einer zusätzlichen doppelten Methylierung der freien N-terminalen Aminogruppe des Peptidrückgrates entsprechen könnte (Rayment, 1997). Für die N-terminale Domäne ergibt sich analog eine Massendifferenz von 280,0 Da, die 20 Methylgruppen entspricht. Da MaIM₂₇₋₂₂₅ 10 Lysine enthält, liegt somit auch hier jede dieser Seitenketten durchschnittlich doppelt methyliert vor.

Tabelle 6: Massenspektrometrische Analyse von reifem MalM und MalM Fragmenten (jeweils mit dem C-terminalen Affinitätsanhängsel -SAHHHHHH).

	Erwartete Masse [Da]	Gemessene Masse [Da]
MalM ₁₋₂₂₅ (N-term. Dom.+SP)	24744,2	-
MalM ₂₇₋₂₂₅ (N-term. proz.)	22188,0	22187,4
MalM ₂₇₋₂₂₅ methyliert	22468,0	22468,0
MalM ₁₋₃₀₆ (Volllängenprotein)	32924,4	-
MalM ₂₇₋₃₀₆ (reifes MalM)	30368,2	30368,3
MalM ₂₇₋₃₀₆ methyliert	30816,3	30816,2

4.2.6 Kristallisations-Experimente

Von allen über die AEX oder SEC gereinigten MalM Fragmenten und Mutanten wurden 200 nl Protein mit 200 nl Reservoirlösung gemischt und im sitzenden Tropfen über 100 µl der Reservoirlösung bei 4 °C oder 22 °C inkubiert. Tabelle 7 zeigt alle mit MalM und MalM Fragmenten durchgeführten Kristallisationsexperimente.

Initiale Kristallisationsbedingungen wurden in hängenden Tropfen aus 1 µl Proteinlösung und 1 µl Reservoirlösung über einem Volumen aus 1 ml Reservoirlösung weiter verfeinert. Keine der nativen MalM Varianten war für die Kristallisation geeignet. Auch die Methylierung der Lysinseitenketten konnte die Situation nicht verbessern. Die Mutation der Aminosäurereste 154–156 zu Alanin (154–156-Ala) zur Senkung der Oberflächenentropie führte zur reproduzierbaren Kristallisation der N-terminalen Domäne von MalM. Der Austausch der gleichen Reste durch Tyrosin war dagegen nicht erfolgreich. Die Mutation der Aminosäuren 165–166 zu Alanin führte nur in Kombination mit 154–156-Ala zur Kristallbildung. Vermutlich ist die Kristallisation der Doppelvariante ausschließlich auf den Bereich 154-156-Ala zurückzuführen. Im Gegensatz dazu war die Kristallisation dieser Alaninvarianten beim reifen MalM nicht erfolgreich.

Bei einer Konzentration von 25 mg/ml konnte MalM₂₇₋₂₂₅(154AAA) in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 unter folgenden Bedingungen kristallisiert werden: (A) 2,2 M KCl, (B) 15 % (w/v) PEG-8000, 500 mM Li₂SO₄, (C) 2 % (w/v) PEG-8000, 1 M Li₂SO₄, (D) 20 % (w/v) PEG-3350, 200 mM Na₂SO₄, (E) 50 mM Na-Cacodylat pH 6,0, 1 M Li₂SO₄, 10 mM MgCl₂ und (F) 100 mM Bis-Tris/Na pH 5,5, 3 M NaCl. Dabei bildeten sich hexagonale Platten mit einer maximalen Kantenlänge von etwa 100 µm (Abbildung 33).

Tabelle 7: Kristallisationsexperimente mit MalM Proteinvarianten.

Protein	Puffer	Temperatur	Reinigungs-schritte	Additiv	Kristalle
MalM ₂₇₋₃₀₆	20 mM HEPES/Na pH 8,0, 150 mM NaCl	22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₃₀₆	10 mM Tris/HCl pH 8,0	4 °C, 22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo, Maltose	Nein
MalM ₂₇₋₂₂₅	20 mM HEPES/Na pH 8,0, 150 mM NaCl	22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₂₂₅	10 mM Tris/HCl pH 8,0	4 °C, 22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo Maltose	Nein
MalM ₂₇₋₃₀₆ , methyliert	10 mM Tris/HCl pH 8,0	4 °C, 22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₂₂₅ , methyliert	10 mM Tris/HCl pH 8,0	4 °C, 22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₃₀₆ SeMet	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₂₂₅ SeMet	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₂₂₅ , 154AAA	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC und AEX	Apo	Ja
MalM ₂₇₋₂₂₅ , 154AAA SeMet	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC und AEX	Apo	Ja
MalM ₂₇₋₂₂₅ , 165AA	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC und AEX	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₂₂₅ , 154AAA+165AA	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC und AEX	Apo	Ja
MalM ₂₇₋₂₂₅ , 154AAA+165AA SeMet	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC und AEX	Apo	Ja
MalM ₂₇₋₃₀₆ , 154AAA	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₃₀₆ , 165AA	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₃₀₆ , 250AASA	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₃₀₆ , 154AAA+165AA	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₇₋₃₀₆ , 154YYY SeMet	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₅₂₋₃₀₆	10 mM Tris/HCl pH 8,0	22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo	Nein
MalM ₂₅₂₋₃₀₆	20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl	22 °C	IMAC, AEX und SEC	Apo	Ja

Auch MalM₂₇₋₂₂₅(154AAA, 165AA) konnte in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 mit einer Konzentration von 25 mg/ml unter ähnlichen Bedingungen wie MalM₂₇₋₂₂₅(154AAA) kristallisiert werden: (A) 3M NaCl, 100 mM Bis-Tris/NaOH pH 6,5, (B) 2,5 % (v/v) Isopropanol, 1 M Ammoniumsulfat, (C) 20 % (w/v) PEG-3350, 200 mM Na₂SO₄. Auch hier bildeten sich Proteinkristalle der gleichen hexagonalen Morphologie, mit einer maximalen Kantenlänge von etwa 200 µm (Abbildung 33).

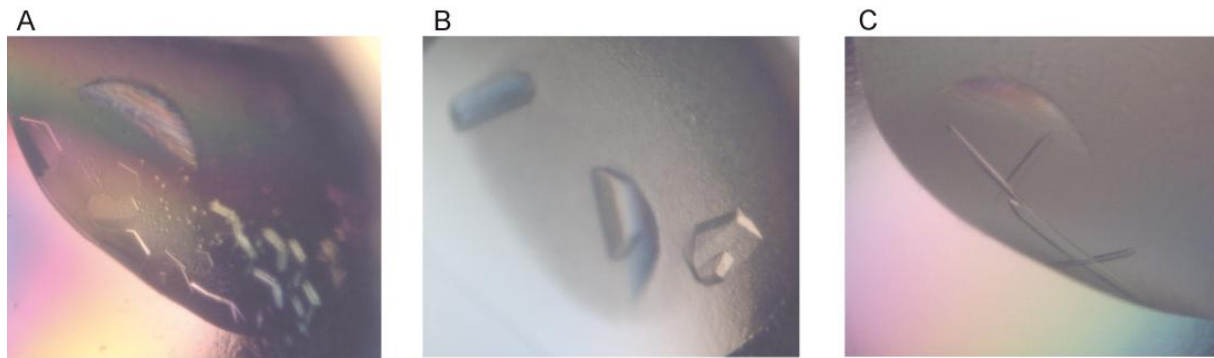


Abbildung 33: Kristalle von MalM Fragmenten. (A) MalM₂₇₋₂₂₅(154AAA) mit einer Reservoiirlösung aus 15 % (w/v) PEG-8000, 500 mM Li₂SO₄. (B) MalM₂₇₋₂₂₅(154AAA, 165AA) mit einer Reservoiirlösung aus 2,5 % (v/v) Isopropanol, 1 M Ammoniumsulfat und (C) MalM₂₅₂₋₃₀₆ mit einer Reservoiirlösung aus 15 % (v/v) Ethanol, 100 mM CHES/Na pH 9,5.

Auch Selenomethioninderivate von MalM₂₇₋₂₂₅(154AAA) und MalM₂₇₋₂₂₅(154AAA, 165AA) kristallisierten bei gleichem Probenpuffer und gleicher Konzentration unter ähnlichen Bedingungen wie die unmarkierten Proteine mit hexagonaler Morphologie: (A) 2,2 M KCl und (B) 100 mM Na-Citrat pH 5,6 und 16 % (w/v) PEG-8000.

Kristallisationsansätze für die C-terminale Domäne MalM₂₅₂₋₃₀₆ in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 führten selbst bei einer geringeren Proteinkonzentration von 10 mg/ml im Unterschied zur N-terminalen Domäne zu einem sehr hohen Anteil an Kristallisationstropfen mit sofortiger Präzipitation aber nicht zur Kristallisation. Dagegen konnte MalM₂₅₂₋₃₀₆ bei moderater Ionenstärke in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 und 150 mM NaCl und einer Konzentration von 15 mg/ml kristallisiert werden. Auf diese Weise gab es auch deutlich weniger Bedingungen mit Niederschlagsbildung. In folgenden Bedingungen mit Ethanol oder PEG verschiedener Länge als Fällungsmittel kam es zur Bildung von meist nadelförmigen, etwa 10 µm dünnen Kristallen: (A) 6 % (w/v) PEG-20000, 100 mM MES/Na pH 6,5, (B) 15 % (v/v) Ethanol, 100 mM CHES/Na pH 9,5, (C) 2 % (w/v) PEG-4000, (D) 10 % (v/v) Ethanol, 100 mM CAPS/Na pH 10,5 und (E) 5 % (w/v) PEG-4000 (Abbildung 33).

Die erhaltenen Kristalle wurden nach der Zugabe von dreimal jeweils 1 µl 25 % (v/v) Ethylenglykol und 10 mM Tris/HCl pH 8,0 in der jeweiligen Reservoiirlösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zunächst in flüssigem Stickstoff gelagert, bevor sie zur Durchführung von Röntgenbeugungs-Experimenten verwendet wurden.

4.2.7 Röntgenbeugungs-Experimente und vorläufige Auswertung

Die Röntgen-Diffraktionsexperimente mit den Kristallen von MalM₂₇₋₂₂₅(154AAA) an der Beamline 14.1 des BESSY bestätigten die hexagonale Symmetrie der Proteinkristalle. Allerdings war die Streuqualität dieser Kristalle nicht ausreichend für eine Strukturbestimmung. Dennoch wurde von einem Kristall des SeMet-Derivats von

MalM₂₇₋₂₂₅(154AAA), aus einem Kristallisationstropfen mit 20 % (w/v) PEG-3350 und 200 mM Na₂SO₄, ein Datensatz am Absorptionspeak von Selen und ein weiterer im sogenannten *high energy remote* Bereich gemessen. Die Auflösung war allerdings mit etwa 7 Å sehr gering. Zudem war auch die Qualität des anomalen Signals der gemessenen Datensätze unzureichend für eine experimentelle Strukturbestimmung. Es war nicht einmal möglich zweifelsfrei zu ermitteln, ob es sich bei der 6-zähligen Achse des P622 Gitters um eine Schraubenachse handelt (Abbildung 34 und Tabelle 8).

Der mittels MATTPROB (<http://www.ruppweb.org/mattprob/default.html>) (Kantardjieff & Rupp, 2003) berechnete Matthews-Koeffizient (V_M) für den Proteinkristall der N-terminalen MalM-Domäne legt nahe, dass sich vermutlich 12 bis 15 Moleküle in der asymmetrischen Einheit befinden. Bei 12 Molekülen ergibt sich ein V_M von 2,71 Å³/Da, der einem Lösungsmittelanteil von etwa 55 % entspricht. Dabei führt die Achsenlängen mit über 200 Å für alle drei Seiten zu einem relativ großen Volumen der Einheitszelle.

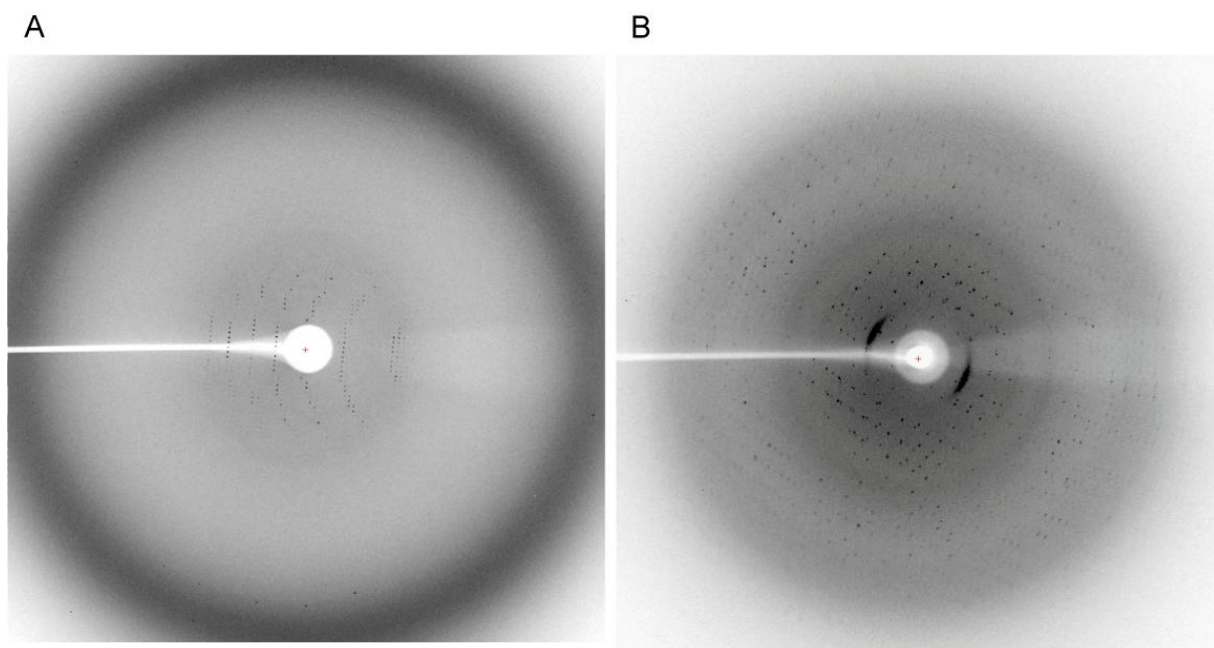


Abbildung 34: Röntgenbeugungsbilder der am besten streuenden Kristalle von MalM Fragmenten. (A) MalM_{27-225, 154AAA} (SeMet) bei der High energy remote Wellenlänge, (B) Nativer Kristall von MalM₂₅₂₋₃₀₆.

Die Zellparameter des *remote high* und *peak* Datensatzes von MalM_{27-225, 154AAA} (SeMet) sollten identisch sein, da sie vom identischen Proteinkristall gemessen wurden (Tabelle 8). Möglicherweise kam es hier bereits zu Strahlenschäden durch intensive Belichtung am Selenabsorptionspeak. Auch von einem Kristall der C-terminalen Domäne von MalM, aus einer Kristallisationsbedingung mit 15 % (v/v) Ethanol, 100 mM CHES/Na pH 9,5, wurde an der Beamline 14.1 des BESSY ein Röntgendiffraktionsdatensatz gemessen. Die Auflösung betrug etwa 2,8 Å und der Kristall gehört zu der Basisflächen-zentrierten, orthorhombischen Raumgruppe C222₁ (Nummer 20) (Abbildung 34 und Tabelle 8). Auch für den Kristall der C-

terminalen Domäne von MalM ergibt der Matthews-Koeffizient eine wahrscheinliche Anzahl von 12 bis 15 Molekülen pro asymmetrische Einheit. Hier ist ebenfalls die asymmetrische Einheit mit Achsenlängen von 53, 113 und 255 Å für ein weniger als 6 kDa großes Protein relativ groß. Da die C-terminale Domäne vermutlich für die Hexamerisierung von MalM verantwortlich ist, liegt die Vermutung nahe, dass sich zwei Hexamere, und somit 12 Monomere in der asymmetrischen Einheit befinden. Dies würde bedeuten, dass der Lösungsmittelanteil ebenfalls bei etwa 55 % liegen dürfte.

Tabelle 8: Statistik der Datensammlung der besten Kristalle von MalM Fragmenten. Die Zahlenwerte in den Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Das X in der Beschreibung der Raumgruppe deutet eine mögliche Schraubenachse an.

	MalM _{27-225, 154AAA} (SeMet)		MalM ₂₅₂₋₃₀₆
	Peak	Remote high	
Raumgruppe	P6 _x 22	P6 _x 22	C222 ₁
Einheitszelle [Å]	a = b = 221,47; c = 203,77;	a = b = 221,84; c = 204,08;	a = 52,96; b = 112,82; c = 255,44;
[°]	α = β = 90,0; γ = 120,0	α = β = 90,0; γ = 120,0	α = β = γ = 90,0
Wellenlänge [Å]	0,9798	0,9786	0,9184
Auflösung [Å]	43,01-6,74 (7,14-6,74)	49,65-5,75 (6,09-5,75)	47,12-2,82 (2,99-2,82)
Vollständigkeit [%]	99,3 (99,8)	99,1 (96,8)	99,6 (97,9)
Einzigartige Reflexe	5563 (853)	8825 (1340)	18839 (2916)
Multiplizität	10,3 (10,8)	10,6 (10,5)	8,2 (8,0)
Mittleres I/σ(I)	6,17 (0,48)	5,29 (0,22)	12,17 (2,27)
R _{meas} [%]	44,3 (497,0)	51,0 (1402,6)	18,9 (101,4)
Wilson B-Faktor [Å ²]	397,34	410,35	49,92

Allerdings konnte das Phasenproblem nicht durch die Methode des Molekularen Ersatzes gelöst werden. Zu diesem Zweck wurden über eine Homologie-Suche mit der Aminosäuresequenz von MalM₂₅₂₋₃₀₆ mittels des HHpred-Servers (Soding *et al.*, 2005) nach den nächsten verwandten und in der PDB hinterlegten Proteinstrukturen gesucht. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit wurden folgende Strukturen als Suchmodell zur Durchführung der MR Berechnung mit PHASER getestet: Das Enzym IIA des Lactose spezifischen PTS aus *Lactococcus lactis* (2E2A, noch nicht publiziert) [40 % Sequenzidentität], das Enzym IIA des *E. coli* Phosphotransferase System für N,N'-Diacetylchitobiose (1WCR; (Tang *et al.*, 2005)) [27 % Sequenzidentität] und das Enzym IIA des PTS für Cellobiose aus *Bacillus anthracis* (3K1S, noch nicht publiziert) [20 % Sequenzidentität]. Außerdem wurde eine Molekulare Ersatz-Rechnung mit einem idealen α-Helix-Modell aus Alaninen durchgeführt, da die C-terminale Domäne von MalM vermutlich aus einem Bündel von drei α-Helices besteht.

4.3 Die Amylomaltase MalQ

4.3.1 Klonierung, Expression und Reinigung

Ausgehend von der Aminosäuresequenz der Amylomaltase wurde versucht, ein Konstrukt herzustellen, das möglichst gut für die Kristallisation geeignet ist, aber die strukturell unbekannte N-terminale Domäne umfasst. Die MalQ Sequenz enthält am C-Terminus eine ungewöhnliche Abfolge von vier Arginin-, drei Alanin- und drei Lysinresten, die zu einer stark positiven Ladung des C-Terminus führen und vermutlich strukturell ungeordnet vorliegen. Daher wurde beschlossen diese Aminosäuren im Expressionskonstrukt auszulassen und stattdessen am C-Terminus das Affinitätsanhängsel zu platzieren. Die Amplifikation von *malQ* erfolgte aus genomischer DNA einer Kolonie *E. coli* XL1-blue unter Einführung der Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *AfeI*. Anschließend wurde *malQ* über *NdeI* und *AfeI* auf die Vektoren pASK75Strep und pASK75His kloniert, um MalQ mit C-terminalem His₆ (MalQ₁₋₆₈₄-SA-HHHHHH, MalQ₁₋₆₈₄-His) bzw. Strep-tag II (MalQ₁₋₆₈₄-SA-WSHPQFEK, MalQ₁₋₆₈₄-Strep) produzieren zu können.

Beide Konstrukte zeigten bei der Expression in *E. coli* BL21 Zellen bei 22 °C für 6 Stunden eine starke Überexpression. Der größte Teil der produzierten Proteine befand sich in der löslichen Fraktion. Jedoch zeigten beide Proteinvarianten nur eine geringe Bindung an das Säulenmaterial während der Affinitätsreinigung über IMAC und SAC. Dennoch wurden die IMAC bzw. SAC Fraktionen vereinigt und gegen einen Puffer aus 20 mM Tris/HCl pH 8,0 und 2 mM BME dialysiert, um eine AEX durchzuführen. Das verkürzte MalQ₁₋₆₈₄ zeigte bei der Dialyse gegen einen Puffer aus 20 mM HEPES/Na pH 8,0 und 2 mM BME für die AEX keine Tendenz zur Präzipitation. Allerdings ergab die Elution mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 300 mM keinen scharfen Elutionspeak, sondern mehrere sich überlagernde Peaks. Außerdem zeigte die Elution mit 1 M NaCl, dass ein großer Teil des Proteins erst bei sehr hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert, was auf unspezifische Interaktion mit dem Säulenmaterial schließen lässt. Die Fraktionen der frühen Proteinpeaks wurden vereinigt und gegen SEC Puffer mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl und 2 mM BME dialysiert. Die anschließende SEC ergab einen großen Anteil an monomerem MalQ₁₋₆₈₄-His, jedoch lag MalQ₁₋₆₈₄-Strep größtenteils als undefiniertes Multimer sowie Aggregat vor. Dennoch wurden die jeweiligen Monomerfraktionen vereinigt und für Kristallisationsexperimente verwendet. Aufgrund der schlechten Bindung dieser MalQ Konstrukte an die verwendeten Affinitätsmaterialien lag die Vermutung nahe, dass die Affinitätsanhängsel nicht vollständig zugänglich sind oder möglicherweise sogar lokal die Struktur von MalQ beeinflussen könnten. Um diesem Problem zu begegnen, wurde das bestehende MalQ₁₋₆₈₄-His Konstrukt um die vier nativen Argininreste 685-688 zu MalQ₁₋₆₈₈-His verlängert. Ausgehend von

pASK75-MalQ₁₋₆₈₄-His wurden die vier Argininreste, einschließlich Restriktionsschnittstellen für die Klonierung mit *Nde*I und *Afe*I, über entsprechende Primer mittels PCR eingeführt. Die Expression von MalQ₁₋₆₈₈-His erfolgte wieder in *E. coli* BL21 bei 22 °C für 6 Stunden. Die gebildete lösliche Proteinmenge war deutlich höher als für die Konstrukte ohne Arginine. Auch bei der IMAC konnte eine erheblich größere Menge an Protein gebunden und eluiert werden als zuvor. Anschließend wurde MalQ₁₋₆₈₈-His gegen 20 mM HEPES/Na pH 8,0 und 2 mM BME für die AEX dialysiert (Abbildung 35).

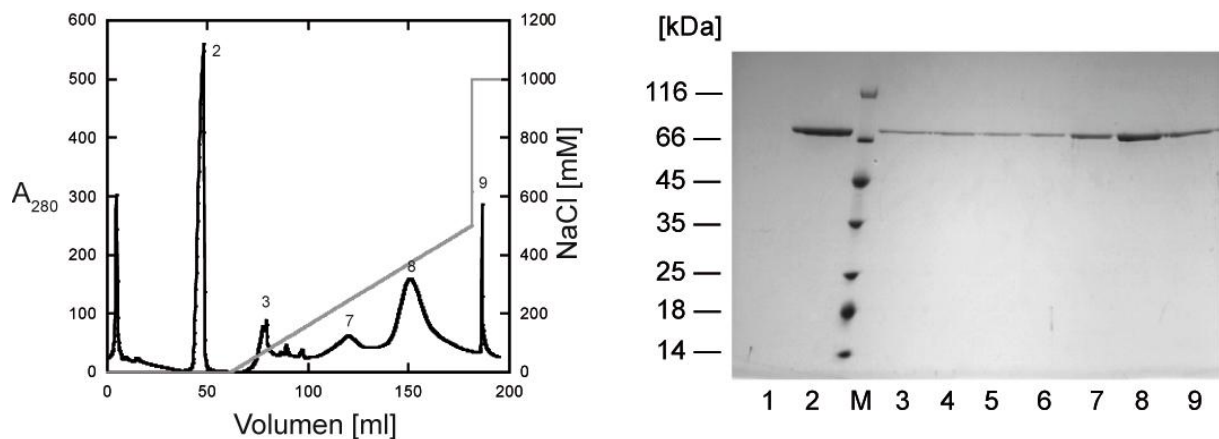


Abbildung 35: Anionen-Austausch-Chromatographie des MalQ₁₋₆₈₈-His. Spur M: Marker, Spur 1 bis 9: entsprechen dem jeweiligen Peak.

Hierbei zeigte sich ein ähnliches Verhalten wie für MalQ₁₋₆₈₄-His. MalQ₁₋₆₈₈-His eluierte in einem sehr breiten Peak bei einer ungewöhnlich hohen Salzkonzentration ab etwa 350 mM NaCl oder gar erst bei einer Konzentration von 1 M NaCl (Abbildung 35). Um einen möglichen Stress für das Protein bei geringen Salzkonzentrationen zu vermindern, wurde MalQ₁₋₆₈₄-His direkt nach der Affinitätsreinigung gegen SEC Puffer mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM BME dialysiert. Jedoch zeigte diese Maßnahme auch keine Verbesserung der Ausbeute an monomerem MalQ₁₋₆₈₈-His während der SEC. Es bildete sich zwar kaum Aggregat, dafür war aber auch der Anteil an monomerem Protein sehr gering. Die Elution ergab einen sehr breiten Peak, der als größere, undefinierte Oligomere interpretiert wurde (Abbildung 36).

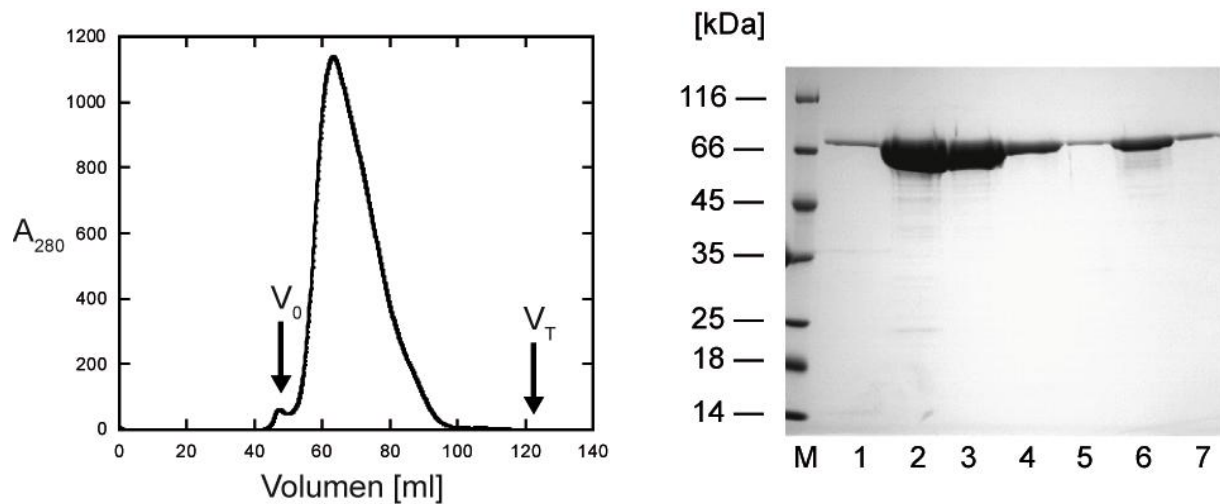


Abbildung 36: Gelfiltration des MalQ₁₋₆₈₈-His. Spur M: Marker, Spur 1 bis 9: SEC Fraktionen.

Da MalQ₁₋₆₈₈-His unter den getesteten Pufferbedingungen nicht als definiertes Monomer oder Oligomer vorlag, wurden weitere Puffer getestet. Hierfür wurden die im SEC Puffer enthaltenen 150 mM NaCl entweder durch 500 mM NaCl ersetzt oder 500 mM Betain zugegeben. Während sich das Laufverhalten nach Zugabe von Betain kaum unterschied, überführte die erhöhte Salzkonzentration von 500 mM NaCl den größten Teil der Amylomaltase in die monomere Form (Abbildung 37). Außerdem konnte durch wiederholte SEC gezeigt werden, dass dieses monomere Protein bei 4 °C über mehrere Wochen stabil gelagert werden kann. Das so gereinigte MalQ₁₋₆₈₈-His wurde nun für Kristallisationsexperimente und enzymatische Assays verwendet.

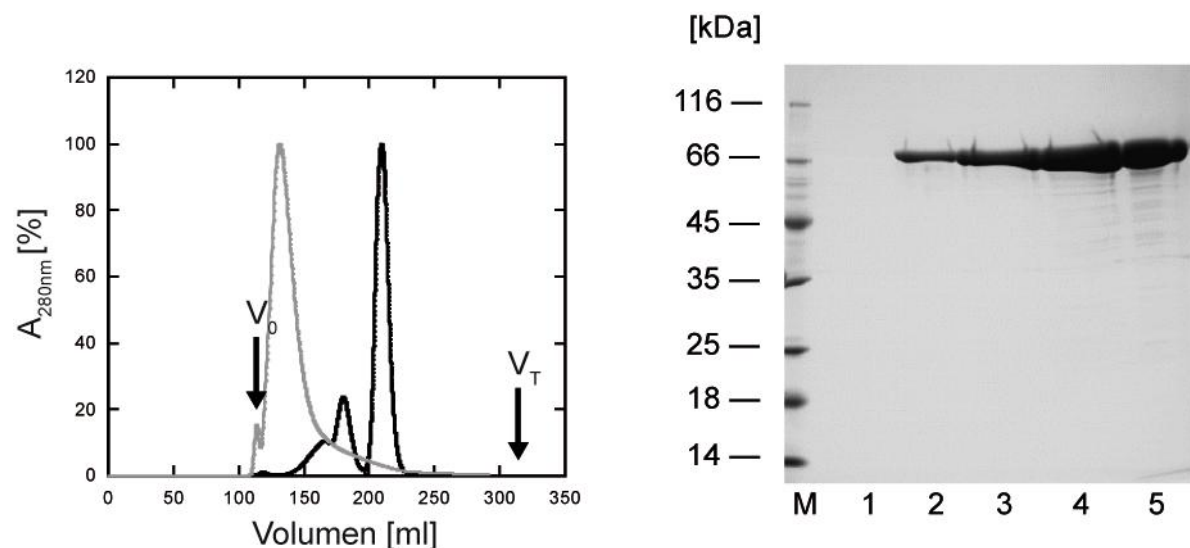


Abbildung 37: SEC von MalQ₁₋₆₈₈-His in Puffern mit stabilisierenden Additiven. Schwarz 500 mM NaCl, grau 500 mM Betain. Spur M: Marker, Spur 1 bis 4: SEC mit NaCl, Spur 5: SEC mit Betain.

4.3.2 Kristallisations-Experimente

Die Kristallisationsansätze mit MalQ₁₋₆₈₄-His führten in keinem der verwendeten hausgemachten Vektor-Screens zu Kristallbildung. Dagegen zeigte MalQ₁₋₆₈₈-His bei einer Proteinkonzentration von 13 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 2 mM BME nach ein bis zwei Wochen bei 22 °C mehrere Bedingungen mit Proteinkristallen (Abbildung 38).

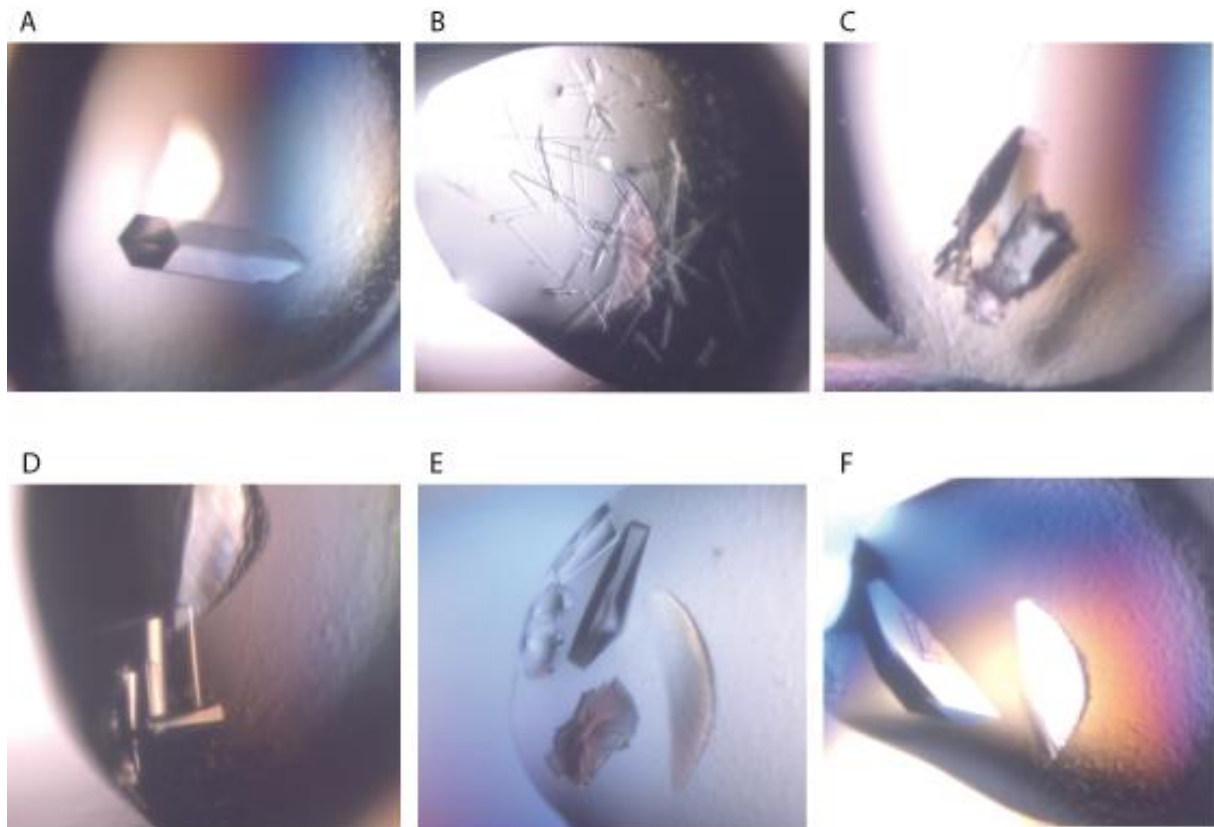


Abbildung 38: Kristalle der Amylomaltase. (A) 8 % (w/v) PEG-8000, 100 mM HEPES/Na pH 7,0 (B) 1,2 M Natriumcitrat (C) 20 % (w/v) PEG-3350, 200 mM KI (D) 50 mM Na-Cacodylat pH 6,0, 10 % (w/v) PEG-4000, 10 mM CaCl₂, 200 mM KCl (E) 8 % (w/v) PEG-20000, 100 mM Na-Acetat pH 5,5, 300 mM Na-Acetat, 8 % (v/v) PEGMME-550 (F) 20 % (w/v) PEG-3350, 200 mM NaH₂PO₄.

Die Amylomaltase-Proteinkristalle bildeten sich dabei hauptsächlich in Bedingungen mit PEG mit unterschiedlichen Kettenlängen. Es traten sowohl hexagonale Kristalle auf, die sich zumeist innerhalb weniger Tage bildeten, als auch orthorhombische Kristalle, die sich häufig erst nach zweiwöchiger Inkubation bildeten. Die Kristalle hatten eine maximale Kantenlänge von bis zu 400 µm.

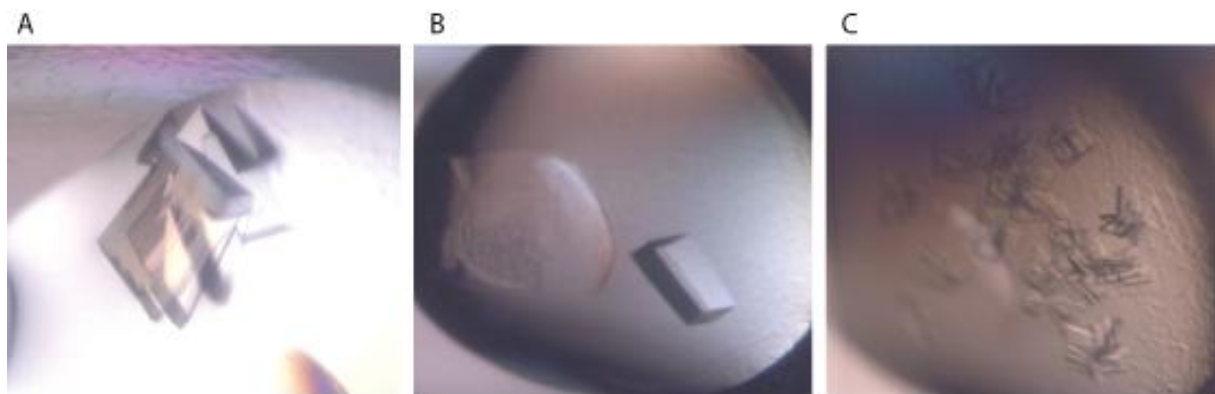


Abbildung 39: Kristalle des SeMet-Derivats der Amylomaltase. (A) 20 % (w/v) PEG-3350, 200 mM NaCl, 100 mM Bis-Tris/Na pH 5,5 (B) 25 % (w/v) PEG-8000, 200 mM LiCl (C) 18 % (w/v) PEG-8000, 100 mM MES/Na pH 6,5.

Die Datensammlung an nativen MalQ₁₋₆₈₈-His zeigte, dass sich das Phasenproblem nicht mit der Methode des Molekularen Ersatzes lösen lässt (Abschnitt 4.3.3). Um eine experimentelle Bestimmung der Phasen zu ermöglichen, wurde ein Schwermetall-Derivat der Kristalle benötigt. Zu diesem Zweck wurde MalQ₁₋₆₈₈-His als Selenomethionin-markiertes (SeMet) durch Expression in M63 Medium mit *E. coli* BL21 Stämmen bei 22 °C über Nacht produziert. Die Reinigung erfolgte analog der des nativen Proteins. Auch MalQ₁₋₆₈₈-His-SeMet war in dem Puffer aus 20 mM HEPES/Na pH 8,0, 500 mM NaCl und 2 mM BME über mehrere Wochen als Monomer stabil und konnte unter ähnlichen Bedingungen wie das native Protein erfolgreich kristallisiert werden (Abbildung 39). Für die Messung der Röntgenbeugungsdatensätze am BESSY Synchrotron in Berlin wurden Kristalle aus den in Tabelle 9 aufgeführten Bedingungen verwendet.

Tabelle 9: Bedingungen, die zu streufähigen Kristallen von MalQ führten.

Konstrukt	Ligand	Kristallisationsbedingung
MalQ ₁₋₆₈₈ (SeMet)	Acarbose	20 % (w/v) PEG-3350, 200 mM NaCl
MalQ ₁₋₆₈₈	Acarbose	20 % (w/v) PEG-3350, 200 mM NaH ₂ PO ₄
MalQ ₁₋₆₈₈	Maltotriose	20 % (w/v) PEG-3350, 200 mM KCl
MalQ ₁₋₆₈₈	-	1,2 M Na ₃ Citrat

Die Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Datensammlung am Synchrotron in flüssigem Stickstoff gelagert. Als Cryo-Puffer wurden den Reservoirlösungen jeweils dreimal 1 µl 25 % (v/v) Ethylenglykol, 10 mM Tris/HCl pH 8,0 und 250 mM NaCl vor dem Schockfrieren zugesetzt.

4.3.3 Datensammlung für Röntgendiffraktions-Experimente an MalQ

Die Messung der Röntgendiffraktionsdaten ergab vier verschiedene Kristallformen für die Amylomaltase. Die Kristalle in der hexagonalen Form, die sich häufig bereits über Nacht bildeten, wirkten sehr zerbrechlich bei der Überführung in die Cryo-Lösung. Nur bei NaCl Konzentrationen oberhalb 250 mM im Cryo-Puffer ließen sich diese Kristalle überhaupt für wenige Sekunden in diesem inkubieren, ohne offensichtliche Schäden zu zeigen. Unerfreulicherweise war die Beugungsqualität dieser hexagonalen Kristalle am BESSY Synchrotron auf eine Auflösung von nur etwa 3,5 Å begrenzt. Oberhalb dieser Auflösung brach die Diffraktion plötzlich ab (Abbildung 40D).

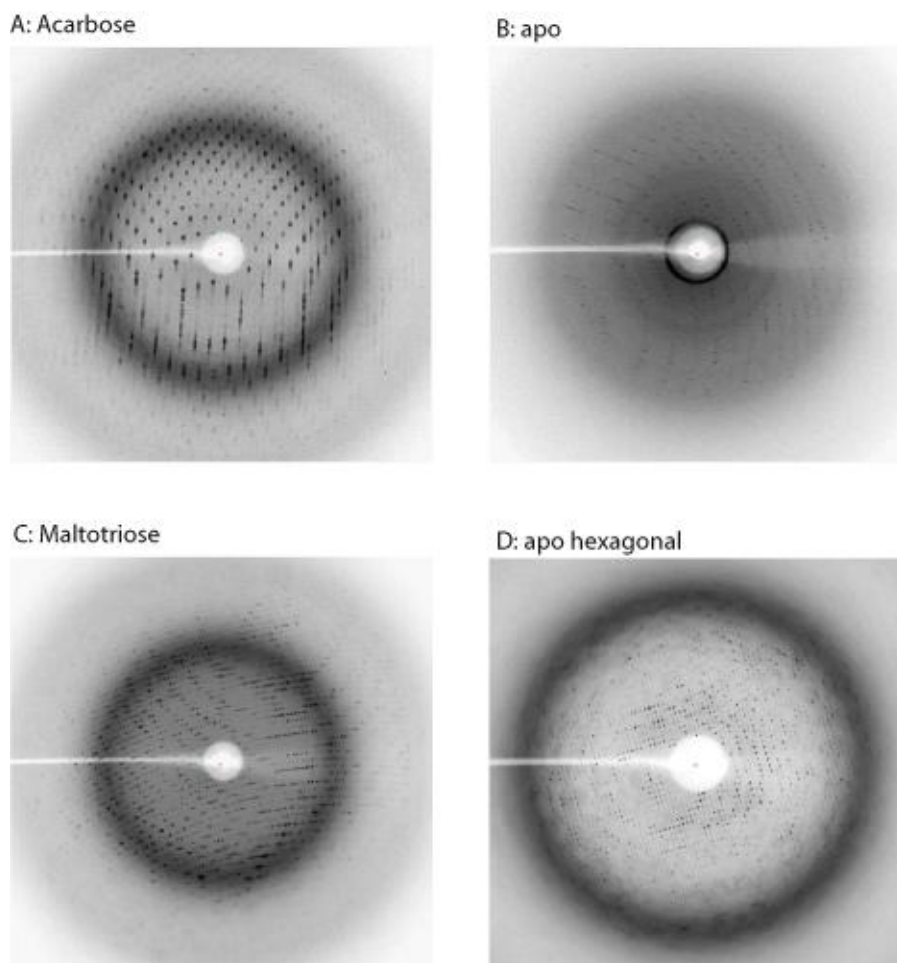


Abbildung 40: Röntgendiffraktionsbilder verschiedener MalQ₁₋₆₈₈-His Kristalle. (A) MalQ•Acarbose (B) MalQ-apo (C) MalQ•Maltotriose (D) MalQ-apo hexagonale Kristallform.

Die Kristalle der tetragonalen und orthorhombischen Raumgruppen zeigten ein wesentlich besseres Diffraktionsverhalten als die hexagonale Kristallform, so dass hier Datensätze mit guten Auflösungen von bis zu 2,1 Å gemessen werden konnten (Abbildung 40 und Tabelle 10).

Jedoch konnte für keinen der Datensätze eines nativen MalQ-Kristalls das Phasenproblem durch MR mit der nächsten verwandten Proteinstruktur (Amylomaltase aus *Thermus aquaticus*, 1ESW, (Przylas *et al.*, 2000a)) gelöst werden. Die Sequenzidentität zwischen MalQ (Aminosäuren 141- 688) und der Amylomaltase aus *Thermus aquaticus* liegt bei 24 %.

Tabelle 10: Kristallographische Tabelle für die drei Amylomaltase Strukturen. Die Werte in den Klammern entsprechen jeweils den Werten in der höchsten Auflösungsschale.

	MalQ- <i>apo</i>	MalQ•Maltose	MalQ•AGA (SeMet)			
			Remote high	Peak	Inflection	Remote low
Raumgruppe	P222 ₁	P1		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		
Einheitszelle [Å]	85,3 106,1	75,1 77,0		65,02 75,82 163,72		
Parameters [°]	217,7 90 90 90	128,4 76,1 75,5 66,3		90,0 90,0 90,0		
Wellenlänge [Å]	0,91841	0,91841	0,97857	0,97982	0,98004	0,98206
Auflösung [Å]	34,0 – 2,8 (2,9 - 2,8)	34,2 – 2,1 (2,2 - 2,1)	50,00- 2,30 (2,44 - 3,30)	50,00- 2,30 (2,44 - 2,30)	50,00-2,30 (2,44 - 2,30)	50,00- 2,05 (2,17 - 2,05)
Vollständigkeit [%]	99,5 (99,9)	94,3 (96,4)	99,4 (98,5)	99,4 (98,3)	99,4 (98,2)	99,6 (98,7)
Einzigartige Reflexe	49608 (4885)	138781 (18524)	69132 (11085)	69158 (11064)	69155 (11067)	97865 (15684)
Multiplizität	5,2 (5,3)	2,1 (2,1)	3,24 (3,16)	3,24 (3,16)	3,23 (3,15)	3,86 (3,79)
Mean I/σ(I)	13,5 (2,8)	12,0 (3,0)	9,66 (1,76)	9,52 (1,73)	10,15 (1,88)	12,04 (2,05)
R _{meas} [%]	14,6 (74,5)	7,9 (53,5)	12,0 (76,0)	12,1 (78,1)	11,2 (71,2)	8,7 (76,1)
Wilson B-Faktor [Å ²]	38,2	36,5	40,21	40,06	40,18	38,86
Phasing						
Map Correlation Coefficient [%]					66,7	
Anzahl der Stellen					21/21	
FOM [%]					63,5	

Als Suchmodelle für die MR Berechnung wurden das vollständige Protein, nur die zentrale TIM-Barrel-Domäne oder sogar nur die α -Helices und β -Stränge des TIM-Barrels verwendet. Außerdem wurden verschiedene Softwarepakete wie PHASER (McCoy *et al.*, 2007), MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2010) und MrBUMP (Keegan & Winn, 2008) getestet. Leider war keine der Lösungen des MR für eine weitere Verfeinerung der Struktur geeignet, da die beste Lösung lediglich einen *translation function Z-Score* (TFZ) von 6,9 und einen freien R-Faktor von 48 % aufwies. Da man in der Regel bei einem TFZ oberhalb von 7 davon ausgehen kann eine korrekte MR Lösung gefunden zu haben, wurde versucht das Modell

dieser MR Lösung an die Elektronendichtekarte anzupassen. Allerdings war es in den folgenden Verfeinerungszyklen nicht möglich den R-Faktor zu senken. Erst mit Hilfe eines MAD-Experiments an einem Kristall des MalQ₁₋₆₈₈-SeMet im Komplex mit Acarbose konnte das Phasenproblem schließlich gelöst werden.

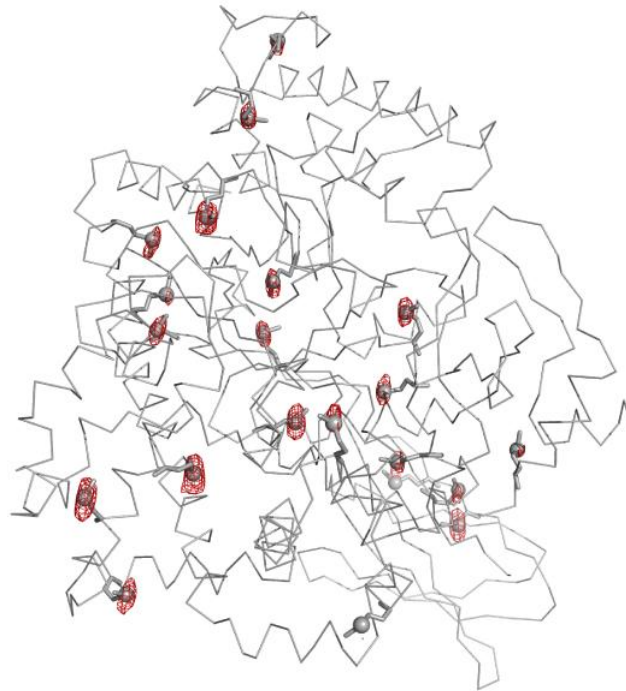


Abbildung 41: Anomale Dichtekarte der mit Acarbose co-kristallisierten MalQ-Struktur. Sie ist bei einem σ -Level von 3,0 konturiert. Die C α -Kette des Proteins ist in der Ribbon-Darstellung abgebildet. Die Seitenketten der Selenomethionine sind als Sticks und die Selenatome als Kugeln hervorgehoben.

In der anomalen Elektronendichtekarte ist die Position von 20 Selenatomen auch bei einem σ -Level von 3,0 deutlich zu erkennen (Abbildung 41). Lediglich für zwei flexiblere SeMet-Reste (inklusive des Startmethionins) auf der Proteinoberfläche ist bei diesem hohen σ -Level kein anomales Signal erkennbar.

4.3.4 Verfeinerung der Amylomaltase-Strukturen

Die MalQ-Strukturmodelle wurden jeweils durch manuellen Modellbau der Proteinstruktur an die Elektronendichtekarte unter Verwendung der Software COOT (Emsley *et al.*, 2010) verbessert (siehe Tabelle 11). Mithilfe der Software REFMAC5 (Vagin *et al.*, 2004; Murshudov *et al.*, 2011) wurden die Strukturen durch Zyklen eines Maximum-Likelihood-Refinements unter Berücksichtigung von TLS-Gruppen (Translation, Libration, Screw-axis) verfeinert. Die Festlegung der TLS-Gruppen erfolgte mit Hilfe des TLSMD-Servers (Painter & Merritt, 2006). Die Qualität der finalen Strukturmodelle wurde mittels COOT und des

MolProbity-Servers (Davis et al., 2007) evaluiert. Die drei MalQ Strukturen wurden in der Proteindatenbank unter den PDB-Codes 4S3P (MalQ-apo), 4S3Q (MalQ•Maltose) und 4S3R (MalQ•AGA) hinterlegt.

Tabelle 11: Verfeinerungsstatistiken der Amylomaltase-Strukturen. Die Werte in den Klammern entsprechen denen in der höchsten Auflösungsschale. Der Ramachandran Plot wurde mit MolProbity berechnet (Davis et al., 2007).

	apo	AGA (SeMet)	Maltose
Auflösung [Å]	34,35 - 2,80 (2,87 - 2,80)	81,93 - 2,10 (2,15 - 2,10)	122,76 - 2,10 (2,16 - 2,10)
Anzahl Reflexe (Arbeitsset)	47198 (3412)	45668 (3322)	131810 (9981)
Anzahl Reflexe (Testset)	2410 (194)	2433 (168)	6970 (516)
R _{cryst} [%]	18,0 (29,4)	16,9 (24,3)	22,1 (29,4)
R _{free} [%]	22,4 (34,0)	20,5 (24,4)	25,8 (33,1)
Anzahl der Moleküle/Liganden pro AU	2/-	1/1	3/1
Anzahl der Atome gesamt	11181	5727	16868
Protein/Ligand/Wasser/Lösungsmittel	10994/-/187/-	5421/76/226/4	16350/23/467/28
B-Werte [Å ²] gesamt	42,1	39,4	39,4
Protein/Ligand/Wasser/Lösungsmittel	42,3/-/25,6/-	39,4/39,6/38,5/40,8	39,5/55,3/33,9/43,7
Ramachandran Plot beg./Ausreißer	1342/0	663/0	1988/0
RMSD Bindungslänge [Å] / Winkel [°]	0,01/1,09	0,01/1,40	0,01/1,27

Beide Proteinketten der MalQ-apo Struktur zeigen eine interpretierbare Elektronendichte für die Aminosäuren 2 bis 688 sowie Serin und Alanin des Linkers zwischen Protein und C-terminalem His₆-Tag. Außerdem weist Molekül A Elektronendichte für das N-terminale Methionin sowie das erste Histidin des C-terminalen Affinitätstags auf.

Der MalQ•Maltose Komplex wurde durch Co-Kristallisation mit Maltotriose erhalten. Die asymmetrische Einheit enthält drei Proteinketten, die jeweils für die Aminosäuren 2 bis 43 und 52 bis 688 sowie den Serin-Alanin Linker auswertbare Elektronendichte zeigen. Dagegen sind die Aminosäuren 44 bis 51 in allen drei Ketten ungeordnet. In den Proteinketten A und B konnte auch für einige Histidinreste des C-terminalen Affinitätsanhängsels Elektronendichte festgestellt werden, so wurden hier jeweils ein bzw. fünf Histidine beobachtet. Außerdem zeigte Proteinkette A Elektronendichte für einen Liganden im aktiven Zentrum. Im folgenden beziehen sich die Bezeichnungen MalQ-apo und MalQ•Maltose jeweils auf Proteinkette A der entsprechenden asymmetrischen Einheiten.

Die MalQ•Acarbose Struktur zeigt interpretierbare Elektronendichte für die Aminosäuren 2 bis 42 und 52 bis 688 sowie die Reste des Serin-Alanin Linkers. Auch in dieser Struktur konnte keine Elektronendichte für die Reste 43 bis 51 beobachtet werden, dagegen zeigte sich exzellente Elektronendichte für einen Liganden im aktiven Zentrum.

Die vergleichsweise geordnete Konformation des Aminosäurebereiches 43–51 in der apo-Struktur wird vermutlich durch Kristallkontakte zu symmetrieverwandten Proteinketten begünstigt, die in den beiden anderen Strukturen nicht auftreten.

4.3.5 Strukturelle Charakterisierung von MalQ

Die MalQ Struktur zeigt drei größere Domänen A, B und N (Abbildung 42). Domäne A weist eine typische TIM-Barrel Faltung mit acht zentralen β -Strängen und acht äußeren Helices auf (Alber *et al.*, 1981).

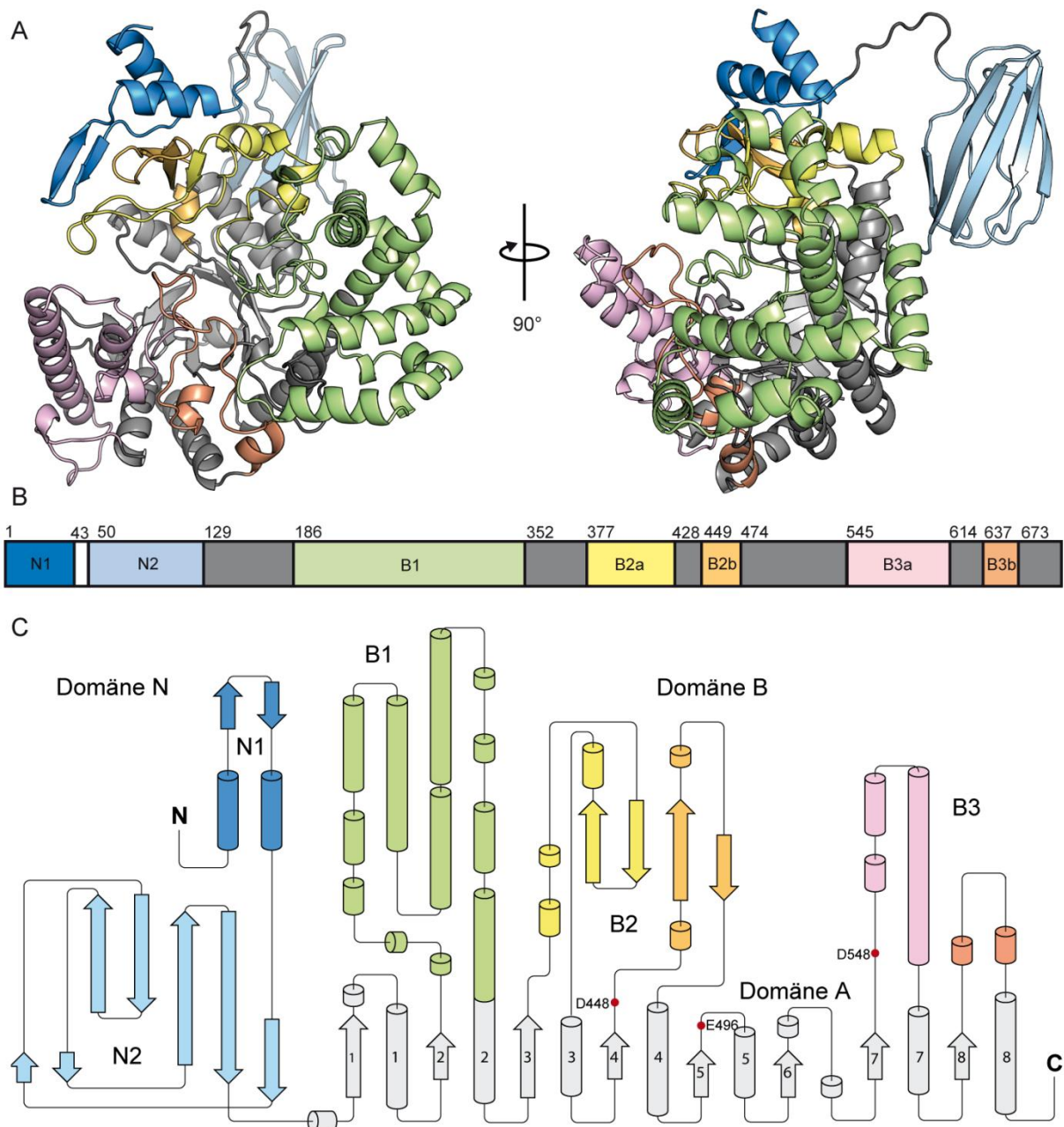


Abbildung 42: Übersicht der Amylomaltase-Struktur. (A) Schematische Darstellung von MalQ-apo. Die zentrale TIM-Barrel Domäne A, die Unterdomänen N1, N2, sowie B1 bis B3 sind grau, blau, hellblau, grün, gelb/orange bzw. pink/lachsfarben hervorgehoben. (B) Balkendiagramm der MalQ Domänen. Die Zahl gibt die erste Aminosäure des jeweiligen Bereichs an. Die Färbung entspricht (A), weiß dem Linker innerhalb der N-terminalen Domäne. (C) Topologie-Diagramm von MalQ. Die Färbung entspricht (A), rote Punkte markieren katalytisch wichtige Aminosäuren.

Auffällig ist allerdings, dass die sechste äußere Helix keine α -helikale Struktur zeigt, sondern durch eine kleine 3_{10} -Helix mit nur einer Windung ersetzt ist. Außerdem unterbrechen verschiedene Insertionen das TIM-Barrel am C-terminalen Ende der β -Stränge. Diese Insertionen werden zusammengenommen als Domäne B bezeichnet (Przylas *et al.*, 2000b). Domäne B kann in *E. coli* MalQ in drei verschiedene Unterdomänen B1 bis B3 eingeteilt werden. Im Gegensatz zu den bisherigen Arbeiten wurden die Domänen B1-B3 zur besseren Übersichtlichkeit nach ihrer sequenziellen Abfolge nummeriert. Während Unterdomäne B1 aus nur einer Insertion besteht, setzen sich die Untereinheiten B2 und B3 aus jeweils zwei Insertionen zusammen (B2a und B2b bzw. B3a und B3b). Die katalytisch aktiven Reste Asp448, Glu496 und Asp548 befinden sich - wie für die Glycosid-Hydrolasen der Familie 77 typisch - jeweils am C-terminalen Ende der β -Stränge 4, 5 und 7 des zentralen TIM-Barrels. Im Unterschied zu bereits bekannten Amylomaltase-Strukturen aus thermophilen Organismen findet man bei MalQ eine zusätzliche N-terminale Domäne, die sich aus den zwei Untereinheiten N1 und N2 zusammensetzt.

Die erste Untereinheit der N-terminalen Domäne der Amylomaltase (Aminosäuren 1 bis 43) besteht aus zwei α -Helices, die über zwei kurze antiparallele β -Stränge miteinander verbunden sind. Sie befindet sich auf der Proteinoberfläche in direkter Nachbarschaft zu Unterdomäne B2, in der Nähe des aktiven Zentrums. Inwieweit sie mit ihrer geringen Größe einen funktionellen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat, ist unklar. Möglicherweise schirmt sie Bereiche der Unterdomäne B2, die den katalytisch wichtigen Loop-400s über dem aktiven Zentrum bereitstellt, gegenüber dem Lösungsmittel ab.

Die beiden α -Helices von N1 sind in einem Winkel von 52° zueinander orientiert. Auffällig ist, dass die $\alpha\beta\beta\alpha$ Topologie von N1 der Topologie der ersten Insertion von B2 (B2a, Reste 390 bis 425) ähnelt. Allerdings beträgt die Sequenzidentität zwischen beiden Motiven nur 12 %, sodass ein evolutionärer Zusammenhang nicht zweifelsfrei abgeleitet werden kann. Eine Suche nach ähnlichen bereits bekannten Proteinstrukturen mit dem DALI Server (Holm & Rosenström, 2010) ergab nur Motive, in denen die beiden α -Helices in einem identischen Winkel zueinander angeordnet waren, aber jeweils die beiden β -Stränge fehlten. Als ähnlichste Strukturen wurden die Kohlenstoffmonoxid-Hydrogenase aus *Carboxydotherrhus hydrogeniformans* (PDB-Code 1SUF, (Dobbek *et al.*, 2004)) und die Lysyl-tRNA Synthetase aus *Escherichia coli* (PDB-Code 1LYL, (Onesti *et al.*, 1995)) identifiziert.

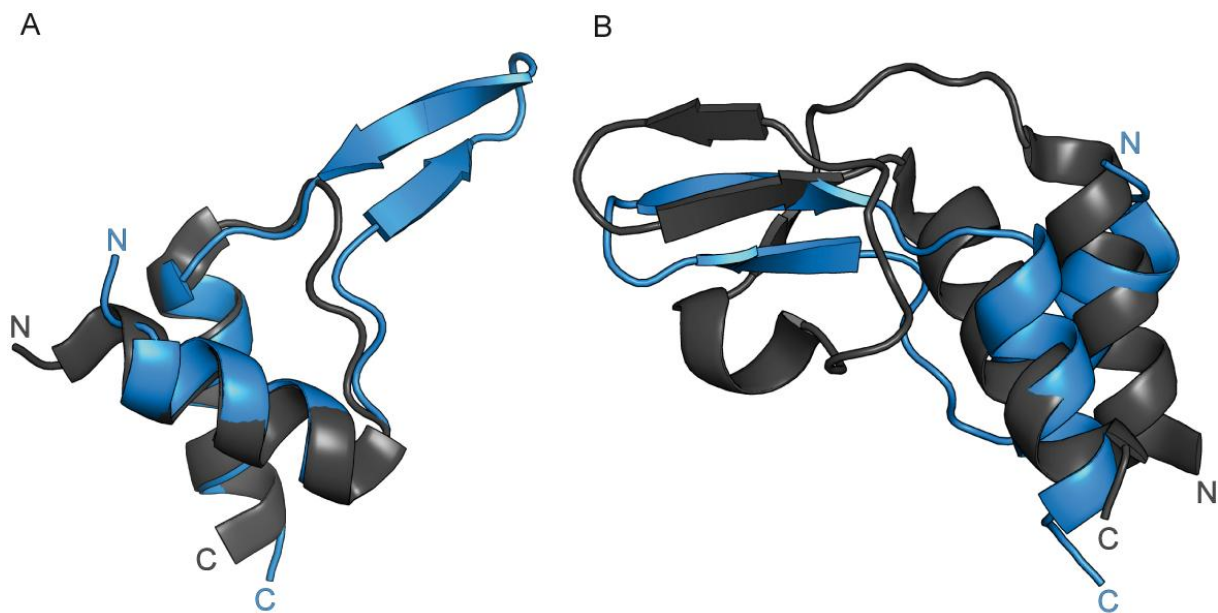


Abbildung 43: Vergleich der Untereinheit N1. Überlagerung von MalQ N1 (blau) und der Carbon-Monoxid-Dehydrogenase-Domäne (A, grau) bzw. der N-terminalen Domäne der Maltosyltransferase aus *T. maritima* (B, grau). N- und C-Terminus sind jeweils durch farbige Buchstaben gekennzeichnet.

Ein funktioneller Zusammenhang mit der Carbon-Monoxid-Dehydrogenase (Abbildung 43A) oder der Lysyl-tRNA-Synthetase erscheint aber, nicht nur aufgrund des fehlenden β -Strang-Motivs, sondern auch der unterschiedlichen enzymatischen Funktionen äußerst zweifelhaft. Auch in der Maltosyltransferase (MTase) aus dem hyperthermophilen Organismus *Thermotoga maritima* kommt eine N-terminale Domäne vor, die der TIM-Barrel-Domäne A voransteht. Diese besteht ebenfalls aus zwei α -Helices, die durch antiparallele β -Stränge verbunden sind (PDB-Code 1GJU) (Roujeinikova *et al.*, 2001). In der *T. maritima* Struktur sind es jedoch drei β -Stränge. Außerdem zeigt ein strukturelles Sequenzalignment der beiden N-terminalen Domänen durch den SALIGN Server (Braberg *et al.*, 2012) keine einzige konservierte Aminosäure. Die N-terminale Domäne aus *T. maritima* ist zudem im Verhältnis zur katalytischen Domäne A anders positioniert als die N1 Domäne aus MalQ. Sie befindet sich nicht in der Nähe des aktiven Zentrums, sondern ist auf der N-terminalen Seite des TIM-Barrels angelagert. Auch ein Sequenzalignment der beiden Domänen ergab nur eine geringe Ähnlichkeit von 15 % identischen Aminosäuren. Diese großen Unterschiede legen daher sowohl einen anderen evolutionären Ursprung als auch eine andere Funktion der beiden N-terminalen Domänen nahe (Abbildung 43B).

Unterdomäne N2 ist aus sieben β -Strängen aufgebaut, die ein β -Sandwich bilden (Abbildung 44). Dabei bilden β -Stränge 1, 3, 4, 6 und 7 das größere der beiden β -Faltblätter und Stränge 2 und 5 das kleinere. Die ersten beiden β -Stränge des größeren β -Faltblatts sind parallel angeordnet, während alle anderen β -Stränge antiparallel zueinander orientiert sind. N2 hat

im Gegensatz zur ersten Untereinheit der N-terminalen Domäne keine größere Kontaktfläche zu den anderen Bereichen des Proteins und erscheint eher als eigenständige Einheit, denn als Teildomäne der Amylomaltase. Die meisten Interaktionen finden zwischen dem C-terminalen Ende von N2 und Domäne A statt (siehe Abbildung 42A).

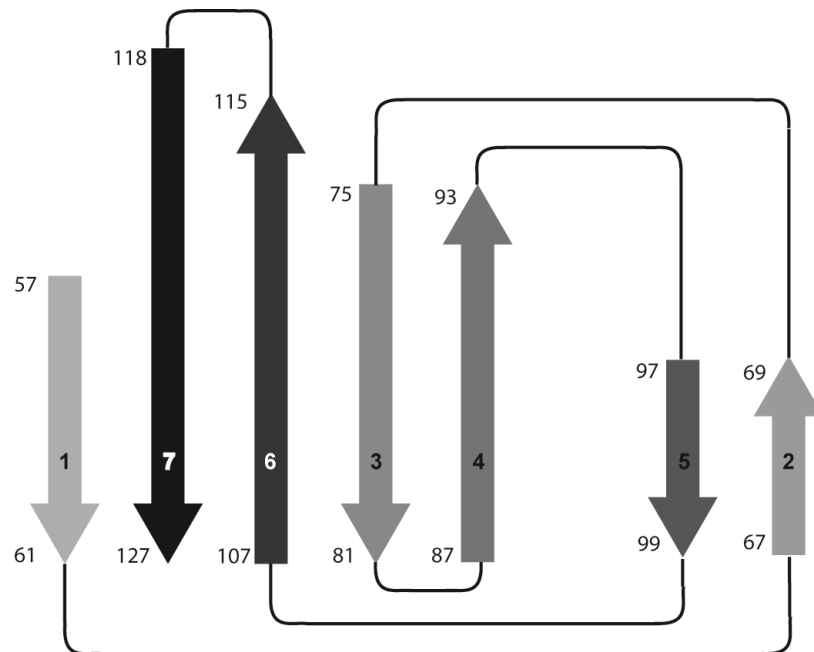


Abbildung 44: Topologie-Diagramm von MalQ N2. Die β -Stränge des β -Sandwich sind vom N-Terminus zum C-Terminus in dunkler werdenden Graustufen gefärbt und nummeriert. Die Aminosäuren geben Anfang und Ende der β -Strangkongformation an.

Auch bei anderen zuckermetabolisierenden Enzymen treten neben einer katalytischen Domäne zusätzliche β -Sandwich-Domänen auf. Auf den ersten Blick ähnelt das N2 β -Sandwich einem *carbohydrate binding module* (CBM), allerdings ergab ein genauerer struktureller Vergleich keine signifikanten Ähnlichkeiten. Eine Suche mit dem DALI Server (Holm & Rosenström, 2010) und dem PDBeFold Server (Krissinel & Henrick, 2004) zeigte auch keine gute Übereinstimmung mit den Strukturen anderer GHs. Eine Ig-artige Domäne (Aminosäuren 1-85) der Cellulase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (PDB-Code 3GZK) (Eckert *et al.*, 2009), die zu GH Familie 9 gehört, wurde als nächste verwandte Struktur identifiziert. Aber selbst bei dieser strukturell am nächsten verwandten Domäne unterscheidet sich die Domänenarchitektur, sowohl in der Anzahl der β -Stränge je β -Faltblatt als auch deren Abfolge bzw. Topologie (Abbildung 45).

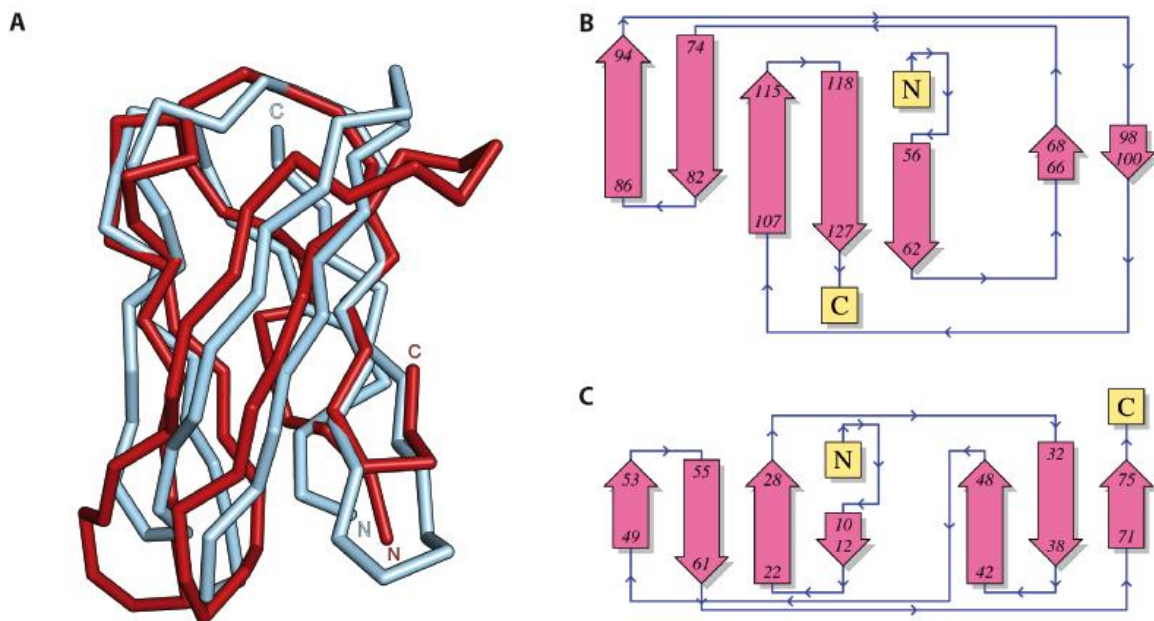


Abbildung 45: Vergleich von MalQ N2 mit der Cellulase aus *B. acidocaldarius*. (A) Überlagerung der Cellulase-Domäne (rot) aus *B. acidocaldarius*; (PDB Code 3GZK, (Eckert *et al.*, 2009)) auf MalQ N2 (blau) durch den SALIGN Server (Braberg *et al.*, 2012). N- und C-Terminus sind jeweils durch farbige Buchstaben gekennzeichnet. (B) Topologie-Diagramm der MalQ Domäne. (C) Topologie-Diagramm der Cellulase-Domäne. Die Topologie-Diagramme wurden mithilfe des PDBsum Servers erstellt (Laskowski *et al.*, 1997).

Die RMSD zwischen den 62 $C\alpha$ -Atomen der beiden Domänen beträgt 2,4 Å. Da aber auch über die Funktion der Ig-artigen Domäne der Cellulase keine Erkenntnisse vorliegen, hilft dies bei der Einschätzung der MalQ N2 nicht weiter. Auch die strukturell und mechanistisch verwandte Maltosyltransferase GlgE aus *Streptomyces coelicolor* (PDB-Code 4CN4) (Syson *et al.*, 2014) enthält eine N-terminale Domäne mit β -Sandwich-Architektur. Doch diese zeigt ebenfalls eine andere Domänen-Topologie und auch deren Funktion ist nicht geklärt.

Eine Suche nach N2-ähnlichen Domänen mit dem PDBeFold Server (Krissinel & Henrick, 2004) identifizierte eine Fibronectin Typ III (FnIII) Domäne aus menschlichen Tenascin. Von allen bekannten Proteinstrukturen zeigt diese die beste strukturelle und topologische Übereinstimmung mit MalQ N2 (Abbildung 46). Die RMSD zwischen den 65 $C\alpha$ -Atomen der beiden Domänen beträgt etwa 1,8 Å, aber ein strukturelles Alignment ergab auch hier nur 5 identische Aminosäuren. Durch Umlagerung des ersten β -Strangs aus dem größeren in das kleinere β -Faltblatt von MalQ N2 ergäbe sich die typische FnIII Topologie *abc'cfg* (Main *et al.*, 1992). Dies könnte ein Hinweis auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der beiden Domänen sein.

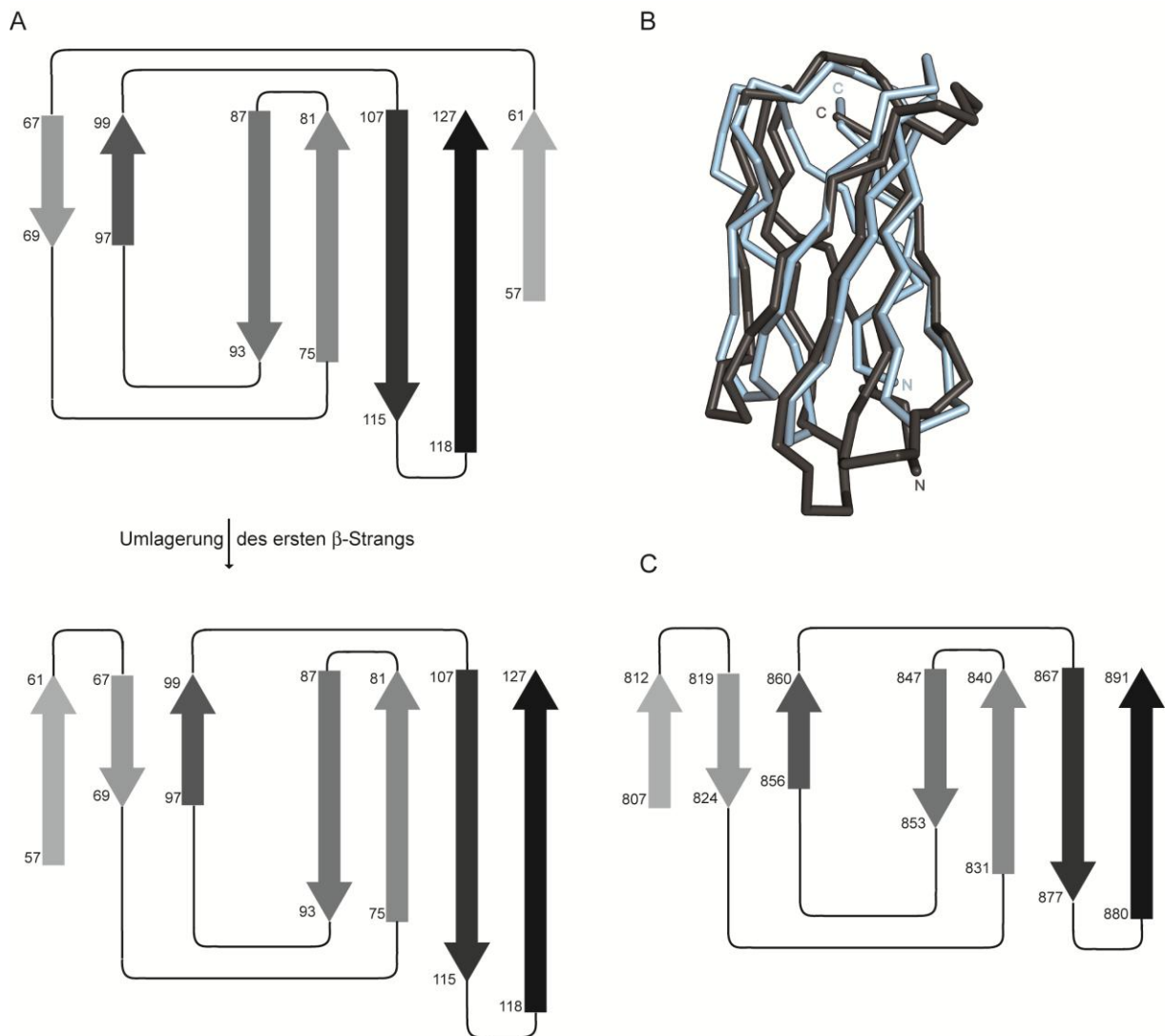


Abbildung 46: Vergleich der MalQ N2 Unterdomäne mit einer Fibronectin Typ III Domäne. (A) Topologie-Diagramm der MalQ Domäne. (B) Überlagerung der FnIII Domäne (grau) (Tenascin aus *Homo sapiens*; 1TEN (Leahy et al., 1992)) auf MalQ N2 (blau) durch den SALIGN Server (Braberg et al., 2012). N- und C-Terminus sind jeweils durch farbige Buchstaben gekennzeichnet. (C) Topologie-Diagramm der FnIII Domäne. Die Topologie-Diagramme wurden mithilfe des PDBsum-Servers erstellt (Laskowski et al., 1997).

Die mit 166 Aminosäuren größte Insertion der MalQ Struktur ist Domäne B1, die aus Aminosäuren 186-351 besteht und sich am C-terminalen Ende des β -Strangs 2 von Domäne A (β 2) befindet. Somit ist sie äquivalent zu Domäne B2 (Aminosäuren 48-191) der Amylomaltase aus *T. Aquaticus* (PDB Code 1ESW, (Przylas et al., 2000a)). Eine Überlagerung von 132 $C\alpha$ -Atomen der beiden Domänen ergibt eine RMSD von 1,6 Å (Abbildung 47).

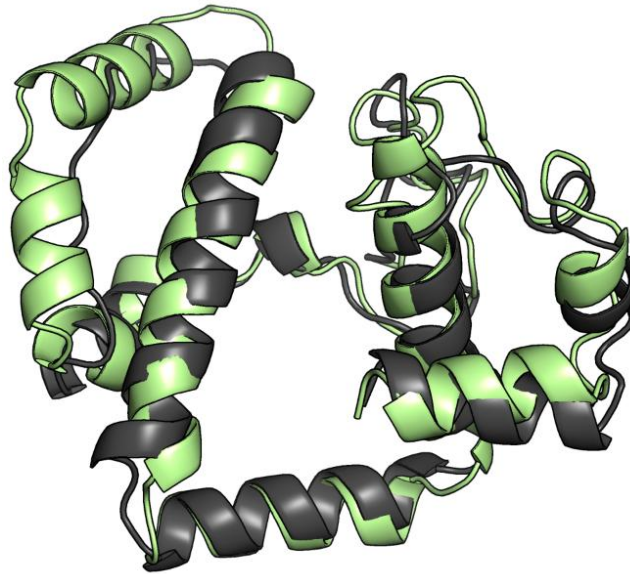


Abbildung 47: Vergleich der B1 Domänen von MalQ und der Amylomaltase aus *T. aquaticus*. Überlagerung der C α -Atome von MalQ B1 (grün) auf die entsprechenden Atome der Subdomäne B2 aus der *Thermus aquaticus* Amylomaltase (grau; 1ESW; (Przylas et al., 2000a)) mithilfe der Software PyMOL.

Beide Unterdomänen bestehen hauptsächlich aus α -Helices, die durch Loop-Regionen verbunden sind. Im Unterschied zur Amylomaltase aus *T. aquaticus* bilden Aminosäuren 225 bis 247 der *E. coli* Struktur keinen Loop sondern zwei α -Helices mit einem Winkel von etwa 110° zueinander. Es wurde vermutet, dass diese Domäne spezifisch für die Funktion von Amylomaltasen der GH Familie 77 ist (Przylas et al., 2000b; Kaper et al., 2005). Es gibt zwar auch in GHs der Familie 13 größere Insertion nach dem zweiten β -Strang des zentralen TIM-Barrels, aber diese haben eine grundsätzlich andere Domänenarchitektur (Qian et al., 1993; Klein & Schulz, 1991).

Die funktionell wohl wichtigste Unterdomäne von MalQ ist B2. Sie besteht aus den zwei Insertionen B2a (Rest 377-427) und B2b (Reste 449-473), die sich an das C-terminale Ende von A β 3 bzw. A β 4 anschließen. Ein wichtiges Merkmal von B2a ist ein großer Loop im Bereich um Aminosäure 400, der sich in einer langgezogenen Schlaufe in zwei Richtungen über das aktive Zentrum legt. Dieser Loop entspricht dem 250s-Loop aus thermophilen Amylomaltasen, wie *T. aquaticus* (Przylas et al., 2000a; Przylas et al., 2000b), *T. thermophilus* (Barends et al., 2007) und *T. Brockianus* (Jung et al., 2011) und wird daher im Weiteren als 400s-Loop bezeichnet. Neben dem 400s-Loop enthält die Domäne B2a auch zwei kurze β -Stränge sowie zwei kurze α -Helices. Die beiden β -Stränge bilden zusammen mit zwei weiteren β -Strängen aus der Domäne B2b ein antiparalleles β -Faltblatt, das sich in Kontakt mit der N1 Untereinheit befindet. Insertion B2b umfasst neben den beiden erwähnten β -Strängen auch noch eine kurze α -Helix mit 2 Windungen. Das katalytische Nukleophil Asp448 befindet sich direkt am Übergang zwischen A β 4 und Insertion B2b.

Auch Unterdomäne B3 besteht aus zwei Insertionen. Dabei befindet sich Insertion B3a (Reste 545-613) zwischen $A\beta 7$ und $A\alpha 7$ und formt eine längere und zwei kürzere α -Helices. Die letzte Insertion bildet B3b (Reste 637-672), die auf $A\beta 8$ folgt und aus zwei kürzeren α -Helices sowie einem größeren Loop besteht.

4.3.6 Aktives Zentrum und Ligandenbindung

Die Kristallisation von MalQ in Abwesenheit von Zuckern resultierte in der MalQ-apo Struktur. Hier konnte im aktiven Zentrum keine Elektronendichte für einen Liganden beobachtet werden. Die Reste der katalytischen Triade umfassen das Nukleophil Asp448, das als Protonendonator und -akzeptor fungierende Glu496 und den möglichen Übergangsstabilisator Asp548. Diese interagieren mit jeweils anderen Aminosäuren der Substratbindetasche: Asp448 bildet eine Salzbrücke mit Arg446, Glu496 zwei Wasserstoffbrücken zu den Amidgruppen des Peptidrückgrats von His449 und Leu498, während Asp548 eine Wasserstoffbrücke zu Asp648 formt.

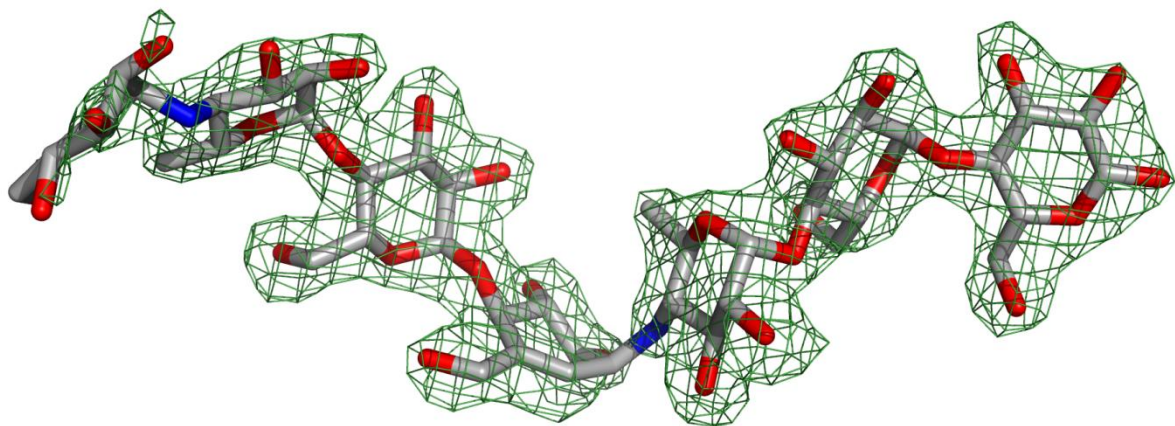


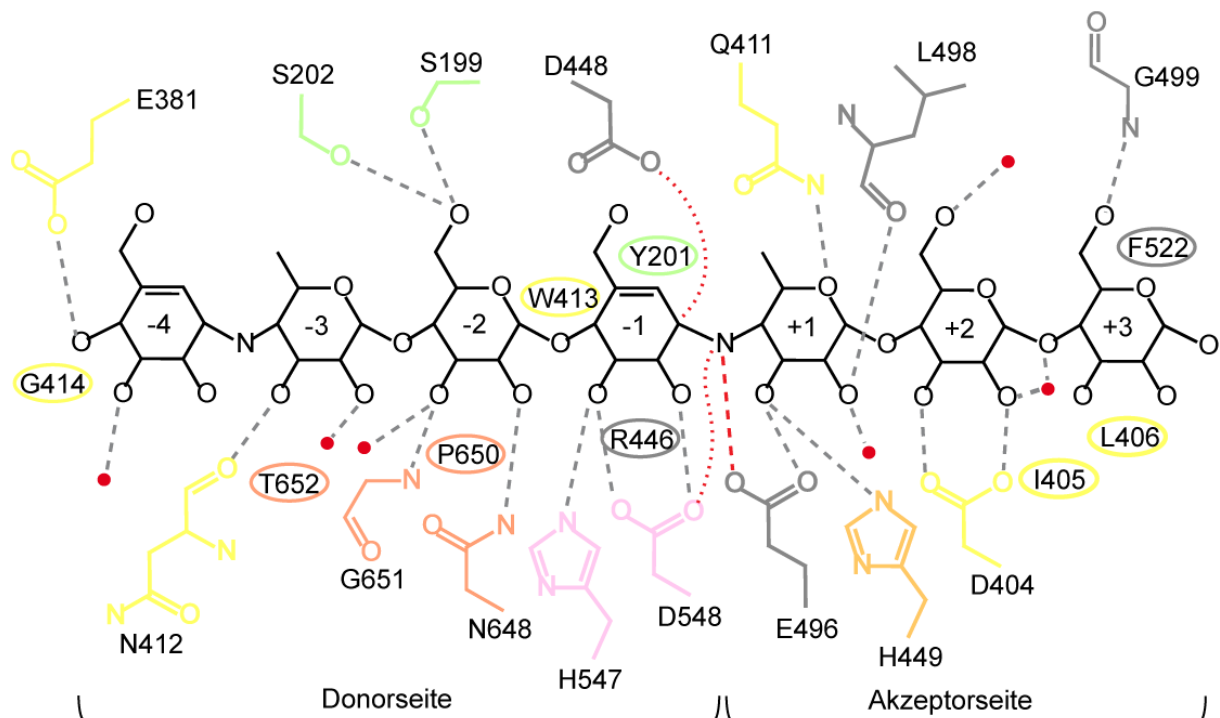
Abbildung 48: Elektronendichtekarte für den Liganden in der mit Acarbose co-kristallisierten Struktur. Die $F_o - F_c$ Differenzelektronendichtekarte wurde in Abwesenheit des Liganden berechnet und ist als grüne Mesh-Darstellung bei einem Kontourlevel von $3,0 \sigma$ dargestellt. Der AGA-Ligand ist in Form von Sticks dargestellt und mit der Differenzkarte überlagert, wobei Kohlenstoffatome grau, Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot gefärbt sind.

Dagegen zeigt sich nach Co-Kristallisation mit Acarbose in der MalQ Struktur überraschenderweise eine klar definierte Elektronendichte für eine zusammenhängende Kette aus sieben Zuckerringen, obwohl Acarbose lediglich vier miteinander verbundene Ringe umfasst (Abbildung 48). Diese Beobachtung kann nur durch eine von MalQ katalysierte Umsetzung zweier Acarbose-Moleküle zum verlängerten und hochwirksamen Inhibitor Acarviosin-Glucose-Acarbose (AGA) und Glucose erklärt werden (Abschnitt 4.3.7 und Abbildung 56). Dadurch dass alle sieben Kohlenhydrateinheiten von AGA gut in der Elektronendichte definiert sind, eröffnete sich die einmalige Möglichkeit sieben

zuckerbindende Subsites von MalQ zu studieren. Vier von ihnen befinden sich (Subsites -4 bis -1) am nicht-reduzierenden und drei (Subsites +1 bis +3) am reduzierenden Ende der Substrattasche. Dieses Pseudo-Heptasaccharid sollte ein noch stärkerer Inhibitor für die Amylomaltase als Acarbose sein, da es sich ebenso mit der nicht-hydrolysierbaren Bindung ins aktive Zentrum lagern kann und so den vom Enzym zu stabilisierenden Übergangszustand nachahmt, ohne selbst umgesetzt werden zu können. Zudem kann AGA aufgrund seiner Größe erheblich mehr Interaktionen und insbesondere auch Wasserstoffbrücken mit MalQ eingehen als Acarbose. Die Acarviosin-Glucose (um eine Glucoseeinheit verkürzte Acarbose) von AGA ist in den Subsites -4 bis -2 gebunden, während sich der vollständige Acarbose-Teil in den Subsites -1 bis +3 befindet. Damit nimmt die nicht-spaltbare α -1,4-N-glycosidische Bindung die Position der theoretisch zu spaltenden glycosidischen Bindung zwischen den Subsites -1 und +1 im aktiven Zentrum ein (Abbildung 48). Die hervorragende Elektronendichte und die vergleichbaren B-Faktoren von AGA und Proteinkette nach der Verfeinerung (siehe Tabelle 11) zeigen, dass der Ligand eine vollständige Besetzung aufweist. Verglichen mit der MalQ-apo Struktur befindet sich die MalQ•AGA Struktur in einer deutlich geschlosseneren Konformation, in der der Ligand vollständig durch Domäne B bedeckt ist. Die Subsites -2 bis +2 bilden hier einen V-förmigen Tunnel, an dessen Boden sich die katalytischen Reste von MalQ befinden.

Die Substrat-Subsite -4 befindet sich über dem C-terminalen Ende des β -Strangs A β 6 und damit außerhalb des Substrattunnels des aktiven Zentrums. Sie ist somit zu großen Teilen für das Lösungsmittel zugänglich. Die wichtigste Interaktion in dieser Subsite ist die Wasserstoffbrücke zwischen dem Seitenkettencarboxylat von Glu381 und dem 4'-OH-Gruppe des Cyclohexenrings. Eine weitere Wasserstoffbrücke wird über ein proteinkoordiniertes Wassermolekül vermittelt. Daneben kommt es zu van der Waals (vdW) Kontakten von AGA mit Gly414 (Abbildung 49).

Die Substrat-Subsite -3 bildet den Eingang des Tunnels. Hier ist die erste 6-Deoxyglucose-Einheit (6DG) von AGA gebunden, dessen 3'-OH-Gruppe eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonyl-Sauerstoff von Asn412 aus Subdomäne B2 eingeht. Die 2'-OH-Gruppe bildet über ein proteinkoordiniertes Wassermolekül eine Wasserstoffbrücke aus. Zusätzlich wird 6DG über vdW Kontakte zu Thr652 aus Subdomäne B3 gebunden. Eine mögliche 6'-OH-Gruppe, die in AGA fehlt, könnte wahrscheinlich auch eine H-Brücke mit Ser202 aus Subdomäne B1 eingehen.



Acarviosin-Glucose-Acarbose

Abbildung 49: Protein•Liganden-Interaktionen in der mit MalQ•AGA Struktur. Wasserstoffbrückenbildende Aminosäuren von MalQ sind als Sticks abgebildet, während Aminosäuren, die van der Waals Wechselwirkungen mit dem Liganden eingehen, als Ellipsen dargestellt sind. Die Färbung der Aminosäuren entspricht ihrer Domänenzugehörigkeit in Abbildung 42. Der AGA Inhibitor ist als schwarze Sticks gezeigt. Wassermoleküle, die Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Protein vermitteln, sind als rote Kugeln dargestellt. Gestrichelte Linien deuten Wasserstoffbrücken an, während gepunktete Linien Kontakte zu katalytisch wichtigen Aminosäuren symbolisieren. Die Nummerierung der Zuckerringe entspricht der jeweiligen Subsite.

Die Glucose-Einheit in Subsite -2 bildet fünf Wasserstoffbrücken aus: jeweils eine zu den Seitenketten von Ser199 und Ser202 aus Subdomäne B1, eine zum Seitenkettenamidstickstoff von Asn648, eine zum Peptidstickstoff von Gly651 und eine zu einem proteinkoordinierten Wassermolekül. Außerdem tragen die aromatischen Seitenketten von Trp413 und Pro650 aus Subdomäne B2 bzw. B3 vdW Kontakte bei.

In der Subsite -1 befindet sich der zweite Cyclohexenring von AGA, der ebenfalls durch vdW Kontakte zu aromatischen Aminosäuren stabilisiert wird. Diese sind Tyr201 und Trp413 aus Subdomäne B1 bzw. B3, die den Liganden sandwichartig von oben und unten umschließen. Die wichtigsten polaren Interaktionen in Subsite -1 sind drei Wasserstoffbrücken zwischen His547 und Asp548 aus Subdomäne B3 zur 3-OH-Gruppe des Liganden (sowohl His547 als auch Asp548) und der 2-OH-Gruppe (nur Asp548). Außerdem befindet sich eines der beiden Sauerstoffatome der Seitenkette von Asp548 mit 3,0 Å Abstand in engem Kontakt zum N-Atom der nicht-spaltbaren N-glycosidischen Bindung. Das katalytische Nucleophil Asp448 hat einen Abstand von 2,6 Å in β -ständiger Orientierung zum C1 Atom des Cyclohexenrings, der den Übergangszustand nachahmt, und ist so perfekt für einen nukleophilen Angriff

positioniert. Zusätzlich wird der Cyclohexenring über hydrophobe Kontakte mit Arg446 gebunden.

Die zweite 6DG Einheit bindet in Subsite +1, wo sie 5 Wasserstoffbrücken mit dem Enzym eingeht. Diese kontaktieren Gln411 und His449 aus Subdomäne B2 sowie Glu496 und Leu498 aus Domäne A. Dabei ist das Seitenkettencarboxylat des katalytischen Glu496 so positioniert, dass es neben der Wasserstoffbrücke zur 3-OH-Gruppe mit 2,9 Å auch eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom der nicht-hydrolysierbaren Bindung eingehen kann. Der MalQ•AGA Komplex ist somit die erste Amylomaltasestruktur, in der sich alle katalytisch relevanten Aminosäureseitenketten in einer katalytisch kompetenten Position befinden. Eine weitere Wasserstoffbrücke wird über ein proteinkoordiniertes Wasser vermittelt. Wäre eine 6-OH-Gruppe vorhanden, würde sie sicherlich eine weitere Wasserstoffbrücke mit Gln411 eingehen.

Die wichtigste Interaktion in der Subsite +2 sind Wasserstoffbrücken der Seitenkette von Asp404 aus Subdomäne B2 sowohl mit der 3-OH-Gruppe als auch der 2-OH-Gruppe der Glucoseeinheit. Zusätzlich werden zwei H-Brücken zu proteinkoordinierten Wassermolekülen und vdW Kontakte mit Ile405 und Leu406 ausgebildet.

Die letzte Glucoseeinheit am reduzierenden Ende von AGA ist in Subsite +3 gebunden und interagiert hauptsächlich mit Aminosäuren aus Domäne A und Subdomäne B2. So wird unter anderem die 6-OH-Gruppe der Glucoseeinheit durch eine Wasserstoffbrücke mit dem Peptidstickstoff von Gly499 gebunden. Außerdem gibt es hydrophobe Interaktionen mit Ile405 und Leu406 sowie zwischen der aromatischen Seitenkette von Phe522 und dem Pyranosering.

Auch in der mit Maltotriose co-kristallisierten MalQ Struktur tritt in der am besten geordneten Proteinkette im aktiven Zentrum eine Elektronendichte auf. Diese lässt sich sehr gut mit einer Maltose interpretieren (siehe Abbildung 50). Dieses Maltosemolekül bindet in den Subsites -2 und -1. Die beobachtete Maltose ist das Produkt der Umsetzung von Maltotriose durch MalQ. Die B-Faktoren der Maltoseatome von etwa 55 Å² gegenüber 39 Å² für die Proteinkette machen deutlich, dass die Maltose nur in 2/3 aller MalQ Moleküle gebunden ist. Dabei ist der Zuckerring in Subsite -1 aufgrund der größeren Anzahl an Interaktionen mit dem Enzym deutlich besser definiert als der in Subsite -2.

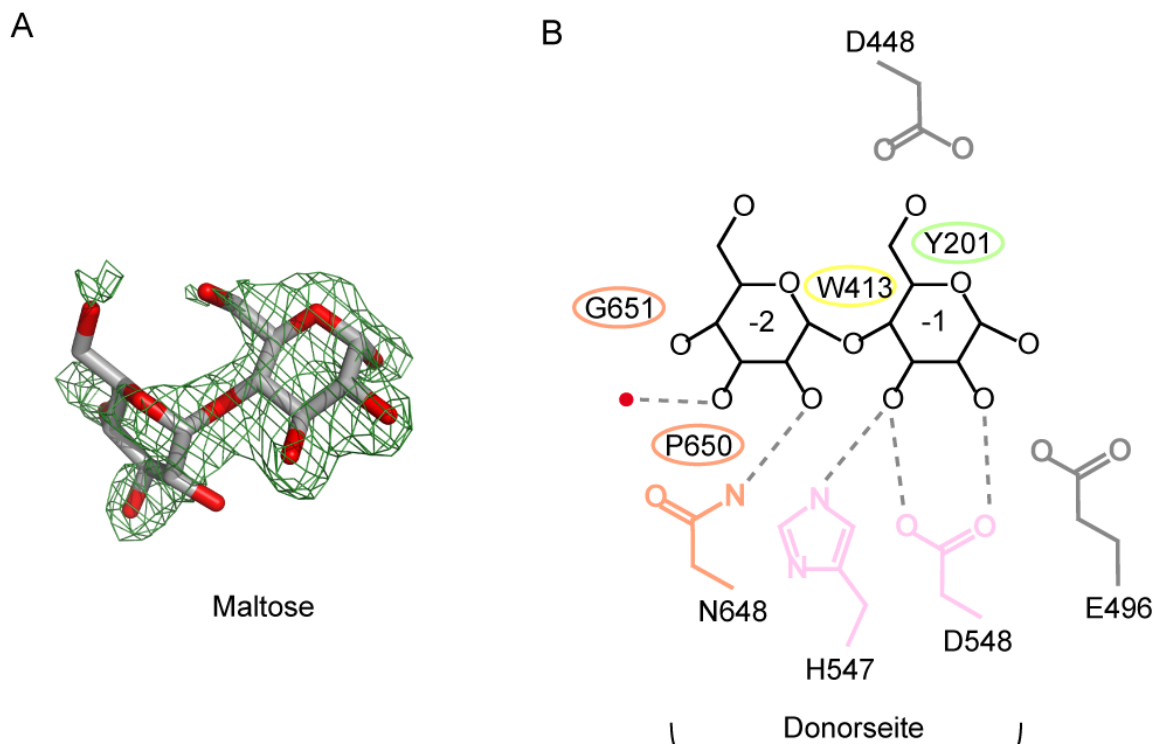


Abbildung 50: Ligandenbindung in der mit MalQ•Maltose Struktur. (A) F_o-F_c Differenzelektronendichtekarte (bei 2σ konturiert, grünes Netz) für den Liganden in Kette A der mit Maltotriose co-kristallisierten Struktur. Der Ligand ist als Stickrepräsentation überlagert, Kohlenstoffatome sind grau und Sauerstoffatome rot gefärbt. (B) Interaktionen zwischen Maltose und MalQ. Die Aminosäuren sind entsprechend ihrer Domänenzugehörigkeit aus Abbildung 42 gefärbt.

Die Glucoseeinheit in Subsite -2 wird über zwei Wasserstoffbrücken zu Asn648 und ein Wassermoleküle gebunden. Zusätzlich gibt es vdW Kontakte zu Pro650 und Gly651. Dagegen wird die Glucoseeinheit in Subsite -1 durch insgesamt drei Wasserstoffbrücken mit Asp548 und His547 sowie durch hydrophobe Kontakte zu Trp413 und Tyr213 positioniert. Das katalytische Nukleophil Asp448 ist mit einer Entfernung von $4,2 \text{ \AA}$ zum C1 Atom der Glucose für einen möglichen nukleophilen Angriff auf den Liganden zu weit entfernt. Auch Glu496 und Asp548 sind mit $6,0 \text{ \AA}$ bzw. $4,8 \text{ \AA}$ zu weit von der 1'-OH-Gruppe entfernt, um mit der Maltose zu wechselwirken. Obwohl sich die Interaktionen von MalQ mit AGA und Maltose grundsätzlich ähneln, sind die katalytischen Reste in MalQ•Maltose weiter vom Liganden entfernt. Der Grund hierfür ist die deutlich stärkere Öffnung der Substratbindetasche. Dies erklärt auch die geringere Besetzung des Liganden in der MalQ•Maltose Struktur. Ob der enzymgebundene Ligand weitere, zu flexible Glucose-Einheiten am nicht-reduzierenden Ende enthält, kann daher nicht definitiv ausgeschlossen werden.

Die drei Strukturen MalQ-apo, MalQ•Maltose und MalQ•AGA entsprechen Schnappschüssen des katalytischen Zyklus von MalQ und erlauben zusammen einen detaillierten Einblick in die Konformationsänderungen, die während der Katalyse auftreten. Um diese qualitativ zu beschreiben, wurden alle drei Strukturen überlagert. Für diese Überlagerung wurden die 36

C α -Atome (Aminosäuren 143-148, 181-184, 370-375, 444-447, 492-495, 516-519, 540-543, 632-635) der acht β -Stränge des zentralen TIM-Barrels von Domäne A herangezogen. Die RMSD der Kernregionen untereinander beträgt nur etwa 0,4 Å zwischen den verschiedenen Konformationen. Anschließend wurden die Subdomänen als starre Körper betrachtet und ihre relative Orientierung im Verhältnis zur MalQ-apo Struktur untersucht. Subdomänen B2 / N1 sowie B3 der Maltose Struktur sind im Vergleich zur apo Struktur um etwa 3° bzw. 2° in Richtung der Ligandenbindestelle rotiert, so dass die Substratbindetasche der Maltose Struktur deutlich weiter geschlossen ist als die der apo Struktur (Abbildung 51). Dennoch sind die Subsites -2 und -1 teilweise für das Lösungsmittel zugänglich. Die MalQ•Maltose Struktur ist also weder vollständig offen noch geschlossen und kann daher als Zwischenzustand angesehen werden. Im Vergleich zur Maltose Struktur unterscheidet sich der MalQ•AGA Komplex wesentlich deutlicher von der MalQ-apo Konformation. Hier kommt es zu einer Rotation der Subdomänen B2 / N1 sowie B3 um etwa 9° bzw. 7° in Richtung des Liganden. Dadurch wird AGA in den Subsites -2 bis +2 vollständig durch Domäne A und die Subdomänen B2 und B3 begraben, sodass sich der erwähnte V-förmige Substrat-Tunnel ausbildet. Dieser Tunnel ist etwa 21 Å lang und hat an der schmalsten Stelle im Zentrum einen Durchmesser von etwa 4 Å.

Subdomäne N1 unterliegt aufgrund ihres engen Kontakts zu Subdomäne B2 einer ähnlichen Neuorientierung, bildet aber keinerlei Kontakte mit dem Liganden aus. Domäne N2 wird durch das Schließen der Substratbindetasche ebenfalls in geringem Umfang neu positioniert. Vermutlich haben diese Konformationsunterschiede keinen Einfluss auf die Katalyse, da N2 ohnehin nur eine geringe Kontaktfläche mit dem katalytischen Kern des Enzyms aufweist.

Eine Analyse der Protein B-Faktoren zeigt, dass der flexibelste Bereich der MalQ-apo Struktur die Linkerregion zwischen den Subdomänen N1 und N2 ist. Dieser Befund ist wenig überraschend, da der selbe Bereich in den Ligandenstrukturen keine interpretierbare Elektronendichte zeigt, d.h. ungeordnet ist.

Die Kristallstrukturen zeigen allerdings, dass die vier C-terminalen Argininreste des kristallisierten Expressionskonstrukts noch Bestandteil der letzten α -Helix sind. Wahrscheinlich ist das der Grund, warum sich MalQ₁₋₆₈₄ schlechter exprimieren und reinigen ließ als MalQ₁₋₆₈₈.

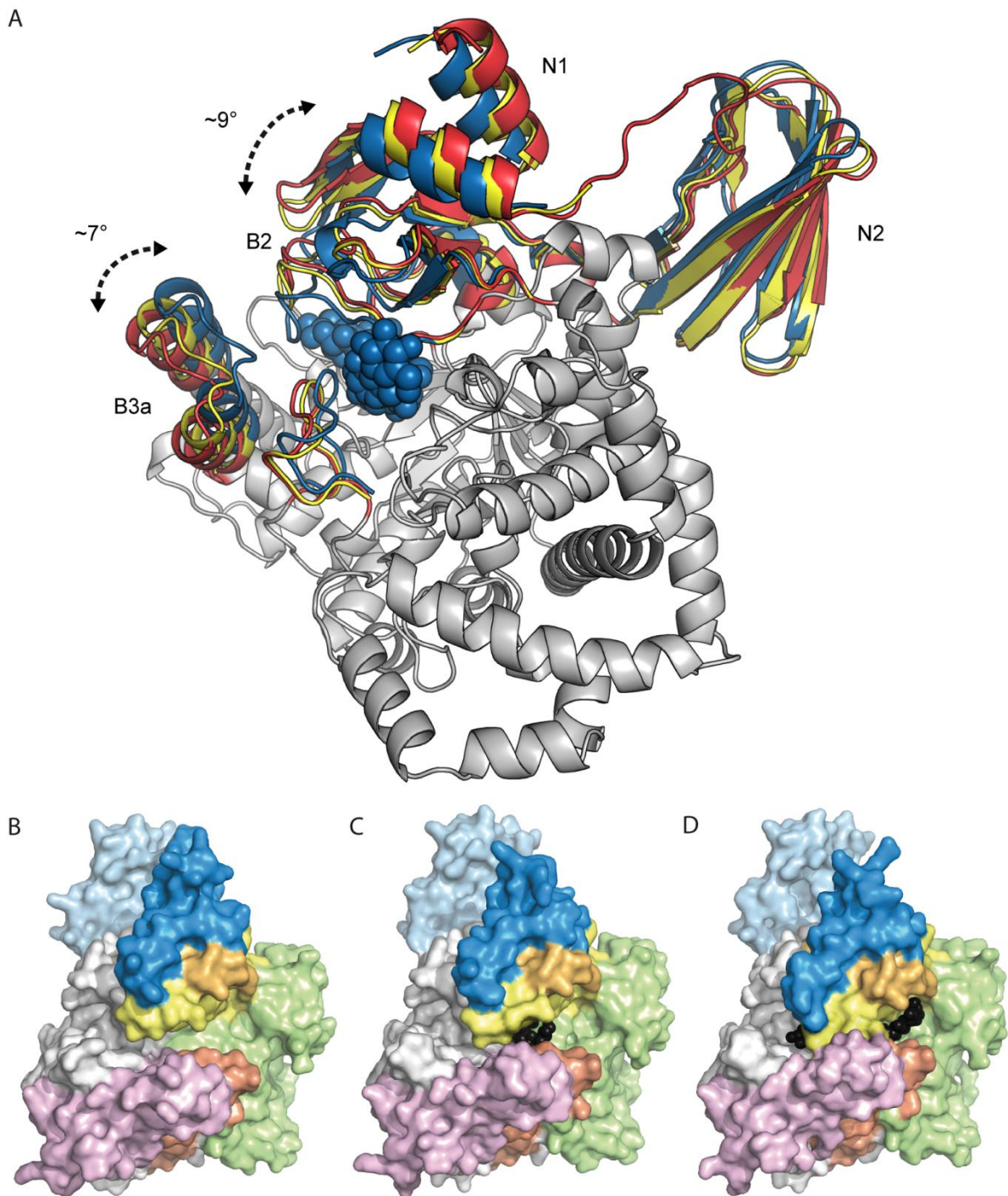


Abbildung 51: Domänenbewegungen von MalQ. (A) Überlagerungen der MalQ•AGA und MalQ•Maltose Komplexe auf die MalQ-apo Struktur. Die Kerndomäne ist hellgrau gefärbt und nur für die apo-Struktur abgebildet. Flexible Bereiche sind für MalQ-apo (rot), MalQ•Maltose (gelb) und MalQ•AGA (blau) farblich hervorgehoben. Der AGA-Ligand ist in Form blauer Kalotten abgebildet. (B), (C) und (D) Oberflächen-Darstellung von MalQ. (B) MalQ-apo (C) MalQ•Maltose (D) MalQ•AGA. Die Liganden sind als schwarze Kalotten abgebildet. Die Oberfläche von MalQ ist entsprechend der Domänenzugehörigkeit in Abbildung 42 eingefärbt.

Die am nächsten verwandten Strukturen zu MalQ aus *E. coli* sind die Amylomaltasen verschiedener *Thermus* Spezies. Im wesentlichen zeigen diese Strukturen eine identische Topologie, ihnen fehlt jedoch wie beschrieben die komplette N-terminale Domäne. Der

zweite markante strukturelle Unterschied ist in Subdomäne B3a zu finden. Diese befindet sich in direkter Nähe zur katalytisch essentiellen Domäne B2. In Subdomäne B3a bilden die Aminosäuren 569 bis 580 in *E. coli* MalQ eine Insertion, die zur Verlängerung von Helix 15 (*Thermus* Nomenklatur) führt sowie eine zusätzliche, parallel dazu verlaufende weitere α -Helix (Abbildung 52). Diese Aminosäuren tragen daher nicht zur Substratbindung in *Thermus* Enzymen bei.

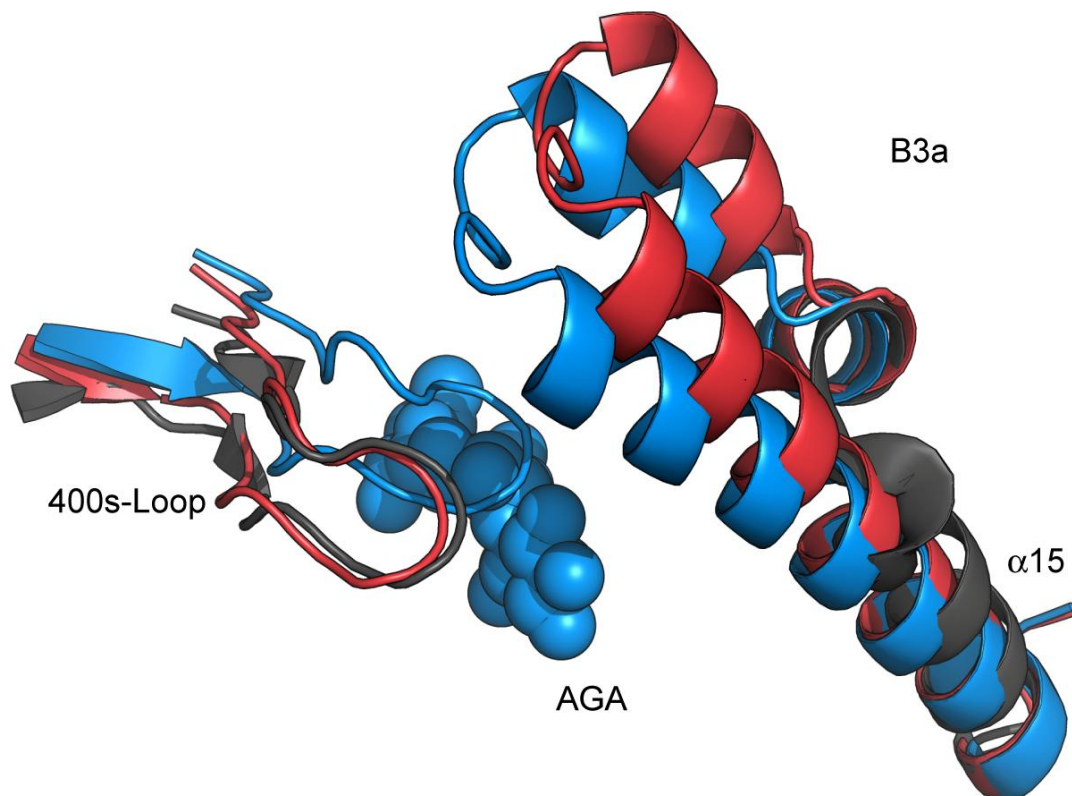


Abbildung 52: Vergleich der Subdomänen B3a von MalQ und *Thermus* Amylomaltasen. Die Unterschiede zwischen der α -Helix 15 (*Thermus* Nomenklatur) der *Thermus aquaticus* Struktur (grau) sowie der entsprechenden Region der *E. coli* Amylomaltase. Die MalQ-apo Struktur ist rot dargestellt und MalQ•AGA blau. Der AGA Ligand in Subsites +1 bis +3 ist durch blaue Kalotten angedeutet.

Diese Verlängerung von Subdomäne B3a ist in MalQ direkt an der Ligandenbindung beteiligt (siehe Abbildung 49). Als Folge dessen sind die Subsites +1 bis +3 in den *Thermus* Amylomaltase-Strukturen wesentlich offener und besser zugänglich für das Lösungsmittel. Interessanterweise entspricht die Positionierung von Helix 15 in der *T. aquaticus* Amylomaltase (TaAM) mit gebundenem Acarbose-Liganden eher der MalQ-apo Orientierung als der von MalQ•AGA. Die TaAM wurde allerdings in der apo Form kristallisiert und der Ligand durch Soaking gebunden. Vermutlich kann es aufgrund der fixierten Kristallpackung während des Soakings zu keiner Umlagerung von Helix 15 bei TaAM kommen. Möglicherweise sind die kürzere Helix 15 und der folgende kürzere Loop auch nicht flexibel

genug, um bei Ligandenbindung eine größere Umorientierung analog zu *E. coli* MalQ durchzuführen.

4.3.7 Enzymatische Aktivität der Amylomaltase

Die enzymatische Aktivität der Amylomaltase wurde anhand der Substrate Maltose, Maltose versetzt mit 1 μ M Maltotriose, Maltotriose und dem Inhibitor Acarbose untersucht. Hierfür wurden die Reaktionen zu verschiedenen Zeitpunkten durch Hitzeschock gestoppt und die entstandenen Zucker mit Dansylhydrazin derivatisiert. Die Zuckerderivate sowie deren relativer Anteil wurde mittels HPLC durch Integration der entsprechenden Peakflächen bestimmt. Der Elutionszeitpunkt eines Zuckerderivates von der C18-Säule entspricht dabei seiner Hydrophobizität. Je hydrophiler das Zuckerhydrazon ist (d.h. je mehr Glucose-Einheiten pro Dansylanteil enthalten sind), desto früher eluiert es im Acetonitrilgradienten (Tabelle 12).

Tabelle 12: Kalibrierung der C18-Säule mit Dansylhydrazon-Zuckerderivaten.

Zucker	Retentionszeit [min]
Glucose-Hydrazon	23,6
Maltose-Hydrazon	22,4
Maltotriose-Hydrazon	20,7
Acarbose-Hydrazon	20,6
Maltotetraose-Hydrazon	18,6
Maltopentaose-Hydrazon	17,2

Insgesamt zeigt sich sowohl für Maltose als auch für Maltotriose, dass es zu einer kontinuierlichen Abnahme des eingesetzten Substrats kommt, während die Konzentration an Glucose und anderen Maltodextrinen stetig zunimmt, bis sie sich offenbar ein Gleichgewichtszustand einstellt. Interessanterweise sind die beobachteten Gleichgewichtskonzentrationen abhängig vom eingesetzten Maltodextrin. Wird Maltose als Substrat eingesetzt, entspricht die entstandene Glucose mengenmäßig etwa der Hälfte aller Zucker im Gleichgewicht, wohingegen sich dieser Anteil mit Maltotriose als Substrat auf etwa ein Drittel reduziert (Abbildung 53).

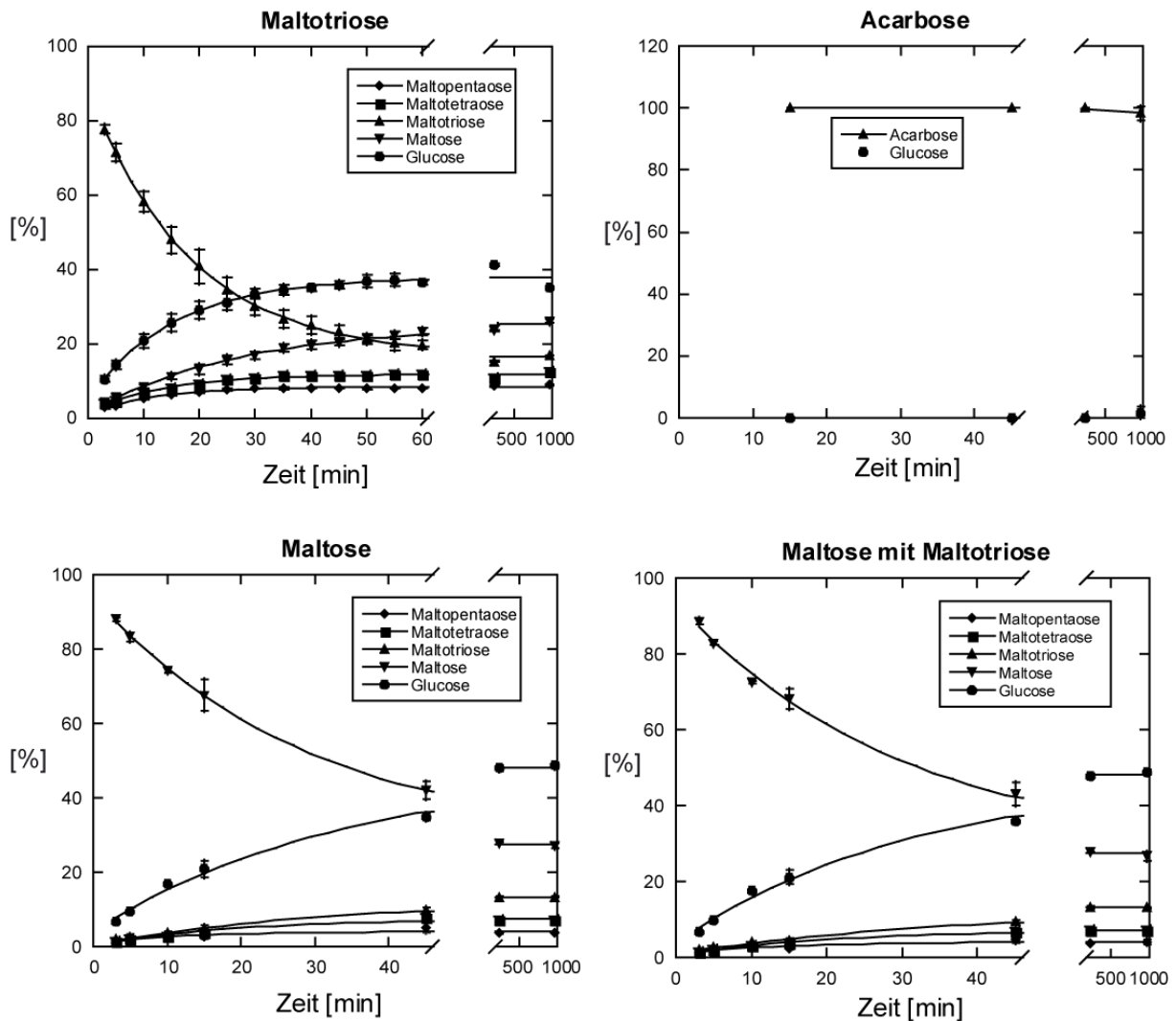


Abbildung 53: Enzymatischer Assay der Amylomaltase. Zur Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufs des Produktspektrums wurden die Konzentrationen der jeweiligen Produkte für die Substrate Maltose, Maltotriose und Maltose mit Spuren von Maltotriose sowie den Inhibitor Acarbose gegen die Zeit aufgetragen.

Es zeigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen dem Anteil an Glucose im Gleichgewicht und der Länge des eingesetzten Zuckersubstrates. Genauer gesagt, lässt sich die der Glucoseanteil im Gleichgewicht mit der Formel $1 - \frac{b}{b+1}$ berechnen. Dabei entspricht b der Anzahl an glycosidischen Bindungen im Startsubstrat. Somit ergeben sich 1/2 bzw. 50 % Glucose im Gleichgewicht für Maltose ($b = 1$) und 1/3 bzw. 33 % Glucose im Gleichgewicht für Maltotriose ($b = 2$). Ein vergleichbarer Trend zeichnete sich auch für die Konzentrationen der längeren Maltodextrine im Gleichgewicht ab. Dabei nimmt die relative Konzentration jedes um eine Glucoseeinheit längeren Maltodextrins im Gleichgewicht um den gleichen Faktor ab (d.h. um 50 % bei Maltose und um 33 % bei Maltotriose als Startsubstrat).

$$c_i = \sum_{n=1}^{\infty} c_n^0 * \left(1 - \frac{b}{b+1}\right) \left(\frac{b}{b+1}\right)^{(i-1)} \quad (4)$$

Bei Substratgemischen hängt das Gleichgewicht entsprechend von der durchschnittlichen Anzahl glycosidischer Bindungen b pro Substratmolekül ab (Abbildung 54). Der Gleichgewichtsanteil eines Maltodextrins kann somit für jede beliebige eingesetzte Substratkonzentration durch Gleichung (4) berechnet werden. Dabei steht n für die Anzahl Glucose-Einheiten des eingesetzten Substrats und i für die Glucose-Einheiten des jeweiligen Maltodextrins im Gleichgewicht. Dieser Zusammenhang wurde auch für die Reaktion der disproportionierenden Enzyme DPE1 aus *Arabidopsis thaliana* und D-Enzym aus der Kartoffel beschrieben (Kartal *et al.*, 2011; Nakatani, 1999).

Mit dieser Gleichung wurden die theoretisch erwarteten Konzentrationen für Maltodextrine mit einer Länge von bis zu acht Glucoseeinheiten im Gleichgewicht berechnet und mit den experimentell gemessenen Werten verglichen (Abbildung 54A). Problematisch war bei der experimentellen Bestimmung der Gleichgewichtskonzentrationen, dass nur Maltodextrine bis zu einer Länge von 5 Glucoseeinheiten gemessen werden konnten, d.h. ihr relativer Anteil im Gleichgewicht aller Maltodextrine wird zwangsläufig überschätzt. Um die Anwesenheit der längeren, nicht messbaren Maltodextrine zu berücksichtigen, wurden die experimentellen Werte mit den theoretisch zu erwartenden Werte bis Maltopentaose durch Dreisatzrechnung korrigiert.

Durch Multiplikation der erhaltenen Gleichgewichtskonzentrationen mit der jeweiligen Anzahl glycosidischer Bindungen und anschließender Summation der mathematischen Produkte kann man die Gesamtanzahl der glycosidischen Bindungen im Gleichgewicht berechnen. So lässt sich überprüfen, ob es während der Amylomaltase-Reaktion zu hydrolytischen Nebenreaktionen kommt. Tritt keine Hydrolyse des kovalenten Intermediats auf, muss die Anzahl der glycosidischen Bindungen zu jedem Zeitpunkt konstant bleiben. Diese Annahme wird durch folgende Befunde gestützt: i) die berechnete Konzentration der glycosidischen Bindungen im Gleichgewicht liegt für alle eingesetzten Substratkonzentrationen etwas oberhalb der theoretischen Werte ii) in gleichem Maße werden die korrigierten Glucosekonzentrationen unterschätzt iii) es stellt sich eine Gleichgewichtskonzentration der Maltodextrine ein und vi) es kommt nicht zur Totalhydrolyse über die Zeit, d.h. nach Einstellung des Gleichgewichts bleibt die Glucosekonzentration unverändert.

Der MalQ Assay wurde außerdem mit verschiedenen Substratkombinationen aus Glucose, Maltose und Maltotriose durchgeführt, um mit den ermittelten Maltodextrin-Gleichgewichtskonzentrationen Gleichung (4) zu überprüfen. Dazu wurden u. a. Mischungen aus 50 % Glucose mit 50 % Maltose, 50 % Glucose mit 50 % Maltotriose sowie 33 % Glucose mit 33 % Maltose und 33 % Maltotriose untersucht. Die Mischung aus 100 mM Glucose und 100 mM Maltose zeigte wie durch Gleichung (4) vorhergesagt etwa 66 % Glucose im Gleichgewicht. Dies ist von besonderem Interesse, da MalQ offensichtlich auch

in Gegenwart von 133 mM Glucose aktiv ist. Dies widerspricht früheren Behauptungen nach denen Glucosekonzentrationen > 0.1 M MalQ inhibieren (Dippel & Boos, 2005).

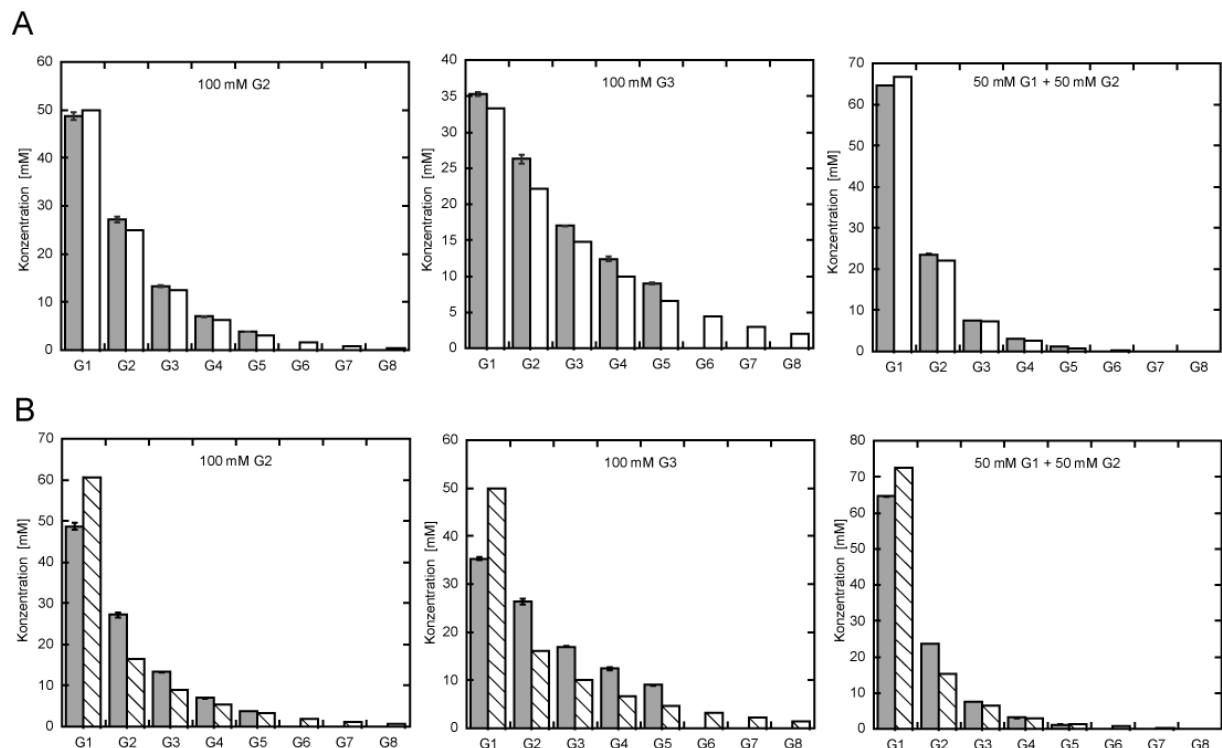


Abbildung 54: Produktverteilung im Gleichgewicht der MalQ-Reaktion. Vergleich der experimentell bestimmten Gleichgewichtskonzentrationen (dargestellt als graue Balken) mit (A) den Werten aus Gleichung (4) (dargestellt als weiße Balken) und (B) der ungewichteten Simulationen (dargestellt als gestreifte Balken). Die Produkte G1 bis G8 entsprechen Glucose bis Maltooktaose. Abgebildet sind jeweils die Reaktionen mit 100 mM Maltose, 100 mM Maltotriose bzw. einer Kombination aus 50 mM Glucose und 50 mM Maltose als Startsubstrat.

Wie erwartet, führen auch alle anderen getesteten Substratkombinationen zu Gleichgewichtskonzentrationen, die durch Gleichung (4) vorhergesagt werden (Abbildung 55). Die hier ermittelten Gleichgewichtskonzentration für Maltose als Substrat sind außerdem vergleichbar mit denen die mit radioaktiv-markierten Substraten bestimmt wurden (Dippel & Boos, 2005).

Wie in Abschnitt 4.3.6 beschrieben, wurde in der Elektronendichte der MalQ•AGA Struktur ein Ligand mit sieben zusammenhängenden Zuckerringen beobachtet. Da die eingesetzte Acarbose 4 Zuckerringe enthält und kein anderer Zucker während der Reinigung oder der Kristallisation zugesetzt und auch kein Zucker in der MalQ-apo Struktur beobachtet wurde, muss die zugegebene Acarbose von MalQ umgesetzt worden sein. Um zu überprüfen, ob AGA aus einer Transglycosylierung zweier Acarbose-Moleküle resultiert, wurde der enzymatische Assay auch mit Acarbose als Substrat durchgeführt. Nach 4 h bei 30 °C konnte mittels HPLC-Analyse nur Acarbose, nachgewiesen werden. Bei Inkubation über Nacht zeigte sich aber, dass eine geringe Menge an Glucose gebildet wird, jedoch keine

Maltodextrine entstehen. Leider war es mit dem verwendeten Setup nicht möglich AGA-Hydrason direkt nachzuweisen. Die Zunahme des Glucose-Hydrason-Peaks und die MalQ•AGA Struktur belegen aber eindeutig, dass Acarbose von MalQ zu AGA und Glucose umgesetzt wird.

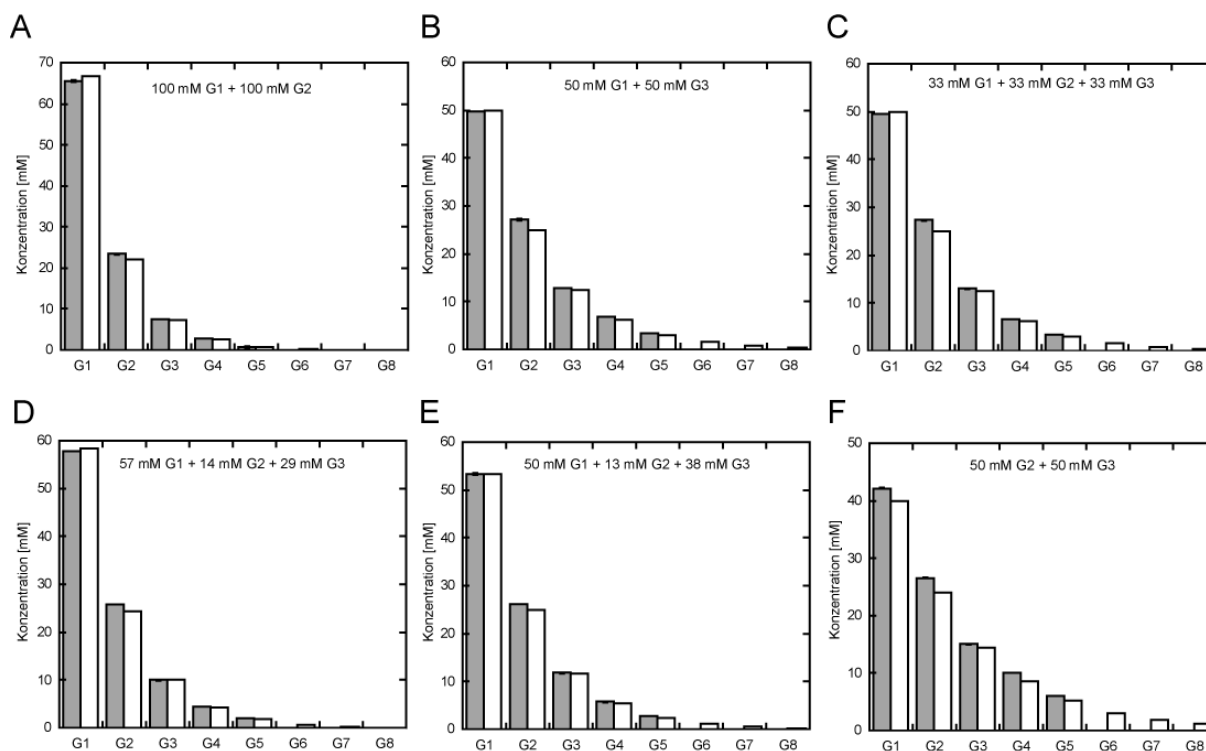


Abbildung 55: Produktverteilung im Gleichgewicht der MalQ-Reaktion mit verschiedenen Glucose/Maltodextrin-Substratgemischen. Vergleich der experimentell bestimmten Gleichgewichtskonzentrationen (dargestellt als graue Balken) mit den Werten aus Gleichung (4) (dargestellt als weiße Balken). Die Produkte G1 bis G8 entsprechen Glucose bis Maltoooktaose. Abgebildet sind jeweils die Reaktionen mit Kombinationen aus (A) 100 mM Glucose und 100 mM Maltose, (B) 50 mM Glucose und 50 mM Maltotriose, (C) 33 mM Glucose, 33 mM Maltose und 33 mM Maltotriose, (D) 57 mM Glucose, 14 mM Maltose und 29 mM Maltotriose, (E) 50 mM Glucose, 13 mM Maltose und 38 mM Maltotriose sowie (F) 50 mM Glucose Maltose und 50 mM Maltotriose als Startgemische.

Um das in der MalQ•AGA Struktur beobachtete AGA zu bilden, muss zunächst ein Acarbosemolekül in die Positionen -3 bis +1 im aktiven Zentrum von MalQ binden. Dann erfolgt die Abspaltung einer Glucoseeinheit am reduzierenden Ende, indem Glu496 die α -1,4-glycosidische Bindung zwischen den Glucoseeinheiten in den Positionen -1 und +1 protoniert und die negativ geladene Seitenkette von Asp448 das C1 des Pyranoserings in Subsite -1 angreift. So wird das Glucosemolekül vom reduzierenden Ende freigesetzt und das für die Reaktion typische kovalente Intermediat gebildet (Abbildung 56). Die freigesetzte Glucose in Position -1 kann nun durch ein zweites Acarbosemolekül ausgetauscht werden, da diese im Vergleich zu gebildeten Glucose in deutlichem Überschuss vorliegt.

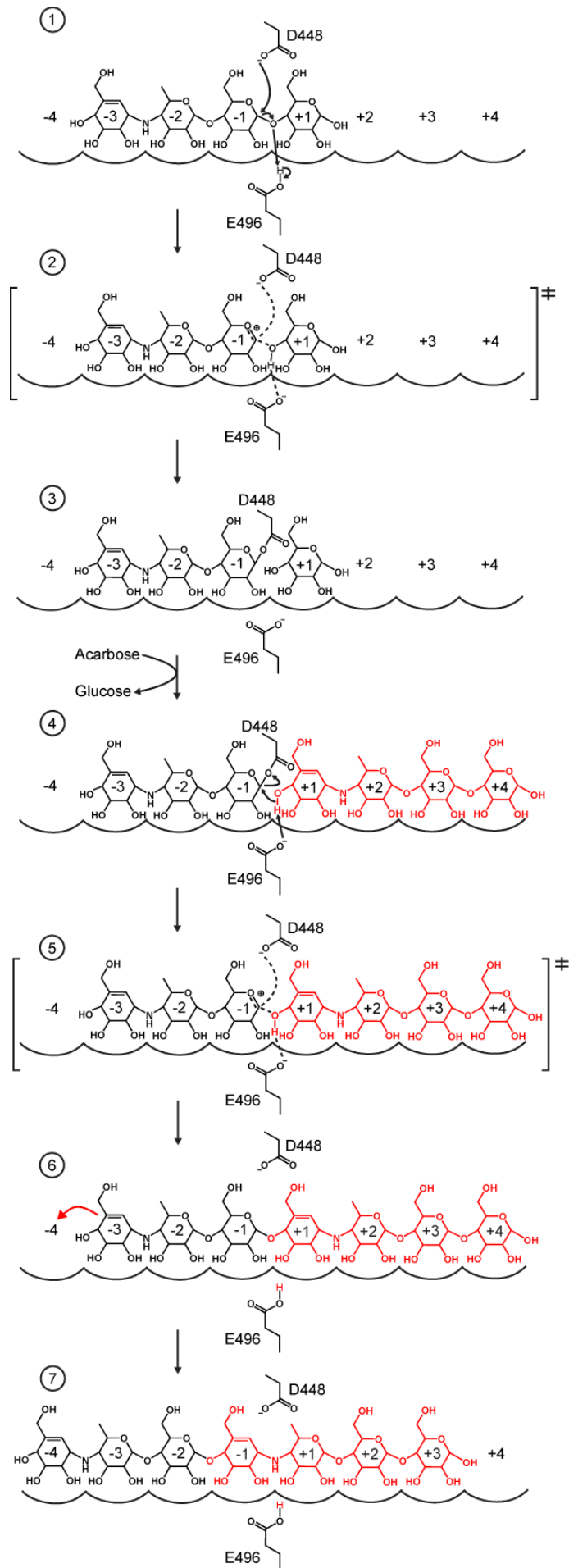


Abbildung 56: Reaktionsmechanismus der Amylomaltase mit Acarbose als Substrat. Das Donormolekül ist schwarz gefärbt, das Akzeptormolekül rot. Bögen und Zahlen symbolisieren die jeweilige Position in der Substratbindetasche. Die katalytisch essentiellen Aminosäuren Asp448 und Glu496 sind als Sticks abgebildet. Die Reaktion verläuft in sieben Schritten, die jeweils verschiedenen Kristallstrukturen entsprechen. Schritte 1 und 6 entsprechen der beobachteten MalQ•Maltose Struktur, während Schritte 2, 5 (und 7) der MalQ•AGA Struktur entsprechen.

Die zweite Acarbose besetzt die Positionen +1 bis +4 und greift mit seiner freien 4'-OH-Gruppe am nicht-reduzierenden Ende das kovalent am Enzym gebundene Intermediat nukleophil an. Dieser Angriff wird durch die Glu496 vermittelte Deprotonierung der attackierenden 4'-OH-Gruppe unterstützt. So bildet sich das Pseudo-Heptasaccharid AGA, welches vom Enzym dissoziieren kann. Allerdings kommt es sofort zur Rückbindung in die Substratbindetasche in einer energetisch günstigeren Position, die einer Verschiebung um eine Position in Richtung Donorseite entspricht. Auf diese Weise bindet die zweite nicht-hydrolysierbare N-glycosidische Bindung des Pseudo-Heptasaccharids zwischen den Positionen -1 und +1. Die feste Bindung von AGA hat somit zwei wesentliche Komponenten: i) die große Anzahl an Interaktionen mit der Substratbindetasche ii) die Imitation des Übergangszustands der Reaktion durch den planaren Cyclohexenring in Position -1. Die beobachtete exzellente Elektronendichte für AGA unterstreicht dessen feste Bindung an MalQ mit vermutlich niedriger K_D und ist konsistent mit einer sehr geringen Umsetzung von Acarbose zu AGA und Glucose bzw. einer starken Produkthemmung durch AGA. Der Austausch von AGA gegen Acarbose erfolgt extrem langsam, weshalb zu Beginn des Assays nur Acarbose aber keine Glucose beobachtet werden konnte. Erst nach Inkubation über Nacht wurde ausreichend Acarbose zu AGA und Glucose umgesetzt, so dass Glucose als Glucose-Hydraxon mittels HPLC nachgewiesen werden konnte. Analog zum HPLC Assay wurde ein gekoppelter Glucoseoxidase/Peroxidase Assay der Amylomaltase-Reaktion mit Acarbose durchgeführt. Auch hier konnte erst nach Inkubation bei 20 °C über Nacht eine Rotfärbung und damit Glucosebildung nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für den SEC-Puffer mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 2 mM BME als auch den Kristallisationspuffer mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 12,5 % (w/v) PEG-8000, 250 mM NaCl, 100 mM LiCl und 2 mM BME.

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung von MalT und MalT-Fragmenten

5.1.1 Optimierung der Löslichkeit und Stabilität von MalT-Fragmenten

Wie bereits in früheren Publikationen aufgezeigt, lässt sich das MalT Protein weder gut produzieren noch reinigen. So ließ sich das Volllänge MalT zwar in *malT* *E. coli* Stämmen in einer hohen Ausbeute überproduzieren, lag dann allerdings vollständig als Proteinaggregat vor, das sich auch durch Zugabe von Detergenzien nicht in Lösung bringen ließ (Débarbouillé *et al.*, 1982). Es war aber möglich MalT unter der Kontrolle eines schwächeren Promotors, nämlich seines eigenen, in geringerer Ausbeute zu produzieren (Raibaud *et al.*, 1985). Allerdings konnte es selbst unter diesen Bedingungen erst nach einer Ammoniumsulfatfällung und anschließender Renaturierung in einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 % (w/v) Saccharose, 300 mM KCl und 0,1 mM ATP stabil in Lösung gebracht werden (Richet & Raibaud, 1987).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Überexpression des intaktem MalT unter der Kontrolle eines tetR Promotors in *E. coli* BL21 bei einer Temperatur von 37 °C ausschließlich zur Bildung von Proteinaggregat führt. Außerdem stellten die Zellen nach Induktion ihr Wachstum ein. In löslicher Form konnte das Volllänge MalT daher wie in der Literatur beschrieben nur in dem *E. coli* Stamm RD130 produziert werden, in dem die natürliche Produktion des MalT Proteins durch zwei Mutationen erhöht ist. Die *malTp1* Mutation des *E. coli* RD130 Stammes befindet sich in der Pribnow Box des Promotors und erhöht vermutlich die Transkriptionsinitiationsrate, während die *malTp7* Mutation in der Shine Delgarno Sequenz liegt und wahrscheinlich eine verbesserte Ribosomen-Bindung an die *malT* mRNA bewirkt. Diese beiden Mutationen führen dann zusammen zu einer etwa dreißigfach erhöhten MalT Produktion im Vergleich zu dem Wildtypstamm (Chapon, 1982a; Chapon, 1982b).

Da alle untersuchten MalT-Fragmente zu einem großen Teil bereits während der Produktion aggregierten und der lösliche Proteinanteil nach Affinitätsreinigung in Standardpuffern auch nicht stabil zu sein schien, wurde versucht MalT durch Zugabe von Additiven zu stabilisieren. Zu diesem Zweck wurde ihr Oligomerisierungszustand bzw. die Aggregation in Gegenwart verschiedener Puffer mittels analytischer SEC untersucht. Die Vermutung, dass kleine organische Osmolyte, einen stabilisierenden Einfluss auf zelluläre Bestandteile wie Proteine haben, entstand aus der Beobachtung, dass sie sich in vielen Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen ansammeln, sobald diese Stress ausgesetzt sind (Brown & Simpson, 1972; Pollard & Wyn Jones, 1979; Yancey *et al.*, 1982). Schützenden Osmolyte oder auch Osmoprotektive können dabei in drei chemische Klassen eingeteilt werden: 1.) Polyole, u.a.

Glycerin, Saccharose und Trehalose, 2.) bestimmte Aminosäuren wie Prolin und Glycin in ihrer di- bzw. trimethylierten Form und 3.) einige Methylamine wie z.B. Betain und Sarcosin (Murphy, 2001). Lee und Timasheff konnten zeigen, dass der stabilisierende Effekt von Saccharose darauf zurückzuführen ist, dass Proteine von einer Schicht mit erhöhter Konzentration an Wassermolekülen umgeben sind (*preferential hydration*), weil Saccharose in der Regel nicht direkt mit Proteinen interagiert und sich bevorzugt weiter entfernt vom Protein aufhält (*preferential exclusion of ligand*) (Lee & Timasheff, 1981). Dieser Effekt konnte auch für verschiedene andere Zucker, Salze und Aminosäuren gezeigt werden (Arakawa & Timasheff, 1982b; Arakawa & Timasheff, 1982a; Arakawa & Timasheff, 1983; Kita *et al.*, 1994). Diese *preferential exclusion* bewirkt im genauen Gegensatz zur Bindung eines Liganden an ein Protein ein positives ΔG^0 , so dass das chemische Standardpotential des Osmolyt-Protein-Systems größer ist als die Summe der chemischen Standardpotentiale des freien Liganden und des freien Proteins (Arakawa *et al.*, 1990; Liu & Bolen, 1995), was letztendlich zur Stabilisierung der Protein 3D Struktur beiträgt.

Versuche MalT durch die geschickte Wahl von Pufferbedingungen zu stabilisieren, zeigten, dass die Anwesenheit des Liganden ATP einen deutlichen positiven Effekt auf die Stabilität hat. Des Weiteren hatten sowohl Glycerin, Saccharose als auch eine NaCl-Konzentration von 500 mM ebenfalls eine stabilisierende Wirkung. Der Osmolyt Betain und Maltose schienen dagegen sogar einen destabilisierenden Effekt zu haben. Außerdem waren die MalT-Fragmente insgesamt in Puffern mit niedriger Ionenstärke oder geringen pH-Wert weniger stabil, als bei einer höheren Ionenstärke oder einem höheren pH-Wert. Im Fall von MalT₁₋₈₀₆ konnten für Puffer mit niedrigerem pH Wert oder niedriger Ionenstärke nicht einmal Schmelzkurven bei der Durchführung des Thermofluorassays gemessen werden, da das Protein bereits zu Versuchsbeginn bei Raumtemperatur denaturiert vorlag. Die höchste Stabilität wurde in 20 mM HEPES/Na pH 8,0, 7,5 % (v/v) Glycerin, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP und 2 mM BME erzielt. In diesem Puffer lagen MalT₁₋₃₈₀ und MalT₁₋₈₀₆ zumindest über einen Zeitraum von mehr als einer Woche stabil als Monomer vor.

Ein Vergleich der MalT Sequenzen aus *E. coli* und *Salmonella typhimurium* zeigte, dass beide Proteine eine Sequenzidentität von 91 % und eine Ähnlichkeit von 98 % aufweisen. Interessanterweise besitzt *E. coli* MalT jedoch drei freie Cystein-Reste - Cys93, Cys197 und Cys319 - mehr als *Salmonella* MalT (Abbildung 16). Cysteine sind das Hauptangriffsziel von reaktiven Sauerstoffspezies, können leicht oxidiert werden und dadurch zur Destabilisierung von Proteinstrukturen führen (Kim *et al.*, 2014). Dabei kann der Schwefel in den Oxidationsstufen -2 bis +4 u. a. in folgenden Zuständen auftreten: Thiol (-SH; -2), Disulfid (-S-S-; -1), Sulfensäure (-S-OH; 0), Sulfinsäure (-SO₂H; +2) und Sulfonsäure (-SO₃H; +4). Die Sulfensäure wird dabei häufig durch direkte Reaktion des Thiols mit einem zwei-Elektronen-Oxidationsmitteln wie z.B. H₂O₂ gebildet (Lim *et al.*, 2011) und kann durch Reaktion mit

einem Thiolat unter OH⁻-Freisetzung zu einem Disulfid weiterreagieren. Die Sulfinsäure entsteht meist durch eine Disproportionierungsreaktion zweier Sulfensäuren (Abraham *et al.*, 1983). Bei weiterer Oxidation der Sulfinsäure durch z.B. H₂O₂ kann es zur Bildung von Sulfonsäure kommen. Diese stellt die höchste Oxidationsstufe des Schwefels aus Cystein dar und kann biologisch nicht mehr reduziert werden (Lim *et al.*, 2008). Um derartigen strukturellen Veränderungen und damit Stabilitätsproblemen entgegen zu wirken, wurden basierend auf *S. thyphimurium* MalT mehrere Serin Mutanten von MalT hergestellt. Serin wurde außerdem gewählt, da seine Hydroxylgruppe der Thiolgruppe von Cystein sterisch am ähnlichsten ist und es etwas hydrophiler ist. Für einige Proteine wurde bereits beschrieben, dass der Austausch von katalytisch irrelevanten Cysteinresten einen positiven Einfluss auf die Aktivität und Stabilität von Proteinen hat, so z.B. für den *Acidic fibroblast growth factor* (aFGF) (Ortega *et al.*, 1991). Deshalb wurden MalT Konstrukte mit den Mutationen CAIC90SATS, C197S und - wo vorhanden - auch C319S erstellt. Ile92 wurde durch das ebenfalls β -verzweigte Threonin, das an der selben Position auch in der *Salmonella* Sequenz auftritt, ersetzt. Threonin ist hydrophiler als Isoleucin und sollte daher die Löslichkeit der MalT Mutante im Vergleich zum nativen MalT ebenfalls etwas erhöhen. Das Ersetzen dieser vier Cysteine in der *E. coli* MalT Sequenz durch Serine führte aber nicht wie gewünscht zu einer erhöhten Ausbeute oder Stabilität der unterschiedlichen Fragmente. Vielmehr kam es bei der Überexpression und anschließenden Affinitätschromatographie der MalT₁₋₂₄₆ Serin Varianten zur Anreicherung zweier Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa anstatt des gewünschten Proteins. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Proteinen um Chaperone, wie DnaK (69 kDa (Zhu *et al.*, 1996)) die durch Überexpression eines faltungsdefizienten Proteins induziert werden. Falls es sich tatsächlich um Chaperone handeln sollte, würde es darauf hindeuten, dass diese MalT-Fragmente bereits während der Expression zur Bildung von Proteinaggregaten neigen und die *E. coli* Zellen als Antwort verstärkt Chaperone produzieren, um diesem Stress zu begegnen. Alternativ könnte ein Teil der ausgetauschten Cysteinreste oder das Isoleucin, anders als beim APAF-1-basierenden Strukturmodell, ins Proteininnere gerichtet sein und so die Proteinfaltung aufgrund verminderter hydrophober Wechselwirkungen negativ beeinflussen. Im Fall der Triosephosphat-Isomerase aus *Saccharomyces cerevisiae* führte das Ersetzen eines im Proteinkern befindlichen Cysteinrestes durch ein Serin zu einer Destabilisierung des Enzyms (Hernandez-Santoyo *et al.*, 2012). Auch der Austausch zweier Cysteine im hydrophoben Teil der Glucose Permease aus *E. coli* führte zu einer Destabilisierung des Enzyms (Nuoffer *et al.*, 1988).

Die in dieser Arbeit beobachteten Schwierigkeiten bei der Handhabung von MalT und seiner Fragmente ist keine Einzelfall. So wurden auch bei anderen STAND Proteinen Stabilitätsprobleme beobachtet, wie z.B. für das Resistenz Protein RPI2 aus der Tomate

(*Lycopersicon esculentum*) (Tameling *et al.*, 2002), RPS5 aus *Arabidopsis* (Ade *et al.*, 2007), APAF-1 aus dem Menschen (Riedl *et al.*, 2005) und Monarch-1 aus dem Menschen (Ye *et al.*, 2008). Sogar Fragmente dieser Proteine konnten teilweise nur als Fusionsproteine mit der Glutathion S-Transferase (GST) oder Maltose-Bindeprotein (MBP) heterolog in Bakterien produziert werden. Teilweise erforderte die Reinigung auch die Rückfaltung des produzierten Proteins und Stabilisierung durch die Zugabe von Osmolyten.

Trotz ihrer Neigung zur Aggregation zeigten die Fragmente MalT₁₋₃₈₀ und MalT₁₋₈₀₆ signifikante ATP-Hydrolyse in einem gekoppelten enzymatischen Assay. Dies bedeutet, dass zumindest die ATPase Domäne korrekt gefaltet vorlag. Interessanterweise hatte die Zugabe von Maltotriose weder einen Effekt auf die ATP-Hydrolyse-Rate von MalT₁₋₈₀₆ noch auf die von MalT₁₋₃₈₀. Dies ist verwunderlich, da die Hydrolyse von ATP eine wichtige Rolle im Aktivierungszyklus spielt und sich die ATP-Hydrolyse-Rate in Anwesenheit von 1 mM Maltotriose zumindest für MalT₁₋₈₀₆ um etwa das Fünffache erhöhen sollte (Marquenet & Richet, 2007; Marquenet & Richet, 2010). Eine fehlende Beschleunigung der Hydrolyse nach der Zugabe von Maltotriose in Anwesenheit der Maltotriose-bindenden Sensordomäne könnte darauf hindeuten, dass die Sensordomäne in einem inaktiven oder gar nicht-nativen Zustand vorliegt, in dem eine Bindung von Maltotriose nicht mehr möglich ist. Da die Sensordomäne alleine allerdings sogar kristallisiert werden konnte (Steegeborn *et al.*, 2001), ist es eher unwahrscheinlich, dass sie nicht korrekt gefaltet ist. Denkbar ist jedoch, dass die Kommunikation zwischen Sensordomäne und ATPase aufgrund von Faltungs- bzw. Konformationsproblemen nicht funktioniert. Zudem ist es möglich, dass die Maltotriosekonzentration mit 1 mM während des Experiments zu gering war, um zu einer Beschleunigung zu führen. Diese Beobachtung deckt sich mit Gelfiltrationsexperimenten von MalT₁₋₈₀₆ in Gegenwart von 2 mM Maltotriose, die nur eine minimale Verschiebung des Elutionspeaks zu höherem Molekulargewicht zeigten, obwohl nach Oligomerisierung von MalT₁₋₈₀₆ eine deutlich größere Verschiebung des Elutionsvolumens zu erwarten war (Schreiber & Richet, 1999). Im Gegensatz dazu war die gleichbleibende ATP-Hydrolyse-Rate für MalT₁₋₃₈₀ in An- und Abwesenheit von Maltotriose erwartet worden, da dieses MalT-Fragment keine Sensordomäne und damit auch keine Bindestelle für Maltotriose besitzt. Interessanterweise liegt die Aktivität von MalT₁₋₃₈₀ in einem Bereich, der dem Maltotriose-aktivierten Vollängen MalT entspricht (Marquenet & Richet, 2007; Marquenet & Richet, 2010), und ist somit deutlich höher als die Aktivität von MalT₁₋₈₀₆. Dies bedeutet, dass die NOD von MalT in Abwesenheit der Sensor- und Effektor-domäne durch ATP in den aktiven Zustand überführt wird oder wahrscheinlicher bereits dauerhaft in einem aktiven Zustand vorliegt.

Durch die Co-Reinigung von MalY mit verschiedenen MalT-Fragmenten konnte gezeigt werden, dass die ersten 246 Aminosäuren von MalT für eine Interaktion mit MalY

ausreichen. Das heißt, alle für die Interaktion mit MalY nötigen Aminosäuren befinden sich in der Nukleotid-bindenden Domäne von MalT, was frühere Befunde bestätigt (Schreiber *et al.*, 2000; Schlegel *et al.*, 2002b).

5.1.2 Beeinflussung der Kristallisation von MalT-Fragmenten durch optimierte Löslichkeit

Keines der Kristallisationsexperimente mit den verschiedenen MalT-Fragmenten führte zur Bildung von Proteinkristallen. Insbesondere der hohe Anteil von Niederschlagsbildung in den Kristallisationsansätzen innerhalb der ersten 48 Stunden zeigte allgemein, dass die untersuchten MalT-Fragmente sich nur schwer in einen übersättigten Lösungszustand überführen lassen, ohne zu präzipitieren. Dieser Befund spricht für eine geringe Stabilität der MalT-Fragmente und deckt sich mit experimentell bestimmten Schmelzkurven. Die mit Thermofluor ermittelten T_m -Werte liegen für die besten gefundenen Pufferbedingungen bei etwa 55 °C und sind somit im Vergleich zu vielen anderen Proteinen verhältnismäßig niedrig (Ericsson *et al.*, 2006; Boivin *et al.*, 2013). Bei den Kristallisationsexperimenten schien es auch keinen Unterschied zu machen, ob diese in Anwesenheit von ATP, ADP oder AMPPNP durchgeführt wurden, da diese scheinbar keinen Einfluss auf die Niederschlagshäufigkeit hatten. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass MalT ohne Maltotriose auch in Anwesenheit von ATP nicht oligomerisieren kann (Danot *et al.*, 2009; Marquetet & Richet, 2007; Marquetet & Richet, 2010). Dennoch musste festgestellt werden, dass sich keines der MalT-Fragmente kristallisieren ließ, obwohl die Absorptionsprofile der SEC zeigen, dass einige MalT-Fragmente in den Puffern mit Glycerin oder Saccharose in der monomeren Konformation vorliegen und somit eigentlich gut für die Kristallisation geeignet sein sollten.

Die bei dieser Arbeit angewendete Methode der Dampfdiffusion beruht darauf, dass zu Beginn des Experiments die Fällungsmittelkonzentration im Proteintropfen niedriger ist als in der Reservoirlösung. Nach und nach wird dem Proteintropfen durch das Reservoir Wasser entzogen, bis sich der Dampfdruck beider Flüssigkeiten angleicht. Dies führt zur Übersättigung der Lösung im Bezug auf das Protein und kann zur Keimbildung bzw. zum Kristallwachstum führen. Allerdings war es nötig zur Stabilisierung der MalT-Fragmente hohe Konzentrationen an NaCl, Glycerin oder Saccharose vorzulegen, die bekanntlich Keimbildung und Kristallwachstum behindern. Thermodynamische Untersuchungen zeigten z.B., dass die Anwesenheit von Glycerin während der Proteinkristallisation zur Verschiebung der flüssig-flüssig-Phasengrenze führt, in deren Nähe es am häufigsten zur Nukleation kommt. Diese Verschiebung kann sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung der Nukleationsrate bewirken (Galkin & Vekilov, 2000). Zumindest im Fall eines Trypsin-Inhibitors konnte gezeigt werden, dass Glycerin eine Verminderung der Nukleation bewirkt (Farnum & Zukoski, 1999). Vermutlich führte aber schon das Mischen Proteinpuffer und Reservoir mit jeweils hoher Ionenstärke in vielen Kristallisationsbedingungen zur sofortigen

Präzipitation eines Großteils der Proteine, weshalb keine Nukleation beobachtet werden konnte. Um dieses Problem zu umgehen, müsste man ein MalT-Fragment finden, das auch in einem Puffer mit einer geringen Ionenstärke zumindest eine gewisse Zeit stabil vorliegt. Jedoch scheinen die untersuchten Pufferbedingungen keinen genügend stabilisierenden Effekte zur erfolgreichen Kristallisation der MalT-Fragmente zu zeigen.

MalT₁₋₈₀₆ und MalT₁₋₂₄₇ konnten mit MalY auch als Komplex von der SEC eluiert werden. Allerdings bildeten sich auch hier keine Proteinkristalle. Hauptgrund dafür ist vermutlich die Instabilität der gereinigten MalT•MalY Komplexe, wie durch erneute Gelfiltration nach Lagerung bei 4 °C gezeigt werden konnte. Vermutlich zerfielen die Komplexe im Kristallisationstropfen. Die so freigesetzten MalT-Fragmente wären dann ebenso instabil wie in den Ansätzen ohne MalY. Folglich wäre nur noch lösliches MalY im Überstand, das theoretisch auch kristallisieren hätte können (Clausen *et al.*, 2000). Entweder wurde die MalY Kristallisation durch vorhandene Proteinaggregate behindert oder die MalY Konzentration war für die Keimbildung einfach zu gering.

5.2 Charakterisierung des MalM Proteins mit unbekannter Funktion

5.2.1 Das Signalpeptid von MalM

Mehr als 50 % aller zellulären Proteine von *E. coli*, sind zum Export bestimmt, wovon über 90 % durch das Sec System transportiert werden (Low *et al.*, 2013). Die Sekretionsmaschinerie unterscheidet dabei zu sekretierende von nicht zu sekretierenden Protein durch die Erkennung einer Signalpeptidsequenz (Gouridis *et al.*, 2009). Der Transport von Proteinen wird von der Abspaltung des Signalpeptids durch eine Signalpeptidase begleitet. Diese Spaltung ist jedoch keine Voraussetzung für den Transport. Ungeschnittene Vorläufermoleküle bleiben an der Membran gebunden, wobei das Signalpeptid als α -helikaler Membrananker fungiert (Rusch & Kendall, 2007).

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass es sich bei MalM um ein periplasmatisches Protein handelt. Sowohl bei Überexpression von Vollängen MalM als auch seiner N-terminalen Domäne (einschließlich potentielllem Signalpeptid) befand sich das Protein in der periplasmatischen Fraktion. Eine massenspektrometrische Untersuchung der beiden gereinigten Proteine führte zu dem Ergebnis, dass die ersten 26 Aminosäuren nicht mehr vorhanden sind. Dies bedeutet, dass es sich bei diesen ersten 26 Aminosäuren um die Signalpeptidsequenz handeln muss, die beim Transport ins Periplasma abgespalten wird. Signalpeptide sind üblicherweise 15 bis 30 Aminosäuren lang (Low *et al.*, 2013). Die Länge der MalM Signalpeptidsequenz liegt damit in einem typischen Bereich. Wie für viele Signalpeptide üblich, befinden sich auch in der MalM-Signalpeptidsequenz mit Lys2 und Lys5 nach dem Startmethionin positiv geladenen Aminosäuren (Rapoport, 1992; Nunnari &

Walter, 1992; Sanders & Schekman, 1992). Es wird vermutet, dass diese positiv geladenen Aminosäuren des Signalpeptids mit der negativ geladenen Membran interagieren und somit den Export ins Periplasma begünstigen (Killian *et al.*, 1990). Dieser N-terminale positiv geladene Bereich (*n-region*) umfasst häufig die ersten 5 bis 8 Aminosäuren des Signalpeptids (Low *et al.*, 2013). Anschließend folgt bei vielen Signalpeptiden ein Bereich mit überwiegend hydrophoben, ungeladenen Aminosäuren (*h-region*), die in einer nicht-polaren Umgebung häufig eine α -helikale Struktur annehmen (Hikita & Mizushima, 1992). In der MalM Signalsequenz sind das vor allem Leucine. Diese mittlere hydrophobe Core-Region besteht meist aus 8 bis 12 Aminosäuren (Low *et al.*, 2013). Den abschließenden C-terminalen Teil eines Signalpeptids bildet ein vergleichsweise hydrophilerer Bereich (*c-region*) (von Heijne, 1985), Ser19 und Ser24 in MalM. Üblicherweise umfasst dieser Bereich 5 bis 7 Aminosäuren (Low *et al.*, 2013), so dass er bei MalM mit 8 Aminosäuren relativ lang ist. Befinden sich an den Positionen -3 und -1 im Signalpeptid kleine, nicht geladene Aminosäuren, wird das Signalpeptid durch die Signalpeptidase abgeschnitten (Facey & Kuhn, 2004). Hier befinden sich in der Signalpeptidsequenz von MalM ein Serin- bzw. Alanin-Rest. Deren Aminosäureseitenketten sind klein und nicht geladen, weswegen das MalM-Signalpeptid - wie erwartet - beim Transport ins Periplasma abgespalten wird. Insgesamt zeigt das Signalpeptid von MalM somit eine typische Länge und Aminosäurezusammensetzung (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich der Signalpeptidsequenzen von MalM, MalE und OmpA.

Protein	Signalpeptidsequenz
MalM	MKMNKSLIVLCLSAGLLASAPGISLA
MalE	MKIKTGARILALSALTTMMFSASALA
OmpA	MKKTAIAlAVALAGFATVAQA

Rot = *n-region*, Grün = *h-region*, Gelb = *c-region*, Fett = -3 und -1 Position

Sowohl die reife N-terminale Domäne von MalM als auch das reife Volllänge MalM werden bei Produktion im *E. coli* Stamm JM83 mit sehr hoher Ausbeute produziert. Von beiden konnten etwa 40 mg gereinigtes Protein pro Liter Expressionsmedium nach Periplasmaaufschluss und Affinitätsreinigung gewonnen werden. Es wäre daher interessant die Transporteffizienz des MalM Signalpeptids mit einer häufig für Produktion von sekretorischen Proteinen verwendeten Sequenz, wie die von OmpA oder MalE (Ray *et al.*, 2002; Hytonen *et al.*, 2004; Sletta *et al.*, 2007) zu vergleichen. Hierzu könnte man verschiedene Konstrukte eines Standardproteins mit den entsprechenden Signalpeptiden konstruieren und die Ausbeute des Zielproteins im Periplasma unter identischen Produktionsbedingungen vergleichen.

5.2.2 MalM als Hexamer

Durch die SEC verschiedener MalM Fragmente in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein der C-terminalen Domäne von MalM (MalM₂₅₂₋₃₀₆) notwendig ist, um zu einer Hexamerisierung des Proteins zu führen. Möglicherweise ist die Hexamerisierung konzentrationsabhängig, denn sowohl MalM₂₇₋₃₀₆ als auch SUMO-MalM₂₅₂₋₃₀₆ eluierten als Hexamer, wenn sie in Konzentrationen von über 20 mg/ml auf die SEC aufgetragen wurden. Hingegen eluierte MalM₂₅₂₋₃₀₆ als Monomer, wenn es in einer Konzentration von etwa 5 mg/ml appliziert wurde. Die Durchführung einer SEC mit verschiedenen Konzentrationen an MalM₂₅₂₋₃₀₆ und MalM₂₇₋₃₀₆ könnte hierzu weitere Aufklärung liefern.

Die C-terminale Domäne von MalM mit nur 55 Aminosäuren konnte nicht als eigenständiges Protein in *E. coli* produziert werden. Dies ist wenig verwunderlich, da sich viele sehr kleine Proteine, bzw. Peptide nur schlecht rekombinant produzieren lassen bzw. schnell wieder abgebaut werden (Cheng *et al.*, 2003; Li, 2011). Die Ausbeute kann allerdings in vielen Fällen durch Fusion mit einem gut löslichen Protein drastisch erhöht werden (Bell *et al.*, 2013). Auch für MalM₂₅₂₋₃₀₆ konnte ein solcher Effekt gezeigt werden, denn das Fusionsprotein mit SUMO konnte in hoher Ausbeute in *E. coli* BL21 produziert werden.

Eine Vorhersage der Sekundärstruktur von MalM basierend auf der Aminosäuresequenz mit dem XtalPred-Server (Slabinski *et al.*, 2007b; Slabinski *et al.*, 2007a; Jahandideh *et al.*, 2014) legt nahe, dass es sich bei der C-terminalen Domäne um eine Abfolge von drei α -Helices handelt. Der vorhergehende Bereich zwischen Aminosäuren 225 und 250 weist einen hohen Gehalt an Alaninen und Prolinen auf. Vermutlich nimmt er deshalb keine definierte dreidimensionale Struktur ein, sondern ist relativ flexibel. Sehr wahrscheinlich handelt es sich hierbei um einen Linker, der die N- und C-terminale Domäne miteinander verbindet. Dies würde bedeuten, dass sich für die Bildung des Hexamer-Komplexes die Drei-Helix-Bündel der jeweiligen Monomere nach innen zu einem Kern zusammenlagern, während die N-terminale Domäne über den Linker nach außen positioniert wird.

Eine solche Zusammenlagerung ist in verschiedenen Orientierungen möglich (Abbildung 57): So kann sich zum einen ein Ring aus den sechs Monomeren bilden, wie in der *E. coli* Helikase RecA (Yu & Egelman, 1997) (Abbildung 57A), es wäre aber auch möglich, dass sich ein Dimer aus zwei Trimeren in unterschiedlichen Ebenen bildet. Diese beiden Trimere könnten sich jeweils direkt übereinander wie in der Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii* (Hall *et al.*, 2003) (Abbildung 57B) oder um 60° zueinander gedreht positionieren wie in der Glutamat-Synthase aus *Azospirillum brasilense* (Cottevieille *et al.*, 2008) (Abbildung 57C).

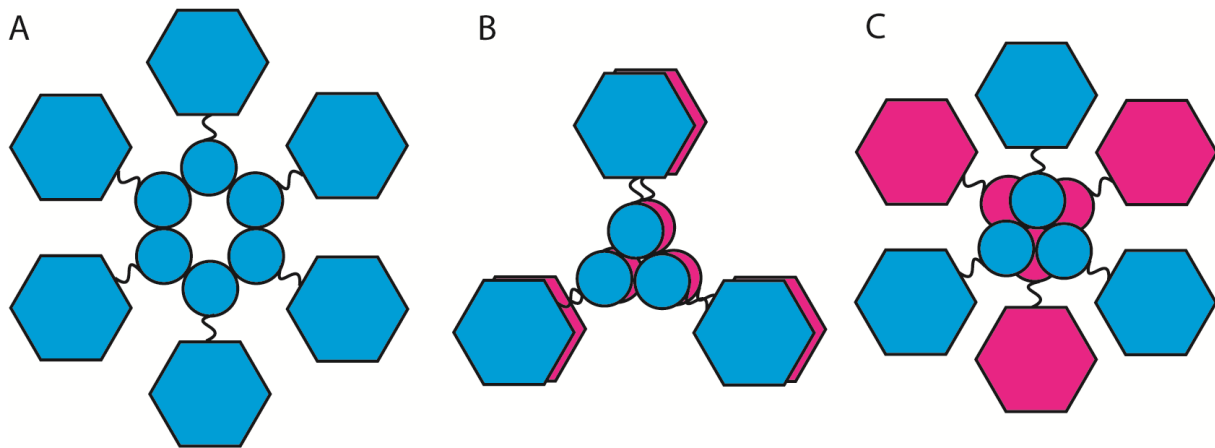


Abbildung 57: Mögliche Orientierungen des MalM Hexamers. Die Kreise symbolisieren die C-terminale Domäne, die Sechsecke die N-terminale Domäne. Blau und Magenta deuten in (B) und (C) je ein Trimer an.

In allen drei Fällen wäre es auch möglich, dass die N-terminal Domäne einen schwachen Beitrag zur Oligomerisierung leistet, der für den isolierten N-Terminus nicht beobachtet werden kann. Möglicherweise ist es hilfreich sich die Eigenschaften anderer oligomerer Proteine anzusehen, um einen Einblick zu der bisher unbekannt Funktion von MalM zu bekommen. So kann die Oligomerisierung von Proteinen verschiedene Vorteile haben (Ali & Imperiali, 2005): 1.) In der Proteininteraktionsfläche kann ein neues aktives Zentrum gebildet werden. 2.) Oligomere können allosterisch reguliert werden. 3.) Die Aktivität des Oligomers kann sich von der des Monomers unterscheiden. 4.) Mutationen und Deletionen können bei oligomeren Proteinen zu einer stärkeren Funktionsänderung als bei Monomeren führen. 5.) Größere Proteine sind stärker gegen Abbau und Denaturierung geschützt. Diese Punkte (insbesondere 1 bis 4) sind vor allem für Enzyme von großer Bedeutung. Eine enzymatische Aktivität von MalM ist aber eher unwahrscheinlich, da bisher keine *malM* Mutanten gefunden wurden, die nicht auf Maltose-Medien wachsen können. Selbst *malM* Deletionsmutanten sind in der Lage auf Maltose zu wachsen (Gilson *et al.*, 1986). Für einige periplasmatische Bindeproteine wurde vermutet, dass sie aus Oligomeren bestehen (Saurin & Dassa, 1994; Kuan *et al.*, 1995). Da sich *malM* in der *malB* Region befindet, die für Transportproteine von Maltose und Maltodextrinen codiert, besteht die Möglichkeit, dass MalM ebenfalls an der Aufnahme von Maltodextrinen beteiligt ist. Denkbar wäre eine Funktion als oligomeres Binde- und Transportprotein, z.B. zur Bereitstellung von Maltodextrinen für die periplasmatische α -Amylase MalS, die längere Maltodextrine für den Transport über MalFGK₂ spaltet. (Freundlieb *et al.*, 1988). So wie das Maltosebindeprotein MalE Substrate für den MalFGK₂-Transporter bereitstellt, könnte MalM dann eine ähnliche Funktion für die Bereitstellung von Substraten für MalS übernehmen, indem es die lokale Konzentration an Maltodextrinen in der Nähe von MalS erhöht.

Die sequenziell ähnlichste, in der PDB hinterlegte Struktur zur N-terminalen Domäne von MalM ist das α_{2u} -Globulin (A2U) aus *Rattus norvegicus* (PDB-Code 2A2U)(Chaudhuri *et al.*, 1999), dabei gibt es 12 % identische Reste über den Bereich MalM 3-169. A2U gehört zur Familie der Lipocaline die sich allgemein durch eine sehr hohe Sequenzvariabilität auszeichnen. Drei typische Sequenzmotive werden aber in fast allen Vertretern der Lipocaline gefunden (Flower, 1996; Akerstrom *et al.*, 2000). Keines dieser Motive findet man in der MalM Aminosäuresequenz. Die exakte physiologische Rolle von A2U ist nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass es am Transport von Pheromonen beteiligt ist (Cavaggioni *et al.*, 1990; Chaudhuri *et al.*, 1999). Die - wenn auch sehr niedrige - Sequenzähnlichkeit des MalM N-Terminus und A2U könnte daher ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Transportfunktion von MalM sein.

Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz des C-Terminus von MalM besteht auch mit dem Enzym IIA verschiedener PTS Transporter, u.a. EIIA des *E. coli* PTS für Chitobiose (Tang *et al.*, 2005). Auch dieser Befund ist ein Indiz für eine Transportfunktion von MalM. Es wäre daher interessant zu untersuchen, welche Moleküle von MalM gebunden werden. Falls MalM einen Liganden bindet, so wahrscheinlich mit der größeren N-terminalen Domäne, denn die C-terminale Domäne ist mit drei vorhergesagten α -Helices nicht nur sehr klein, sondern vermittelt bereits die Oligomerisierung. Eventuell könnte man auch durch Zugabe eines Liganden das MalM Oligomer stabilisieren, um die Kristallisationseigenschaften zu verbessern.

5.2.3 Hohe Löslichkeit und geringe Kristallisierbarkeit

Sowohl die N-terminale Domäne als auch das reife MalM konnten in hoher Ausbeute in *E. coli* produziert und anschließend gereinigt werden. Beide Proteine zeigten keinerlei Tendenz zur Aggregation und waren auch in Puffern mit geringer Ionenstärke über einen Zeitraum von mehreren Wochen stabil. Auch die Konzentration des Proteins auf bis zu 100 mg/ml führte nicht zur Aggregation. Im Gegenteil, bei einem großen Teil der Kristallisationsansätze mit dieser hohen Proteinkonzentration kam es nicht einmal zur Bildung von Proteinpräzipitat. Des Weiteren war es möglich die Lysine des Proteins zu methylieren, ohne dass Aggregation beobachtet wurde. In der Aminosäuresequenz des reifen MalM tritt außerdem kein einziges Cystein auf, das zu Problemen durch eventuelle Oxidation oder Ausbildung unphysiologischer Disulfidbrücken führen könnte. Diese Eigenschaften sind natürlich für die Produktion und Reinigung von Proteinen äußerst günstig, allerdings können sie sich negativ auf die Kristallbildung auswirken. Denn die zur Nukleation und zum anschließenden Kristallwachstum nötige übersättigte Lösung des Proteins ist unter diesen Umständen nur sehr schwer zu erreichen. Da es mit der nativen N-terminalen Domäne von MalM nicht zur Bildung von Proteinkristallen kam, wurden mehrere

hydrophile Aminosäuren mit einer hohen intrinsischen konformationellen Entropie (d.h. Lysine, Glutamine und Glutamate) durch Alanine oder Tyrosine, mit geringerer Flexibilität ersetzt (Mateja *et al.*, 2002; Longenecker *et al.*, 2001; Derewenda & Vekilov, 2006; Cooper *et al.*, 2007). Denn diese Entropiebarriere muss zunächst überwunden werden, wenn es zur Ausbildung von Kristallkontakten zwischen den flexiblen Resten kommen soll. Dabei reicht es allerdings häufig nicht aus lediglich einen der flexiblen Oberflächenreste auszutauschen, sondern der Austausch eines Clusters von zwei oder mehr dieser Reste scheint am effektivsten zu sein. Auch die N-terminale Domäne von MalM ist ein Beispiel dafür, dass die Reduktion der Oberflächenentropie die Kristallisation unter Bedingungen begünstigt, bei denen das native Protein nicht kristallisiert (siehe Abschnitt 4.2.4). Eine hohe Oberflächenentropie durch flexible Aminosäuren kann allerdings in der Zelle von Vorteil sein, um z.B. unerwünschte Protein-Protein-Interaktionen zu unterbinden (Doye *et al.*, 2004). In vielen Antigen-Antikörper-Interaktionen, aber auch anderen Protein-Protein-Interaktionen spielen Tyrosine eine große Rolle (Lo Conte *et al.*, 1999; Fellouse *et al.*, 2004), weshalb sich neben der Einführung von Alaninen auch Tyrosine zur Reduktion der Oberflächen-Entropie anbieten. Diese setzen zwar die Oberflächenentropie bei weitem nicht so stark herab wie Alanin, dafür stellen sie aber eine erheblich größere Fläche für die Ausbildung von Kristallkontakten bereit. Allerdings brachte der Austausch der Aminosäuren 154 bis 156 gegen Tyrosine im Bezug auf die Kristallisation der N-terminalen Domäne von MalM keinen Erfolg.

5.2.4 Zusammenhang zwischen Matthews-Koeffizient und Streuqualität der MalM Kristalle

Die Analyse des Matthews-Koeffizienten der Kristalle der N- und C-terminalen Domänen von MalM legt nahe, dass beide asymmetrischen Einheiten jeweils mindestens 12 Monomere enthalten. Dies ist vergleichsweise eine sehr große Anzahl, denn in den meisten Proteinkristall-Strukturen kommen nur eine oder zwei Proteinketten in der asymmetrischen Einheit vor (Jones & Thornton, 1996; Chruszcz *et al.*, 2008) (siehe Tabelle 14). Diese hohe Anzahl ist insbesondere für die monomere N-terminale Domäne erstaunlich. Denn die C-terminale Domäne ist wie gezeigt zur Hexamerisierung notwendig, so dass zwölf Moleküle in der asymmetrischen Einheit hier "lediglich" zwei Hexamere bedeuten würden.

Insbesondere für Raumgruppe $P6_322$, in der N-terminale Domäne von MalM kristallisierte, liegt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von mehr als 8 Proteinketten in der asymmetrischen Einheit nach Chruszcz *et al.* nur bei etwa 0,2 %. In einem solch ungewöhnlichen Fall, würde der Lösungsmittelanteil für 12 Proteinketten pro asymmetrischer Einheit bei etwa 55 % liegen. Für eine geringere Anzahl der Moleküle wäre der Lösungsmittel-Gehalt entsprechend erheblich höher.

Tabelle 14: Anzahl der Monomere pro asymmetrischer Einheit aller in der PDB hinterlegten Proteinstrukturen nach Chruszcz *et al.*, 2008.

	Alle Raumgruppen	C222 ¹ (MalM C-terminale Domäne)	P622 ¹ (MalM N-terminale Domäne)
Monomer	41,0	43,8	69,3
Dimer	34,1	32,3	22,9
Trimer	5,0	8,4	2,4
Tetramer	11,8	7,2	2,8
Pentamer	0,7	1,4	0,5
Hexamer	3,3	2,3	0,9
Heptamer	0,2	1,2	0,5
Oktamer	1,9	1,6	0,5
> Oktamer	2,0	1,8	0,2

Angegeben ist die Wahrscheinlichkeit in Prozent für das Auftreten einer bestimmten Anzahl von Proteinketten in der asymmetrischen Einheit in Abhängigkeit der Raumgruppe.

¹ Aufgrund der wenigen Reflexe für die Datensätze der N- und C-terminalen Domänen von MalM konnte nicht festgestellt werden, ob eine Schraubenachse vorliegt und wenn ja welche. Daher wurden die Werte für die Raumgruppen C222 und C2221 bzw. P622, P6122, P6222, P6322, P6422 und P6522 gemittelt.

Somit lässt sich für beide Proteinkristalle festhalten, dass sie mit großer Wahrscheinlichkeit einen hohen Lösungsmittelanteil aufweisen. Die Streuqualität eines Proteinkristalls hängt jedoch neben dem Lösungsmittelgehalt hauptsächlich von seiner Ordnung ab. Um zukünftig eine bessere Auflösung zu erreichen, müssen also entweder bestehende Kristallkontakte verbessert oder eine alternative Packung erreicht werden. Ein erster Ansatz dazu war der Versuch, die Aminosäuren 154 bis 156 in der N-terminalen Domäne von MalM nicht durch Alanine, sondern durch Tyrosine zu ersetzen. Allerdings kam es mit diesen Mutationen zu keiner Kristallbildung. Möglicherweise könnte der Austausch der Lysine 206, 208 und 210 durch Alanine oder Tyrosine verbesserte Kristallkontakte bewirken. Denn diese Aminosäuren befinden sich laut Sekundärstrukturvorhersage auf der gleichen Seite eines β -Stranges. Aufgrund ihrer Hydrophilie befindet sich diese Seite des β -Strangs vermutlich auf der Proteinoberfläche (Abbildung 28). Dagegen sind die benachbarten Aminosäuren 205, 207 und 209 mit Leucinen und Valin ausschließlich hydrophob und zeigen vermutlich ins Innere des Proteins. In jedem Fall kann aber festgestellt werden, dass die asymmetrische Einheit mit Achsenlängen von 221, 221 und 204 Å sehr groß ist. Bei einer solch großen asymmetrischen Einheit mit einer Achsenlänge von etwa 200 Å gibt dementsprechend bei einem Proteinkristall mit einer durchschnittlichen Kantenlänge von 40 μm deshalb auch nur etwa 2000 Ebenen im Kristall, die für die Röntgenbeugung zur Verfügung stehen. Das geringe Volumen des Proteinkristalls kann allerdings nicht der einzige Grund für die schwache Beugung sein. Ein abruptes Abbrechen der Streuung (Abbildung 34) bzw. das Fehlen von Reflexen bei höherer Auflösung unter Verwendung größerer Strahlungsintensität

deutet häufig auf erhebliche Unordnung im Kristall hin. Das Hauptproblem für die schwache Röntgenbeugung stellt somit vermutlich der hohe Lösungsmittelgehalt dar, der zumeist mit geringerer Streuqualität korreliert (Kantardjieff & Rupp, 2003).

5.3 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von MalQ

5.3.1 Vergleich der MalQ Struktur mit der anderer Glycosid-Hydrolasen

Eine Suche nach MalQ verwandten Strukturen mit Hilfe des DALI Servers (Holm & Rosenström, 2010) ergab zunächst vier Treffer für Amylomaltasen aus thermophilen Gram-negativen Bakterien: *Thermus aquaticus* (PDB-Codes 1ESW, 1CWY) (Przylas *et al.*, 2000b; Przylas *et al.*, 2000a), *Thermus brockianus* (PDB-Code 2X1I) (Jung *et al.*, 2011), *Thermus thermophilis* (PDB-Codes 2OWC, 2OWW, 2OWX) (Barends *et al.*, 2007) und *Aquifex aeolicus* (PDB-Code 1TZ7) (Barends, noch nicht veröffentlicht). Diese Strukturen sind mit nur etwa 500 Aminosäuren deutlich kleiner. In diesem Bereich finden sich etwa 24 % identische Reste, die RMSD Werte zwischen 2,2 und 2,5 Å zu MalQ aufweisen. Ebenfalls ähnlich ist die Struktur des disproportionierenden Enzyms (D-Enzym) aus der Kartoffel (PDB-Code 1X1N) (Inamura, noch nicht veröffentlicht), mit 21 % identischen Aminosäuren. Weitere strukturell verwandte Enzyme, die im Gegensatz zu MalQ der Glycosid-Hydrolase Familie 13 angehören, zeigen mit weniger als 15 % identischen Resten eine deutlich geringere Sequenzidentität.

Das mesophile MalQ ist somit deutlich größer als seine thermophilen Homologen. Am auffälligsten ist die N-terminale Erweiterung von MalQ um 138 Aminosäuren, die den *Thermus* Enzymen fehlt. Davon bilden die ersten 128 Aminosäuren Domäne N und die folgenden 10 sind Teil der Domäne A, wo sie sich an das zentrale TIM-Barrel anlagern. Die ersten strukturell vergleichbaren Aminosäuren in Domäne A sind Lys142 bei MalQ sowie Arg5 bei *Thermus aquaticus*. Zusätzlich enthält Domäne A aus MalQ noch kleinere Insertionen, die man in den *Thermus* Strukturen nicht findet. Sowohl in MalQ als auch bei den *Thermus* Enzymen fehlt α -Helix A α 6 des TIM-Barrels. Diese ist durch einen Loop zwischen A β 6 und A β 7 ersetzt, der in MalQ im Vergleich zu *Thermus aquaticus* um 3 Reste länger ist und deshalb eine kurze 3_{10} -Helix-Konformation einnehmen kann. Die größten strukturellen Unterschiede treten jedoch in Domäne B auf. So sind die Subdomänen B1 und B3 in MalQ um 20 bzw. 37 Aminosäuren größer als bei *Thermus aquaticus*. Im Gegensatz dazu ist Subdomäne B2 in *E. coli* MalQ um 7 Aminosäuren kürzer, 6 Reste fehlen in einem Loop von B2a und ein Rest in einem Loop in B2b. Diese Loops interagieren sowohl miteinander als auch mit der N-terminalen Subdomäne N1. Allerdings befinden sie sich auf

der Proteinoberfläche und sind somit nicht an der Ligandenbindung im aktiven Zentrum beteiligt.

Den funktionellen Kern der Glycosid-Hydrolase Familien 13, 70 und 77 bildet ihr $(\beta\alpha)_8$ -TIM-Barrel (MacGregor *et al.*, 2001). Sequenz- und Strukturvergleiche verschiedener GH-Familien zeigen, dass verschiedene zusätzliche Proteindomänen auftreten können (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993; Davies & Henrissat, 1995; Henrissat & Bairoch, 1996; Janecek *et al.*, 1997). Am häufigsten findet man eine β -Sandwich Domäne am C-Terminus (MacGregor *et al.*, 2001). Allerdings zeigt keine dieser Domänen ausreichende strukturelle Ähnlichkeit zur N-terminalen Subdomäne N2, um durch DALI identifiziert werden zu können. Dennoch zeigt dieses β -Sandwich von MalQ N2 Ähnlichkeit zu β -Sandwich Domänen anderer Glycosidhydrolasen. In den meisten Fällen befindet sich diese Domänen am C-Terminus der Enzyme, kann aber auch in ihre Anordnung relativ zum katalytischen Kern variieren (MacGregor *et al.*, 2001). Die Funktion dieser Domänen ist noch nicht bekannt, es wird aber angenommen, dass sie entweder die Affinität des Enzyms für das Substrat erhöhen, katalytische Reste vom umgebenden Lösungsmittel abschirmen oder allgemein für eine Stabilisierung der Enzyme sorgen (MacGregor *et al.*, 2001; Dauter *et al.*, 1999; Lawson *et al.*, 1994).

5.3.2 Funktionelle Ähnlichkeit von MalQ und pflanzlichem DPE2

Interessanterweise kann das bakterielle MalQ aus *E. coli* die Funktion von pflanzlichem DPE2 in *Arabidopsis thaliana* soweit kompensieren, dass letale DPE2-Deletions-Mutanten der Ackerschmalwand wieder in der Lage sind zu wachsen (Ruzanski *et al.*, 2013). Bei DPE2 handelt es sich um ein Multidomänen-Protein, das wie *E. coli* MalQ 4-Glucanotransferase Aktivität aufweist. Allerdings sind im Unterschied zur Amylomaltasereaktion Heteroglycane statt Maltodextrinen die Akzeptormoleküle. DPE2 garantiert ein konstantes cytosolisches Hexosephosphatlevel für die Produktion des Transportsaccharids Saccharose während der Nacht. Zu diesem Zweck wird nachts in den Chloroplasten Stärke zu Maltose gespalten und ins Cytosol transportiert. Dort wird sie durch DPE2 in Heteroglycane eingebaut, aus denen durch die Phosphorylase PHS2 Glucose-1-Phosphat freigesetzt wird. Dieser Stoffwechselweg ähnelt insgesamt stark dem Maltose-System in *E. coli*, da auch hier aus cytosolischer Maltose zuerst unter Glucosefreisetzung ein Polymer gebildet wird, bevor die phosphorolytische Spaltung erfolgt. Wie auch für das Maltose-System in *E. coli* ist unklar, warum *Arabidopsis* diesen Umweg über den Aufbau eines Heteroglycans geht, bevor Glucose freigesetzt wird. Möglicherweise ist dieser komplizierte Abbauweg von Vorteil, um eine konstante Versorgung mit Kohlenhydraten während der Nacht zu gewährleisten (Ruzanski *et al.*, 2013). Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit wäre ein struktureller Vergleich der beiden Enzyme interessant, allerdings gibt es von DPE2 aus *Arabidopsis* oder

einer anderen Pflanze noch keine dreidimensionale Struktur. Eine Sequenzanalyse von DPE2 zeigt aber, dass es am N-Terminus zwei CBM20 (*carbohydrate binding module*) Domänen gibt, auf die ein Coiled-Coil-Motiv folgt. DPE2 besitzt die für Enzyme der GH77 Familie typische katalytische Domäne, die eine etwa 170 Aminosäuren lange Insertion aufweist (Aminosäuren 604 bis 745), die sich vermutlich zwischen α -Helix 4 und β -Strang 5 des zentralen TIM-Barrels befindet (Steichen *et al.*, 2008). Entfernt man die CBM20-Domänen von DPE2, erhöht sich die Aktivität gegenüber Maltose und kürzeren Maltodextrinen (bis zu Maltoheptaose), allerdings ist im Gegenzug die Aktivität für Stärke deutlich herabgesetzt. Möglicherweise kommt es durch die CBM20 Domänen zur sterischen Beeinflussung der Substratbindestellen jenseits der Subsite -1 (Steichen *et al.*, 2008). Auch für andere CBM-Domänen wird angenommen, dass sie die Affinität für langkettige Zucker erhöhen (Bolam *et al.*, 1998; Charnock *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2001; Zverlov *et al.*, 2001; Boraston *et al.*, 2003). Es wäre daher interessant ein MalQ-Konstrukt ohne N2 zu produzieren und dessen Affinität zu Maltodextrinen verschiedener Länge im Vergleich zum nativen MalQ zu untersuchen. Um einen Einfluss der CBM20-Domäne auf MalQ zu überprüfen, konstruierten Ruzanski *et al.* ein Fusionsprotein aus beiden N-terminalen CBM20-Domänen von DPE2 mit Vollängen MalQ (DPE2₁₋₂₈₃-MalQ₁₋₆₉₄). Dieses Fusionsprotein zeigt im Vergleich zum nativen MalQ auch wie erwartet eine erhöhte Affinität gegenüber Stärke, jedoch bleibt das Substratspektrum unverändert (Ruzanski *et al.*, 2013). Es ist bekannt, dass das Vorkommen von zwei CBM-Domänen in direkter Nachbarschaft, im Vergleich zu nur einer CBM-Domäne, häufig eine deutlich erhöhte Affinität zu längererkettigen Glycanen bewirkt. Dabei wird vermutet, dass es durch die simultane Interaktion der beiden CBM-Domänen mit dem Substrat zu einem Aviditätseffekt kommt (Bolam *et al.*, 2001; McLean *et al.*, 2002; Boraston *et al.*, 2003). Inwieweit dieses chimäre MalQ Fusionsprotein allerdings geeignet ist, um eine CBM-Funktion von MalQ N2 zu zeigen ist fraglich, denn wie beschrieben sollte alleine der Aviditätseffekt durch zwei zusätzliche CBM-Domänen eine erhöhte Affinität zu längeren Maltodextrinen bewirken. Für eine bessere Untersuchung des Effekts von N2 auf MalQ sollte vielmehr ein MalQ- Δ N2 Konstrukt produziert werden und mit Vollängen MalQ in Bezug auf die Präferenz für verschiedene Substratkettelängen verglichen werden.

5.3.3 Struktureller Vergleich von MalQ N2 mit CBM20

Falls MalQ N2 an der Bindung längerer Maltodextrine, analog zu CBM20 in DPE2, beteiligt sein sollte, besteht die Möglichkeit, dass es strukturelle Gemeinsamkeiten beider Module gibt. Leider ist die Struktur von DPE2-CBM20 noch nicht bekannt. Auch ein Sequenzvergleich bringt hier keine Klarheit über die strukturelle Ähnlichkeit, da die Sequenzen N2 und CBM20 nur 7 % identische Reste aufweisen. Obwohl die CBM20 von

DPE2 in einer Sekundärstrukturvorhersage mit XtalPred (Slabinski *et al.*, 2007b) ebenfalls ein β -Sandwich bildet, ist nicht klar, ob beide Domänen auch topologisch verwandt sind. Um dies zu überprüfen, wird ein Strukturmodell der DPE2 CBM20 benötigt. Die ähnlichste bekannte Struktur einer CBM20 Domäne ist die SBD (*granular starch binding domain*) der Glucoamylase aus *Aspergillus niger* (PDB-Code 1AC0 (Sorimachi *et al.*, 1997)).

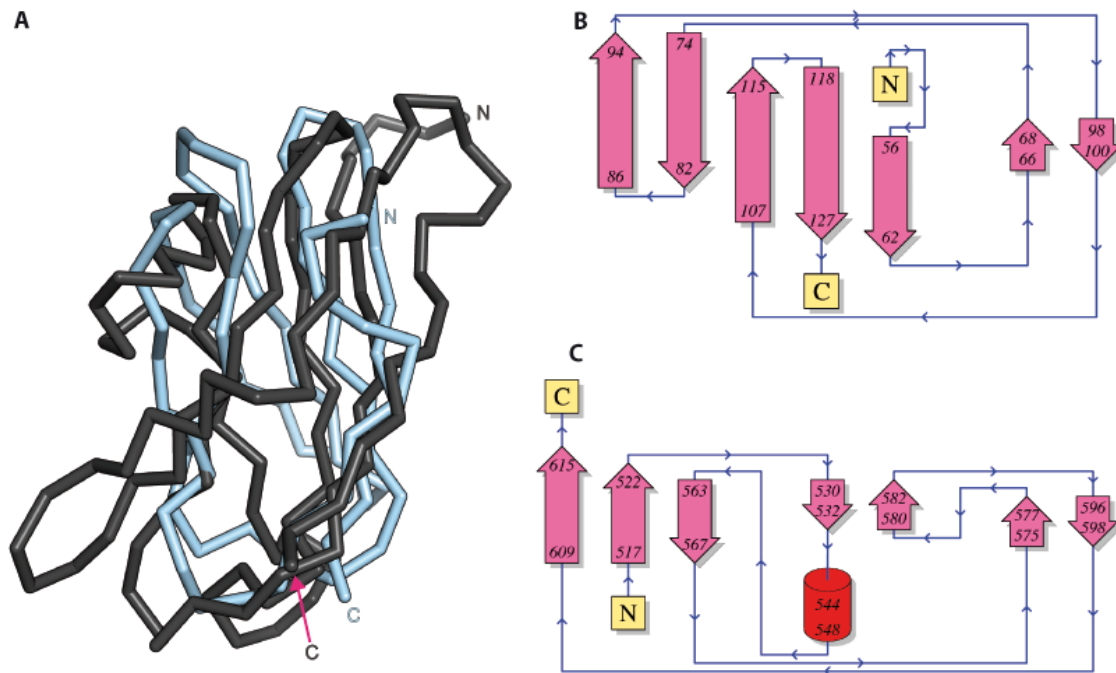


Abbildung 58: Vergleich von MalQ N2 und CBM20. (A) Überlagerung der SBD der Glucoamylase aus *A. niger* (dunkelgrau) auf die N2 Domäne von MalQ (hellblau) durch den SAlign-Server (Braberg *et al.*, 2012). (B) Topologie-Diagramm von MalQ N2. (C) Topologie-Diagramm der SBD. Die Topologie-Diagramme wurden mithilfe des PDBSum-Servers erstellt (Laskowski *et al.*, 1997).

Wie auch bei DPE2 führt die Deletion dieser SDB zu einer verminderten Umsetzung von Stärke durch die Glucoamylase aus *A. niger*, ohne die Aktivität des Enzyms für kürzere Substrate zu senken. Die Sequenz dieser Domäne weist zur ersten CBM20 Domäne von DPE2 eine Identität von 25 % über 107 Aminosäuren auf. Eine Überlagerung der SBD der Glucoamylase aus *A. niger* auf die N2 Domäne von MalQ aus *E. coli* zeigt trotz der jeweiligen β -Sandwichfaltung nur eine sehr geringe Ähnlichkeit der beiden Strukturen (siehe Abbildung 58 A). Diese CBM20 Domäne ist auch topologisch völlig verschieden zu MalQ N2 (siehe Abbildung 58 B und C), weshalb sie auch bei der Struktursuche mit dem DALI-Server nicht gefunden wurde. Die RMSD zwischen 41 C α -Atomen beträgt etwa 3,0 Å und ein strukturbasiertes Sequenzalignment ergibt nur 5 äquivalente Aminosäuren.

Generell scheinen SBDs bei Hydrolasen sehr spezifisch bestimmte Zucker zu binden, um so die effektive Substratkonzentration am aktiven Zentrum zu erhöhen (Takahashi *et al.*, 1985).

Ein ähnlicher Effekt wäre auch für MalQ N2 denkbar, konnte aber bisher nicht gezeigt werden. Um diese Hypothese zu testen, müsste man *malQ*⁻ *E. coli* Stämme mit einem Plasmid, das für MalQ-ΔN2 codiert, transformieren und ihr Wachstum auf Maltose- bzw. Maltodextrin-haltigen Medium im Vergleich zu *malQ*⁻ *E. coli* und Wildtyp *E. coli* Stämmen untersuchen. Stämme mit MalQ-ΔN2 Plasmiden sollten im Gegensatz zu den nicht transformierten MalQ⁻ Stämmen auf diesen Medien wachsen, aber deutlich langsamer als der native *E. coli* Stamm. Außerdem sollte sich bei ihnen eine erhöhte Konzentration an Maltodextrinen im Cytosol ansammeln, da diese nur noch langsamer vom verkürzten MalQ umgesetzt werden könnten.

5.3.4 Struktureller Vergleich von MalQ N2 mit anderen CBMs

Carbohydrate-binding modules (CBMs) sind nicht-katalytische Protein-Domänen, die in kohlenhydratverarbeitenden Enzyme auftreten. Insgesamt sind heute 71 Familien von CBM-Domänen bekannt und in der CAZy Datenbank (<http://www.caz.org>) hinterlegt (Cantarel *et al.*, 2009; Lombard *et al.*, 2014). Die Einteilung dieser Familien erfolgte zunächst aufgrund der Aminosäuresequenz. Seit 2015 werden auch strukturelle Gemeinsamkeiten berücksichtigt, da selbst stark unterschiedliche Primärsequenzen eine ähnliche 3D Struktur einnehmen können (Carvalho *et al.*, 2015). Auf der Basis struktureller Vergleiche wurden die ursprünglichen CBM Familien daraufhin in 9 Stämme (CBM-A bis CBM-I) eingeteilt. Von den ursprünglich definierten 71 CBM-Familien konnten bisher 53 strukturell aufgeklärt werden. Von diesen Familien weisen 42 eine β -Sandwicharchitektur auf. Alle CBMs, die α -verknüpfte Zucker binden, gehören zu den Stämmen CBM-A bis CBM-C. Demnach wäre zu vermuten, dass MalQ N2 einem dieser Stämme angehören müsste. Alle anderen bisher bekannten bakteriellen CBMs gehören dem Stamm CBM-C an. Die Topologie von MalQ N2 stimmt allerdings mit keiner der bekannten CBM-Familien gut überein. Am ehesten ähnelt die Topologie noch der CBM26 Familie, die zum CBM-C-Stamm gezählt wird (Abbildung 59). Doch die RMSD zwischen MalQ N2 und der CBM26 beträgt über 54 C α -Atome lediglich 2,6 Å und ist somit deutlich zu hoch, um in diese CBM-Familie eingeordnet zu werden (Carvalho *et al.*, 2015). Auch das strukturbasierte Sequenzalignment ergibt auch nur 2 identische Aminosäuren. Außerdem ist MalQ N2 aufgrund eines im Vergleich zur CBM26 Domäne fehlenden β -Stranges deutlich kleiner als diese.

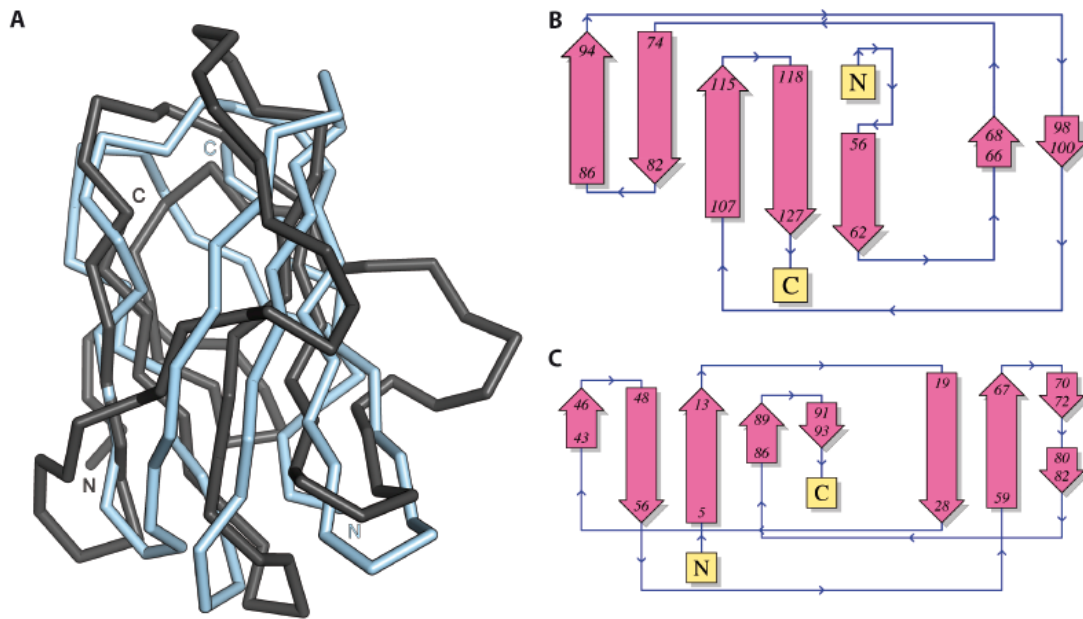


Abbildung 59: Vergleich von MalQ N2 und CBM26. (A) Überlagerung der CBM26 (dunkelgrau) (Amylase aus *Bacillus halodurans*; 2C3G (Boraston *et al.*, 2006)) auf MalQ N2 (hellblau) durch den SAlign-Server (Braberg *et al.*, 2012). (B) Topologie-Diagramm von MalQ N2. (C) Topologie-Diagramm von CBM26. Die Topologie-Diagramme wurden mithilfe des PDBSum-Servers erstellt (Laskowski *et al.*, 1997).

Bei der Bindung der CBM26-Domäne der Amylase aus *Bacillus halodurans* an Maltose spielen vor allem zwei Tyrosine (Tyr23 und Tyr25) und ein Tryptophan (Trp36) eine wichtige Rolle. Diese bilden einen apolaren Bereich auf der Oberfläche (Abbildung 60D), der aufgrund seiner Krümmung eine gute Anlagerung von Maltooligosacchariden erlaubt (Boraston *et al.*, 2006). Solche schwachen intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den C-H der Zucker und den π -Elektronen der aromatischen Seitenketten können einen energetischen Beitrag von bis zu 2,5 kcal/mol zur Ligandenbindung beitragen (Meyer *et al.*, 2003). Die Region von MalQ N2, die bei einer Überlagerung der beiden Strukturen der Zuckerbindestelle der CBM26-Domäne entspricht, enthält allerdings keine aromatischen Aminosäuren (Abbildung 60B). Inwieweit diese Überlagerung aufgrund der geringen Ähnlichkeit aussagekräftig ist, bleibt sehr fraglich. Auf der Oberfläche von MalQ N2 befinden sich sieben aromatische Reste, von denen Trp78, Tyr88, His91 und Phe98 ein Cluster formen (Abbildung 60A).

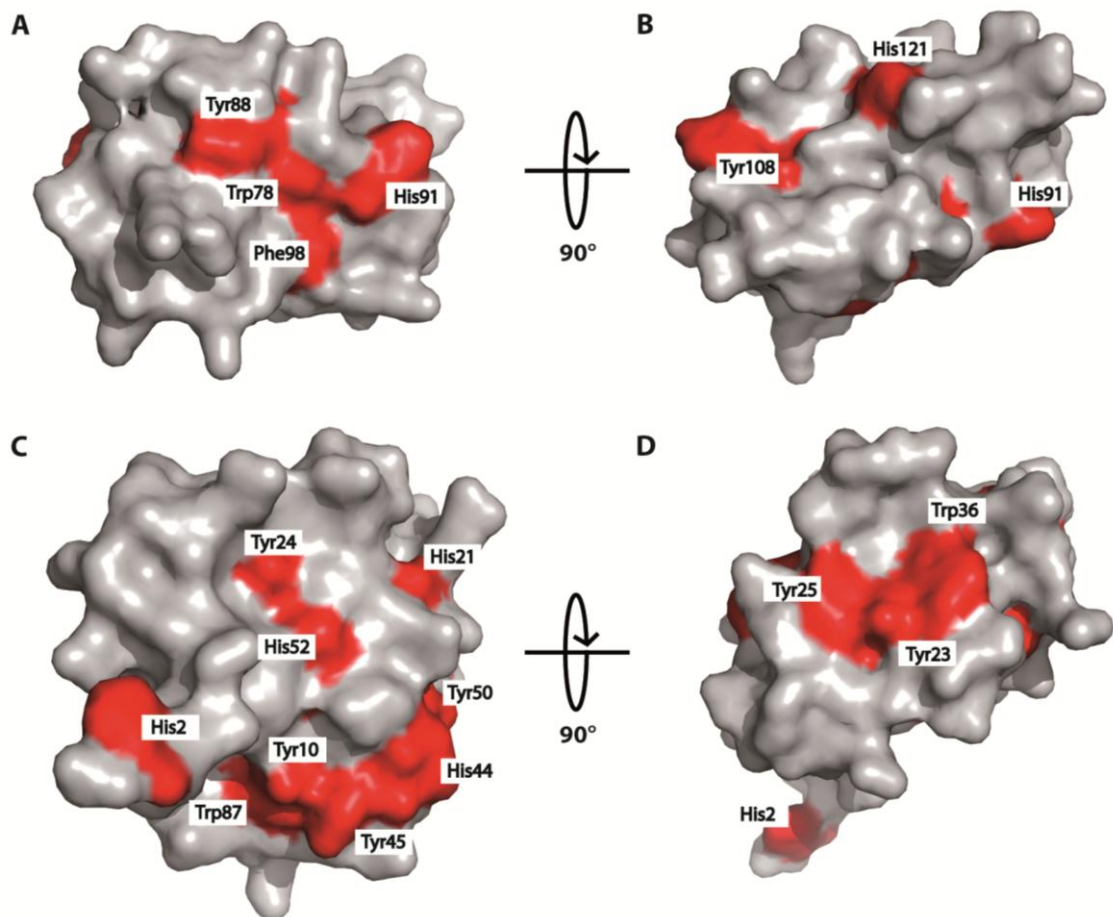


Abbildung 60: Oberflächenvergleich von MalQ N2 und CBM26. (A) und (B) Oberflächendarstellung von MalQ N2. (C) und (D) Oberflächendarstellung von CBM26. Ansichten A und C bzw. B und D sind jeweils aus der selben Blickrichtung auf eine Überlagerung durch den SAlign-Server (Braberg *et al.*, 2012) abgebildet. Alle aromatischen Aminosäuren sind rot hervorgehoben.

Die strukturell ähnlichste Domäne, die zu MalQ N2 gefunden werden konnte, ist eine Ig-artige Fibronectin Typ III (FnIII) Domäne (Vgl. Abbildung 46). Der einzige Unterschied in der Topologie besteht in Umlagerung eines β -Strangs zwischen den beiden β -Faltblättern. Nimmt man diese Umlagerung vor, so ist die Topologie von MalQ N2 auch mit der des β -1,3-Glucanbindenden Proteins (CBM39) aus *Plodia interpunctella* vergleichbar (PDB-Code 3AQZ) (Kanagawa *et al.*, 2011) (Abbildung 61). Allerdings ist auch hier ist die Anzahl identischer Aminosäuren im strukturbasierten Sequenzalignment von nur sieben sehr gering. Zudem beträgt die RMSD zwischen den 68 überlagerten $C\alpha$ -Atomen lediglich 2,8 Å.

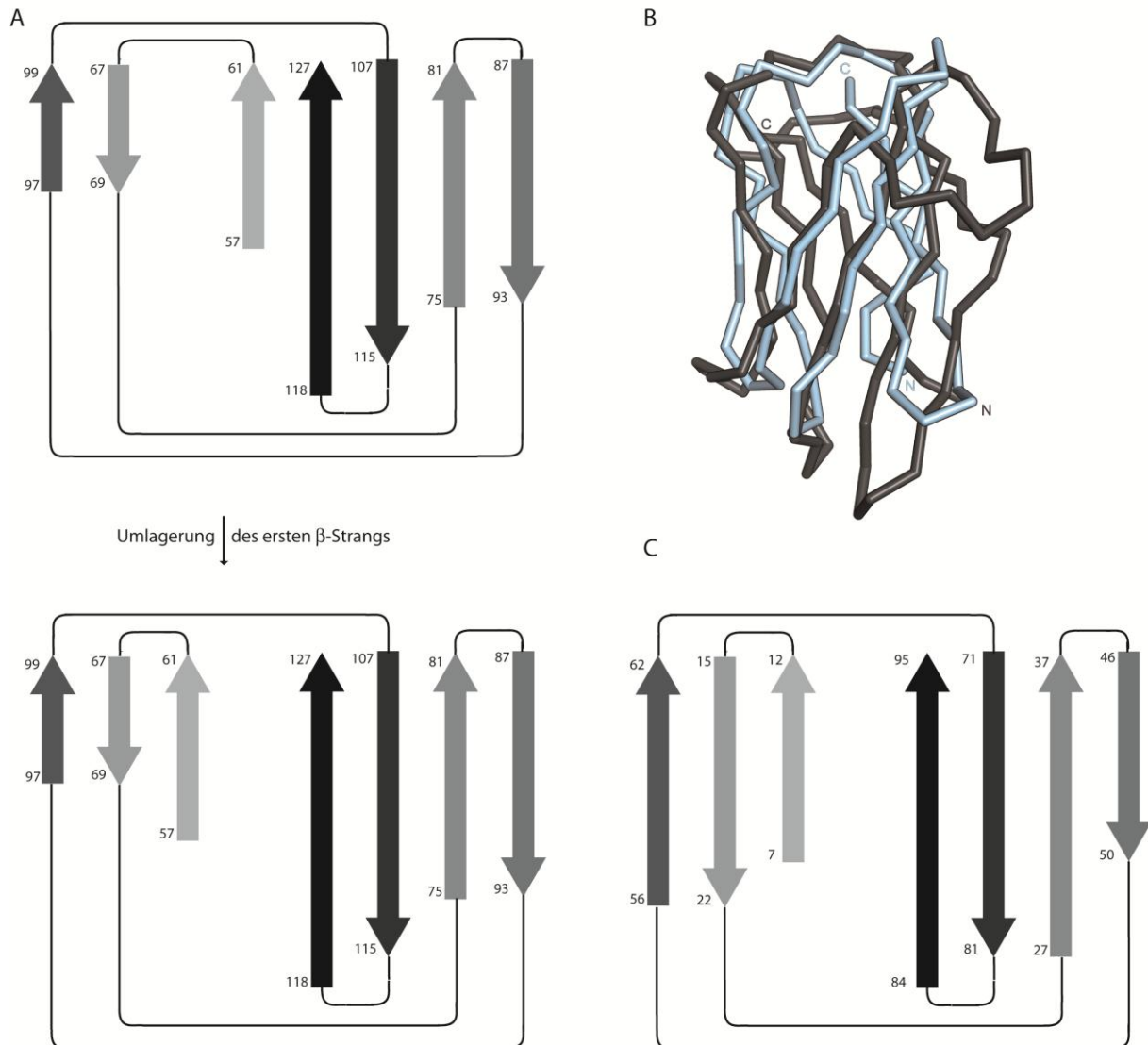


Abbildung 61: Vergleich von MalQ N2 und CBM39. (A) Strukturelles Alignment von CBM39 (dunkelgrau) des β -1,3-Glucan-bindenden Proteins aus *Plodia interpunctella* (3AQZ; (Kanagawa *et al.*, 2011)) und MalQ N2 (hellblau) durch den SAlign-Server (Braberg *et al.*, 2012). (B) Topologie-Diagramm von MalQ N2. (C) Topologie-Diagramm der CBM39, berechnet durch den PDBSum-Server (Laskowski *et al.*, 1997).

CBM39 Domänen binden Zucker ebenfalls über mehrere aromatische Aminosäuren auf ihrer Oberfläche. Im Fall des β -1,3-Glucan-bindenden Proteins aus *Plodia interpunctella* befinden sich diese in den β -Strängen 3, 4 und 6. Jedoch gibt es keinen vergleichbaren Bereich aromatischer Aminosäuren auf der MalQ N2 Oberfläche und MalQ sollte zudem an α -1,4- und nicht an β -1,3-verknüpfte Zucker binden. Außerdem gibt es in der CBM39 Struktur eine Insertion von 8 Aminosäuren zwischen den β -Strängen 3 und 4, die sich in der Nähe der Zuckerbindestelle befindet und die bei MalQ N2 fehlt. So kann nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob die topologische Ähnlichkeit zwischen MalQ N2 und CBM39 zufällig ist, oder ob die Domänen einen gemeinsamen Ursprung haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher noch keine CBM-Struktur mit identischer Topologie zu MalQ N2 bekannt ist. Daher könnte MalQ N2 zu einer der strukturell noch nicht charakterisierten Unterfamilien von CBMs gehören. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass MalQ N2 überhaupt keine zuckerbindende Funktion hat.

Eine Blast-Suche mit der Aminosäuresequenz der N-terminalen Domäne von MalQ ergab, dass diese fast ausschließlich in Amylomaltasen von Enterobakterien vorkommt. In vielen anderen γ -Proteobakterien, oder noch weniger mit *E. coli* verwandten Bakterien, fehlt eine N-terminale Domäne entweder ganz, oder sie unterscheidet sich sequenziell sehr stark. Interessanterweise besitzt die Amylomaltase von *Rhizobium leguminosarum* (UniProt-ID: W0NFB8) eine N-terminale Domäne die MalQ N1 entspricht, während N2 nicht vorhanden ist. Ein Vergleich der Aktivitäten beider Amylomaltasen, insbesondere im Hinblick auf deren Umsatzrate von längeren Maltodextrinen wäre sehr interessant. Sollte MalQ aus *E. coli* längere Maltodextrine besser umsetzen als die Amylomaltase *R. leguminosarum*, könnte dies ein Hinweis auf eine zuckerbindende Funktion von MalQ N2 sein. Es ist auch denkbar, dass Enterobakterien eine FnIII Domäne von ihrem Wirt übernommen haben und sich diese in Form eine Platzhalters zwischen den Domänen N1 und A etabliert hat.

5.3.5 Maltose als Substrat von MalQ

Aus früheren Versuchen ist bekannt, dass die Amylomaltase-Reaktion von MalQ nur stattfinden kann, wenn Spuren von Maltotriose oder längeren Maltodextrinen als Reaktionsprimer vorhanden sind. Bei reiner Maltose tritt hingegen eine Lag-Phase auf, bis sich Spuren von Maltotriose gebildet haben (Palmer *et al.*, 1976). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die MalQ-Reaktion mit Maltose und Maltotriose als Substrat selbst zu Reaktionsbeginn in einer vergleichbaren Geschwindigkeit abläuft. In keinem Fall konnte eine Lag-Phase bzw. veränderte Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden (Abbildung 53). Dies könnte drei mögliche Ursachen haben: 1.) Ein Reaktionsprimer liegt bereits zu Reaktionsbeginn an das Enzym gebunden vor, 2.) Die Maltoseprobe, die zur Durchführung der Experimente verwendet wurde, enthält bereits ausreichende Spuren an Maltotriose oder 3.) Die ursprüngliche Vermutung, dass Maltotriose als Reaktionsstarter benötigt wird, trifft nicht zu. Sollte Maltotriose oder ein anderes Maltodextrin mit einer so hohen Affinität an die Amylomaltase binden, dass dieses Substrat bereits zu Reaktionsbeginn als Reaktionsprimer an das Enzym gebunden vorliegt, müsste dieser Reaktionsprimer auch in der Elektronendichtekarte der apo-Struktur zu beobachten sein. Denn sowohl zur Kristallisation der MalQ-apo als auch der MalQ•Maltose Struktur wurde die gleiche Proteinpräparation verwendet. Man muss jedoch mit solch einer verallgemeinernden Aussage vorsichtig sein, insbesondere bei sehr geringer Ligandenkonzentration während der Kristallisation. In solchen Fällen würde MalQ zum größten Teil in der offenen Apo-Form vorliegen und auch in

dieser Form kristallisieren. Durch die geringe Konzentration und niedrige Affinität für die Apo-Form wäre Maltotriose folglich vermutlich in der Elektronendichte nicht sichtbar. Aber auch in der mit Maltotriose co-kristallisierten Struktur konnte keine Elektronendichte für Maltotriose oder ein längeres Maltodextrin beobachtet werden. In diesen Ansätzen sollte sich während des Kristallisationsexperimentes durch die ablaufende Amylomaltasereaktion ein Gleichgewicht aus verschiedenen langen Maltodextrinen eingestellt haben. Zumindest für diese längeren Maltodextrine sollte dann auch Elektronendichte zu erkennen sein, wenn deren Affinität für eine Co-Reinigung mit MalQ ausreichend wäre. Da selbst das nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass zu Beginn des enzymatischen Assays kein Maltodextrin als Reaktionsprimer an das MalQ-Enzym gebunden vorlag. Somit bleiben nur die zweite und dritte Erklärung für das Ausbleiben der Lag-Phase. Für Erklärung 2 würde der Reinheitsgrad der verwendeten Maltose (AppliChem, Darmstadt, Reinheitsgrad >98 %) sprechen, die durchaus Spuren von Maltotriose oder längeren Maltodextrinen enthalten könnte. Auf der anderen Seite wurde auch von anderen Experimentatoren keine Lag-Phase für die MalQ-Reaktion mit Maltose als Substrat beobachtet (Dippel & Boos, 2005; Lengsfeld *et al.*, 2009), was eher dafür spricht, dass tatsächlich keine Lag-Phase auftritt.

5.3.6 MalQ Konformationen und der katalytische Zyklus von Amylomaltasen

Die Amylomaltase aus *T. aquaticus* (TaAM) mit gebundener Acarbose in Subsites -3 bis +1 (PDB-Code 1ESW) (Przylas *et al.*, 2000a), ist dem MalQ•Maltose Komplex mit einer RMSD von 2,2 Å über 475 C α -Atome sehr ähnlich. Größere strukturelle Unterschiede treten nur in den Loops nach den β -Strängen A β 5 und A β 6 sowie im 400s Loop von MalQ (bzw. 250s Loop von TaAM) auf. Beide Strukturen TaAM•Acarbose und MalQ•Maltose repräsentieren die entsprechende Amylomaltase vor bzw. nach einem Reaktionszyklus (Positionen 1 und 6 in Abbildung 56). Diese Beobachtung deckt sich mit der Vermutung, dass TaAM in einer nicht-katalytischen Konformation kristallisiert wurde (Barends *et al.*, 2007).

Im Gegensatz dazu sind die Komplexe der Amylomaltase aus *T. thermophilus* (TtAM) mit Acarviosin-Glucose (TtAM•AG) und AG sowie 4-Deoxyglucose (TtAM•AG•4G) (2OWC und 2OWW) (Barends *et al.*, 2007) dem MalQ•AGA Komplex am ähnlichsten und weisen RMSD Werte von 2,2 Å über 474 C α -Atome auf. Die Unterschiede in Subsite -1 zwischen MalQ•AGA und TtAM•AG•4G rühren wahrscheinlich daher, dass es sich hier um zwei verschiedene Schritte des katalytischen Zyklus handelt, MalQ•AGA entspricht dem Übergangszustand (Schritte 2 und 5 in Abbildung 56) und TtAM•AG•4G dem kovalenten Intermediat (Schritte 3 und 4 in Abbildung 56). Unterschiede in Subsite +1 scheinen dagegen durch eine fehlende 4-OH-Gruppe verursacht zu werden, ohne die keine Interaktion mit dem katalytischen Glu496 (Glu340) möglich ist. D.h. ohne 4-OH-Gruppe in Subsite +1 liegt Glu496 (Glu340) in einer unproduktiven Konformation vor. Obwohl der 400s (250s) Loop in

der MalQ•AGA Struktur Subsite +3 augenscheinlich kleiner ist, ist es möglich diese Bindestelle zu besetzen. Die Seitenkette Leu406 in MalQ•AGA ist im Gegensatz zu Phe251 in TtAM•AG•4G anders orientiert. Außerdem nimmt der Loop A β 5 α 5 eine andere Konformation ein. Die Umlagerung des A β 5 α 5 Loops scheint nur möglich, wenn Glu496 in seiner katalytisch aktiven Orientierung vorliegt. Hierdurch ist der Amidstickstoff von Leu498 nicht länger an einer Wasserstoffbrücke mit Glu496 beteiligt.

Mit dem verwendeten enzymatischen Assay konnte gezeigt werden, dass es weder für die Amylomaltasereaktion mit Maltose noch mit Maltotriose oder einer Kombination aus Glucose, Maltose und Maltotriose als Substrat bei einer Inkubation über Nacht zu Hydrolyse kommt. Dies bedeutet entweder, dass Wassermoleküle bei Substratbindung aus dem aktiven Zentrum ausgeschlossen werden oder sie nicht durch das Enzym deprotoniert und somit aktiviert werden können. Es wurde vermutet, dass die beschriebene katalytisch inkompetente Position von Glu340 (Glu496 bei MalQ) für diesen Effekt verantwortlich ist (Barends *et al.*, 2007). Die MalQ•AGA Struktur, in der dieser Rest erstmals in einer katalytisch produktiven Orientierung beobachtet werden konnte, bestätigt diese Vermutung. Dagegen zeigen alle Strukturen mit unbesetzter Subsite +1 die katalytisch inaktive Orientierung des Säure/Base Katalysators. Für die Reorientierung von Glu496 bei Substratbindung muss die Wasserstoffbrücke zu Leu498 aufgebrochen werden. Dies ist vermutlich nur möglich, wenn es zur Ausbildung alternativer Wasserstoffbrücken mit dem Akzeptormolekül in Subsite +1 (und eventuell +2) kommt. Die gute Übereinstimmung der inkompetenten Orientierung dieses Glutamatrestes in allen Amylomaltase-Strukturen, ohne geeignetes Akzeptormolekül in Subsite +1, ist daher vermutlich auch der entscheidende Faktor für das Ausbleiben von Hydrolyse bei MalQ und Amylomaltasen im Allgemeinen. Zusätzlich stellt die in dieser Arbeit beschriebene MalQ•AGA Struktur einen bislang unbeobachteten Zwischenschritt des katalytischen Zyklus von Amylomaltasen dar (Abbildung 56).

Eine weitere interessante Beobachtung ist die Tatsache, dass die in Subsite +1 gebundene Glucoseeinheit in TaAM•Acarbose im Gegensatz zur entsprechenden Glucoseeinheit in der TtAM•AG•4G Struktur (Przylas *et al.*, 2000a) um etwa 20° entlang der Zuckerringebene gedreht vorliegt (Barends *et al.*, 2007). Da sowohl MalQ•Maltose als auch TtAM•AG•4G Struktur derselben Reaktionsphase entsprechen, müsste die Orientierung des Zuckers in der Subsite +1 identisch sein. Leider ist diese Subsite in der MalQ•Maltose Struktur nicht besetzt. Barends *et al.* begründen die Rotation des Zuckers in Subsite +1 im TtAM•AG•4G Komplex mit einem sterischen Konflikt zwischen der Esterbindung des kovalenten Intermediats mit Asp293 und der 3'-Hydroxygruppe des Zuckers. Da der MalQ•AGA Komplex nicht nur die gleiche Zuckerorientierung wie im TtAM•AG•4G Komplex in Subsite +1 zeigt, sondern auch der Abstand zwischen Asp448 und der 3'-Hydroxygruppe in der Subsite +1 mit 2,8 Å groß

genug ist, kann diese Erklärung nicht zutreffen. Sehr wahrscheinlich reflektieren die Strukturen MalQ•AGA und TtAM•AG•4G die korrekte Positionierung des Zuckers in Subsite +1, da diese auch die Bindung weiterer Zuckereinheiten in den Subsites +2 und +3 erlaubt. Dagegen scheint die beobachtete Drehung des Zuckerrings in der TaAM•Acarbose Struktur das Resultat einer artifizialen Kristallpackung in Kombination mit nachträglichem Tränken der Kristalle in Acarbose zu sein. D.h. die thermophile TaAM war bei pH 9,0 und Raumtemperatur konformationell so eingefroren, dass Acarbose nicht korrekt in Subsite +1 binden konnte.

Interessanterweise liegt der Cyclohexenring in der Subsite -3 der TtAM•AG Struktur im Vergleich zu MalQ•AGA um etwa 180° gedreht vor. Durch diese Orientierung wäre eine Besetzung der Subsite -4, so wie sie in der MalQ•AGA Struktur beobachtet wird, nicht möglich. Sehr wahrscheinlich liegt das aber an der fehlenden Zuckereinheit in Subsite -4 der TtAM•AG Struktur.

5.3.7 Das Gleichgewicht der MalQ-Reaktion

Die Kristallisationsexperimente mit Acarbose sowie der enzymatische Assay belegen, dass MalQ, wegen der Reorientierung von Glu496 in Abwesenheit eines Akzeptorzuckers, keine Wassermoleküle aktivieren kann und somit erfolgreich die Hydrolyse von Maltoglycanen verhindert. Hydrolytische Nebenreaktionen wären physiologisch auch nicht sinnvoll, da sonst der Maltodextrinphosphorylase MalP die Substrate entzogen werden würden. Somit würde der ATP-konservierende Effekt des Maltose-Systems stark reduziert werden. Außerdem zeigte der enzymatische Assay, dass das Produktspektrum der MalQ-Reaktion von der durchschnittlichen Anzahl an glycosidischen Bindungen pro Substratmolekül abhängt. Je mehr glycosidische Bindungen im Substrat/Substratgemisch vorhanden sind, desto mehr verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung längerer Maltodextrine und einem geringeren Anteil an Glucose. Sowohl die Monte Carlo Simulation ohne Gewichtungparameter als auch die Kreuztabelle mit allen möglichen MalQ Reaktionen führen jedoch zu Gleichgewichtskonzentrationen, die deutlich von den experimentellen abweichen, obwohl beide Simulationen vergleichbare Werte ergeben. Diese Abweichung muss eine thermodynamische Ursache haben. Sollten sich die Energieniveaus der einzelnen glycosidischen Bindungen der Maltodextrine unterscheiden, würden diese mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit gespalten werden. Diese Möglichkeit wurde in den Simulationen nicht berücksichtigt und würde zwangsläufig zu anderen Gleichgewichtskonzentrationen führen. Allerdings haben Untersuchungen gezeigt, dass die verschiedenen glycosidischen Bindungen der Maltodextrine alle ein annähernd identisches Energieniveau aufweisen (Goldberg *et al.*, 1991). Da somit das Reaktionsgleichgewicht nicht durch Enthalpieänderung bedingt sein kann, muss es nach dem 2. Hauptsatz der

Thermodynamik durch eine Maximierung der Entropie begründet sein (Atkins & de Paula, 2006). Auch für die Gleichgewichte der Reaktionen des *Disproportionating enzyme 1* (DPE1) aus *Arabidopsis thaliana* und dem disproportionierenden Enzym aus der Kartoffel konnte gezeigt werden, dass das Gleichgewicht durch Maximierung der Entropie bedingt ist (Kartal *et al.*, 2011; Nakatani, 1999).

Wie erwartet, ist die Anzahl der Interaktionen zwischen MalQ und AGA Ligand in den Subsites -2 bis +1 deutlich größer als in den restlichen. Die Affinität pro Zuckereinheit sollte also zur Peripherie der Bindetasche hin deutlich abnehmen. Die Verteilung der Kontakte lässt vermuten, dass längere Maltodextrine eine höhere Affinität zum aktiven Zentrum aufweisen als kürzere. Außerdem sollten die Subsites der Donorseite aufgrund der größeren Interaktionszahl gegenüber der Akzeptorseite bevorzugt besetzt werden. Dies würde bedeuten, dass zentrale glycosidische Bindungen und Bindungen am reduzierenden Ende des Donormoleküls mit höherer Wahrscheinlichkeit im aktiven Zentrum positioniert werden als glycosidische Bindungen am nicht-reduzierenden Ende. Diese Sichtweise wird auch durch den MalQ•Maltose Komplex gestützt, in dem nur Subsites -2 und -1 besetzt sind. Diese Beobachtung steht allerdings im Widerspruch zu Affinitätsmessungen mittels *surface plasmon resonance* (SPR), die eine höhere Affinität von MalQ zu Maltotriose und Maltotetraose als zu längeren Maltodextrinen ergeben haben (Ruzanski *et al.*, 2013). Jedoch sind diese Ergebnisse durchaus kritisch zu betrachten, da für verschiedene Zucker unterschiedliche Kopplungsmethoden verwendet wurden. So wurde MalQ über ein Biotin-Affinitätsanhängsel an einen Streptavidin-beschichteten Sensorchip gekoppelt, um die Affinität zu Maltopentaose bis Maltoheptaose zu messen. Im Gegensatz dazu wurde MalQ kovalent an den Sensorchip gebunden, um die Affinität zu Maltotriose und Maltotetraose zu messen. Da die so gemessenen Dissoziationskonstanten stark mit der Kopplungsmethode korrelieren, stellt sich die Frage inwieweit die Ergebnisse überhaupt vergleichbar sind. Außerdem ist SPR nur begrenzt aussagekräftig, wenn der Ligand durch die immobilisierte Komponente umgesetzt werden kann. Hinzukommt, dass das SPR Signal für niedermolekulare Liganden ohnehin nur sehr schwach ist.

Je mehr längere Maltodextrine für den Abbau durch die Maltodextrinphosphorylase MalP bereitgestellt werden, desto weniger ATP muss die *E. coli* Zelle für die Phosphorylierung von Glucose aufwenden. MalS spaltet bevorzugt Maltohexaose-Einheiten von längeren Maltodextrinen im Periplasma ab, damit diese vom Maltose/Maltodextrin Transporter MalFGK₂ transportiert werden können (Freundlieb *et al.*, 1988). Somit beträgt die Glucosekonzentration im Gleichgewicht nach Gleichung (4) nur 1/6 der ursprünglichen Maltohexaose und nicht 1/2 wie im Fall Maltose. D.h. durch die bevorzugte Abspaltung von Maltohexaose-Einheiten spart *E. coli* signifikant ATP.

E. coli Stämme, denen das Phosphotransferase System für Glucose (*ptsG*⁻) und die Glucokinase (*glk*⁻) fehlt, sind nicht in der Lage Glucose zu phosphorylieren, sodass sich Glucose mit einer Konzentration von bis zu 56 mM im Cytoplasma ansammeln kann (Xia *et al.*, 2015; Lengsfeld *et al.*, 2009). Unter solchen Bedingungen kann phosphorylierte Glucose nur über den Abbau von Maltodextrinen durch MalP bereitgestellt werden. Interessanterweise sind derartig veränderte Stämme nicht in der Lage auf Maltose zu wachsen. Die bisherige Interpretation dieser Beobachtung war die Inhibition von MalQ durch zu hohe Glucosekonzentrationen und somit fehlende Substrate für den Abbau durch MalP. In dieser Arbeit wurde allerdings gezeigt, dass selbst bei Glucose-Konzentrationen von bis zu 133 mM im Gleichgewicht (66 % wenn eine Mischung aus 100 mM Glucose und 100 mM Maltose als Substrat eingesetzt wird) keine Inhibition von MalQ zu beobachten ist. Die Unfähigkeit der *ptsG*⁻ *glk*⁻ *E. coli* Stämme Maltose als einzige Kohlenhydratquelle zu nutzen, beruht vermutlich eher auf den äußerst geringen Gleichgewichtskonzentration an Maltotetraose, -pentaose und -hexaose in Gegenwart hoher Glucosekonzentrationen. Die geringen Konzentrationen längerer Maltodextrine reichen vermutlich nicht aus, um über den Abbau durch MalP genügend Glucose-1-Phosphat (und somit Glucose-6-Phosphat) für die Glykolyse bereitzustellen.

5.3.8 Acarbose als Inhibitor von Amylomaltasen

Acarbose ist ein α -Glucosidase Inhibitor, der häufig in der Medizin zur Kontrolle des postprandialen Blutzuckerspiegels eingesetzt wird. Die Wirkungsweise beruht auf der kompetitiven Hemmung von α -Glucosidasen in der Bürstensaummembran des Dünndarms zur Verringerung des Abbaus von Stärke und Saccharose. Dies verzögert die Resorption von Glucose und Fructose im Verdauungstrakt (He *et al.*, 2014). Auch *in vitro* wird Acarbose häufig als Inhibitor von α -Glucosidasen und α -Glucanotransferasen eingesetzt (Derosa & Maffioli, 2012; Standl *et al.*, 2014), obwohl nur eine der drei α -1,4-glycosidischen Bindungen nicht durch diese Enzyme gespalten werden kann. Als Folge dessen kann es zur teilweisen Umsetzung der Acarbose kommen. Wie in Kristallisationsexperimenten und enzymatischen Assays in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, werden stöchiometrische Mengen Acarbose umgesetzt. Erst das durch MalQ gebildete AGA wirkt als Inhibitor. Aufgrund der geringen Menge an entstehender Glucose ist diese Reaktion für diätische Anwendungen vernachlässigbar. Aber für Grundlagenforschung, insbesondere zur Untersuchung einer Kombination verschiedener zuckerumsetzender Enzyme in einem Reaktionsansatz könnte die so gebildete Glucose zu unerwünschten Nebenreaktionen führen. Dieser Effekt könnte allerdings durch die Entwicklung effizienterer Inhibitoren umgangen werden. Schon durch eine Positionierung der Acarviosin-Einheit am reduzierenden Ende des Zuckers, könnten bereits alle Enzyme mit exo-Aktivität für das reduzierende Ende des Substrats, die also

jeweils nur die letzte α -glycosidische Bindung am reduzierenden Ende des Zuckers spalten können, sofort gehemmt werden. Denn für diese Enzyme würde, im Falle dieses neuen Inhibitors, die nicht hydrolysierbare Bindung im aktiven Zentrum positioniert werden. Auch der Austausch der beiden α -1,4-O-glycosidischen Bindungen in der Acarbose durch weitere nicht hydrolysierbare, z.B. α -1,4-N-glycosidische, Bindungen wäre lohnenswert, um jegliche Reaktionsmöglichkeiten der Acarbose zu unterbinden. Um dessen Affinität zu erhöhen, könnte dieses Acarbose-Derivat durch weitere Zuckerringe am nicht reduzierenden Ende verlängert werden, die ebenfalls über nicht hydrolysierbare Bindungen verknüpft sind.

Eine Umsetzung von Acarbose unter Kristallisationsbedingungen wurde auch in anderen Arbeiten beobachtet. Jedoch war es bisher nicht möglich alle 7 Zuckereinheiten einer Verknüpfung zweier Acarbiosen zu beobachten. So zeigte die Struktur der 4- α -Glucanotransferase (GTase) aus *Thermotoga maritima* (PDB-Code 1LWJ) ein Pentasaccharid im aktiven Zentrum, dass durch die Verknüpfung zweier Acarbosemoleküle entstanden sein muss. Eine GTase Aktivität gegenüber Acarbose wurde allerdings nicht festgestellt (Roujeinikova *et al.*, 2002). Auch die Kristallstruktur der α -Amylase aus *Aspergillus oryzae* (PDB Code 7TAA) zeigte ein aus zwei Acarbiosen abgeleitetes Pseudo-Hexasaccharid im aktiven Zentrum gebunden (Brzozowski & Davies, 1997), Allerdings wurde in dieser Arbeit lediglich darauf verwiesen, dass man zur exakten Identifizierung des Liganden eine massenspektrometrische Untersuchung durchführen könnte und dass ein enzymatischer Assay keine Aktivität mit Acarbose als Substrat nachweisen konnte. Bei beiden Ligandenkomplexen handelt es sich vermutlich um das gleiche Pseudo-Heptasaccharid wie in der MalQ•AGA Struktur, nur waren jeweils aufgrund zu hoher Flexibilität nicht alle 7 Zuckereinheiten in der Elektronendichtekarte sichtbar.

Bemerkenswerterweise konnte auch das kovalente Zwischenprodukt aus TtAM und Acarviosin-Glucose durch Inkubation von TtAM Kristallen mit Acarbose strukturell aufgeklärt werden (Barends *et al.*, 2007). Vermutlich war das nur möglich, weil das Intermediat in einer stabilen 4C_1 -Sesselkonformation gebunden vorlag und die Subsites +2 und +3 durch den 250s-Loop sterisch so abgeschirmt wurden, dass ein größerer Akzeptor als Glucose, z.B. Acarbose oder Maltose nicht in das aktive Zentrum binden kann. Ein Vergleich der kovalenten TtAM Intermediatsstruktur (PDB Eintrag 2OWC) mit MalQ•AGA zeigt tatsächlich eine andere Positionierung der katalytisch wichtigen Loops 250s- bzw. 400s (siehe Abschnitt 5.3.6). Inwieweit diese sterische Hinderung bei den thermophilen Amylomaltasen durch die nicht native Umgebung des getränkten Proteinkristall beeinflusst wird, müsste durch enzymatische Assays noch untersucht werden. Nur so könnte man mögliche Unterschiede in Akzeptorsubstratspezifität zwischen mesophilen und thermophilen Amylomaltasen feststellen. Jung *et al.* beobachteten, dass die Mutation von Phe251Gly in der *T. brockianus* Amylomaltase (TbAM) die Transglycosylierungsaktivität stärker reduziert als die

Hydrolyseaktivität (Jung *et al.*, 2011). Dabei ist die Abnahme der Transglycosylierungsaktivität für Amylose als Donorsubstrat deutlich weniger reduziert, wenn Maltose statt Glucose als Akzeptor eingesetzt wird. Dies ist interessant, denn eigentlich müsste die sterische Hinderung der Subsites +2 und +3 durch das Phenylalanin eher Glucose als Akzeptor bevorzugen. Inwieweit der Austausch des Phenylalanins durch Glycin allerdings ein gute Wahl zur Untersuchung des Einflusses dieser speziellen Seitenkette auf die Substratspezifität ist, bleibt fraglich, denn Glycine zeigen weit weniger konformationelle Einschränkungen des Peptidrückgrats als alle anderen proteinogenen Aminosäuren (D'Aquino *et al.*, 1996). Es kann daher sein, dass die veränderte Aktivität vor allem auf die erhöhte Flexibilität des 250s-Loops und nicht auf die Größe der Seitenkette zurückzuführen ist.

6 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit waren drei Komponenten des Maltose/Maltodextrin-Systems von *Escherichia coli* – MalT, MalM und MalQ –, die proteinbiochemisch und kristallographisch charakterisiert wurden.

Der Aktivator der Maltosegene, MalT, gehört zur Proteinklasse der **Signal Transduction ATPases with Numerous Domains** (STAND). MalT wird durch ATP und Maltotriose stimuliert und durch Bindung der Proteine Aes, MalK und MalY gehemmt. Auf der Suche nach kristallisierbaren MalT-Fragmenten, die den essentiellen Bereich der **Nucleotide-Binding Oligomerization Domain** (NOD) enthalten, wurden in dieser Arbeit 72 verschiedene MalT-Konstrukte und -Mutanten hinsichtlich Exprimierbarkeit, Reinigung, Löslichkeit, Stabilität und Oligomerezustand durchmustert. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Stabilität von ausgewählten MalT-Fragmenten durch Komplexbildung mit Aes oder MalY verbessern lässt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die NOD für die Wechselwirkung mit Aes und MalY verantwortlich ist. Als aussichtsreiche Kandidaten zur Protein-Kristallisation wurden die MalT-Fragmente MalT₁₋₂₄₆, MalT₁₋₂₅₈ und MalT₁₋₈₀₆ identifiziert. Diese wurden in unterschiedlichen Puffern allein sowie in Gegenwart von stöchiometrischen Mengen Aes oder MalY auf Kristallisierbarkeit hin untersucht. Obwohl ca. 24500 verschiedene Kristallisationsversuche unternommen wurden, war es nicht möglich, eines der MalT-Fragmente zu kristallisieren.

Das am wenigsten erforschte Protein des Maltose-Systems ist das periplasmatische MalM. Zunächst konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen werden, dass das Signalpeptid 26 Aminosäuren umfasst. Das reife Protein unterteilt sich in zwei Domänen, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind. Analytische Gelfiltrationsexperimente des kompletten Proteins und seiner N- und C-terminalen Domänen deuten auf ein physiologisches Hexamer hin, dessen Oligomerisierung durch die C-terminale Domäne vermittelt wird. Kristallisationsexperimente wurden sowohl mit dem intakten MalM als auch den einzelnen Domänen unternommen. Aufgrund des flexiblen Linkers war es wohl nicht möglich das komplette MalM zu kristallisieren. Die N-terminale Domäne kristallisierte erst nach Einführung von Mutationen zur Reduzierung der Oberflächen-Entropie, wohingegen die Methylierung von Lysinseitenketten des Wildtyp-Proteins die Proteinlöslichkeit nicht ausreichend für die Kristallisation senkte. Leider war die Auflösungsgrenze dieser Kristalle mit etwa 7 Å nicht ausreichend für eine Strukturaufklärung. Hingegen lieferte die C-terminale Domäne beugungsfähige Kristalle mit einer Auflösungsgrenze von 2,8 Å. Aufgrund fehlender Ähnlichkeit zu bekannten Proteinstrukturen war es allerdings nicht möglich, das Phasenproblem durch Molekularen Ersatz zu lösen.

Die Amylomaltase MalQ katalysiert Disproportionierungsreaktionen, bei denen Glucosyl- oder Dextrinyl-Einheiten zwischen linearen Maltodextrinen verschiedener Länge übertragen werden. Um den molekularen Mechanismus dieser Transglycosylierung zu verstehen, wurden drei verschiedene Kristallstrukturen von MalQ mit einer Auflösung von bis zu 2,1 Å bestimmt: die apo-Form, ein Komplex mit dem Substrat Maltose sowie ein Inhibitor-Komplex mit dem Übergangszustandsanalogon Acarviosinyl-Glucosyl-Acarbose. Das Phasenproblem wurde durch *Multiple-wavelength Anomalous Dispersion* (MAD) mit Hilfe eines Selenomethionin-Derivats gelöst. MalQ repräsentiert die erste Struktur einer mesophilen bakteriellen Amylomaltase. Verglichen mit homologen thermophilen Enzymen weist MalQ eine N-terminale Domäne von ungefähr 140 Aminosäuren sowie einige kleinere Insertionen auf. Die N-terminale Domäne scheint einzigartig für Amylomaltasen aus Enterobakterien zu sein. Sie besteht aus zwei Untereinheiten, die jeweils mit unterschiedlichen Bereichen der katalytischen Kerndomäne interagieren. Diese Kerndomäne zeigt eine $(\beta\alpha)_8$ -TIM-Barrel-Faltung mit acht zentralen parallelen β -Strängen und acht angelagerten Helices.

Die ermittelten Kristallstrukturen zeigen MalQ in drei unterschiedlichen Konformationen, die sich einzelnen Stadien des enzymatischen Reaktionszyklus zuordnen lassen. Insbesondere die Struktur von MalQ im Komplex mit dem Inhibitor Acarviosin-Glucose-Acarbose zeigt, dass es zwei Bedingungen gibt, unter denen die Seitenketten des Säure/Base-Katalysators Glu496 in seiner katalytisch aktiven Positionierung vorliegt: 1.) die Anwesenheit von sowohl einer 3- als auch 4-OH Gruppe einer Glucoseeinheit in der ersten Akzeptorbindetasche (*acceptor subsite +1*) oder 2.) eine im aktiven Zentrum positionierte α 1-4 glycosidische Bindung. Die MalQ-Inhibitorstruktur ist zudem die erste Amylomaltase-Struktur, in der sieben Substratbindetaschen, vier auf der Donorseite und drei auf der Akzeptorseite, besetzt vorliegen. Mittels eines HPLC-basierten Enzymassays konnte außerdem gezeigt werden, dass die Gleichgewichtskonzentrationen der verschiedenen Maltodextrinprodukte von der Längenverteilung des eingesetzten Substrats abhängt, wobei längere Substrate zu einer geringeren Glucosekonzentration im Gleichgewicht führen. Gleichzeitig konnte widerlegt werden, dass MalQ durch Glucose gehemmt wird. Sowohl die strukturellen als auch die enzymatischen Befunde sind konsistent mit der in der Literatur beschriebenen extrem niedrigen Hydrolyserate des Maltodextrinsubstrats.

7 Summary

Over the course of this work three components of the maltose/maltodextrin system in *Escherichia coli* - MalT, MalM and MalQ - have been characterised, both proteochemically and crystallographically.

MalT the inducer of the genes of the maltose regulon belongs to the protein class of **Signal Transduction ATPases with Numerous Domains** (STAND). It is activated in the presence of ATP and maltotriose but deactivated by binding to the proteins Aes, MalK and MalY. In order to obtain fragments of MalT suitable for crystallization, which still contain the essential **Nucleotide-Binding Oligomerization Domain** (NOD), 72 different constructs of MalT and corresponding mutants have been screened for expression yield, stability and oligomerization tendencies. Additionally it was analyzed whether selected MalT fragments could be stabilized by complex formation with Aes and MalY. Thereby it could be shown that the NOD is responsible for the interaction of MalT with Aes and MalY. MalT₁₋₂₄₆, MalT₁₋₂₅₈ and MalT₁₋₈₀₆ could be identified as most promising MalT fragments in respect of their chances for crystallisation. Those MalT fragments have been tested in crystallisation experiments using different buffer conditions as well as co-crystallisation with stoichiometric amounts of Aes and MalY. In total about 24500 different crystallisation experiments have been performed, though none resulted in the formation of MalT crystals.

The periplasmic MalM is the least characterised protein of the maltose system. It could be proven by mass spectrometric analyses that its signal peptide consists of 26 amino acids. The mature protein is composed of two domains, which are connected by a flexible linker region. Analytical gelfiltration experiments of the full length protein and its N- and C-terminal domains indicate that the C-terminal domain of MalM is inducing the formation of its physiological hexameric conformation. Crystallisation experiments have been performed with the full length protein as well as its individual domains. It was not possible to crystallise the full length MalM due to the presence of the flexible linker region. The N-terminal domain could be crystallised only after several amino acids had been mutated to reduce the surface entropy, since even the methylation of lysine side chains of the native MalM has not decreased the solubility sufficiently for the formation of protein crystals. Unfortunately the resolution limit of the x-ray diffraction experiments was only about 7 Å and thus not suitable for structure determination. In contrast crystals of the C-terminal domain diffracted up to 2.8 Å. Due to a low similarity with known protein structures it was not possible to solve the crystallographic phase problem by molecular replacement.

The amylomaltase MalQ catalyzes transglycosylation/disproportionation reactions in which glycosyl or dextrinyl units are transferred among linear maltodextrins of various lengths. Three crystal structures of MalQ at resolutions down to 2.1 Å have been determined in order

to understand the molecular mechanism of this transglycosylation reaction: the apo form, a complex with the substrate maltose and an inhibitor complex with the transition state analog acarviosinyl-glucosyl-acarbose. The phase problem could be solved by *Multiple-wavelength Anomalous Dispersion* (MAD) with a selenomethionine labelled crystal. MalQ is the first known structure of an amylomaltase from a mesophilic bacterium. Compared to the thermophilic enzymes it has an additional N-terminal extension which consists of about 140 amino acids. This N-terminal moiety seems to be unique in amylomaltases from Enterobacteriaceae. It folds into two distinct subunits which are attached to different areas of the catalytic core domain. The core shows a $(\beta\alpha)_8$ TIM-Barrel fold with eight central β -strands and eight attached helices. The determined MalQ structures can be attributed to three different stages of its reaction cycle. Especially the inhibitor structure shows, that the presence of both a 3-OH and a 4-OH group (or an α 1-4 glycosidic bond) at the acceptor subsite +1 are necessary, in order to achieve the catalytically active positioning of glutamate 496, which acts as an acid/base catalyst during the reaction cycle. The MalQ inhibitor structure is also the first amylomaltase structure in which seven substrate binding sites are occupied, four on the donor site and three on the acceptor site. Furthermore HPLC based enzymatic assays could show that the equilibrium concentrations of the different maltodextrin products depend on the length distribution of the initial substrate. With increasing numbers of glycosidic bonds, less glucose is formed. Additionally it could be refuted that MalQ is inhibited by glucose. Thus, both structural and enzymatic data are consistent with the extremely low hydrolysis rates observed for amylomaltases and underline the importance of MalQ for the metabolism of maltodextrins in *E. coli*.

8 Abkürzungen

4G = 4-Deoxyglucose

6DG = 6-Deoxyglucose

A_x = Absorption bei x nm

Å = Angström (1×10^{-10} m)

ABC = *ATP-binding cassette*

AC = Adenylatcyclase

AG = Acarviosin-Glucose

AGA = Acarviosin-Glucose-Acarbose

Amp = Ampicillin

AP = Alkalische Phosphatase

ADP = Adenosintriphosphat

AEX = Anionenaustausch Chromatographie (*anion exchange chromatography*)

Afe = *Alcaligenes faecalis*

Ala = Alanin

APS = Ammoniumperoxodisulfat

Arg = Arginin

Asp = Aspartat

ATP = Adenosintriphosphat

aTc = Anhydrotetracyclin

BESSY = Berliner Elektronen-Speicherring Gesellschaft für Synchrotronstrahlung

cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat

CBM = *Carbohydrate binding Module*

CRP = *cAMP Receptor Protein*

Cys = Cystein

DMAB = Dimethylaminoboran

DNA = Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)

DTT = Dithiotreitol

EI = Enzym I des *Phosphoenolpyruvate–Carbohydrate Phosphotransferase System*

EII = Enzym II des *Phosphoenolpyruvate–Carbohydrate Phosphotransferase System*

FnIII = Fibronectin Typ III

FOM = *Figure of Merit*

GH = Glycosid-Hydrolase

Glu = Glutamat

HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure

Hin = *Haemophilis influenza*

His = Histidin

HPLC = *High-Performance Liquid Chromatography*

HPr = Histidin-Protein des *Phosphoenolpyruvate–Carbohydrate Phosphotransferase System*

Ida = Iminodiessigsäure

Ig = Immunoglobulin

IMAC = *immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*

IPTG = Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

LB = Luria-Bertani

Leu = Leucin

MAD = *multiple anomalous Dispersion*

MBP = *Maltose binding Protein*

Mlc = *makes large Colonies*

MR = *molecular Replacement*

NAD⁺/NADH = Nicotinamid-Adenindinukleotid

NBD = *Nucleotide binding Domain*

NOD = *Nucleotide binding Oligomerization Domain*

Nde = *Neisseria denitrificans*

PDB = Protein Data Bank

PEP = Phosphoenolpyruvat

Pfu = *Pyrococcus furiosus*

PPA = Periplasmaaufschluss

PTS = *Phosphoenolpyruvate–Carbohydrate Phosphotransferase System*

RMSD = *Root-Mean-Square Deviation*

SAC = Streptactin Affinitäts Chromatographie

SBD = *Starch binding Domain*

SEC = Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography)

SeMet = Selenomethionin

STAND = *Signal Transduction ATPases with numerous Domains*

TaAM = *Thermus aquaticus* Amylomaltase

TCEP = Tris(2-Carboxyethyl)Phosphin

TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TIM = Triosephosphateisomerase

Tris = Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan

tRNA = *Transfer ribonucleic acid*

vdW = van der Waals

VS = *Vector Screen*

WD = *winged Domain*

9 Literatur

- Abraham, R.T., Benson, L.M. & Jardine, I. (1983) Synthesis and pH-dependent stability of purine-6-sulfenic acid, a putative reactive metabolite of 6-thiopurine. *J Med Chem* **26**, 1523-1526.
- Ade, J., DeYoung, B.J., Golstein, C. & Innes, R.W. (2007) Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2531-2536.
- Akerstrom, B., Flower, D.R. & Salier, J.P. (2000) Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 1-8.
- Alber, T., Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D., Rivers, P.S. & Wilson, I.A. (1981) On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triose phosphate isomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **293**, 159-171.
- Ali, M.H. & Imperiali, B. (2005) Protein oligomerization: how and why. *Bioorg Med Chem* **13**, 5013-5020.
- Ali, M.K., Hayashi, H., Karita, S., Goto, M., Kimura, T., Sakka, K. & Ohmiya, K. (2001) Importance of the carbohydrate-binding module of *Clostridium stercorarium* Xyn10B to xylan hydrolysis. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 41-47.
- Ammelburg, M., Frickey, T. & Lupas, A.N. (2006) Classification of AAA+ proteins. *J Struct Biol* **156**, 2-11.
- Arakawa, T., Bhat, R. & Timasheff, S.N. (1990) Preferential interactions determine protein solubility in three-component solutions: the MgCl₂ system. *Biochemistry* **29**, 1914-1923.
- Arakawa, T. & Timasheff, S.N. (1982a) Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry* **21**, 6545-6552.
- Arakawa, T. & Timasheff, S.N. (1982b) Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry* **21**, 6536-6544.
- Arakawa, T. & Timasheff, S.N. (1983) Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch Biochem Biophys* **224**, 169-177.
- Atkins, P.W. & de Paula, J. (2006) *Physikalische Chemie*, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Avigad, G. (1977) Dansyl hydrazine as a fluorimetric reagent for thin-layer chromatographic analysis of reducing sugars. *J Chromatogr* **139**, 343-347.
- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 411-421.
- Barends, T.R., Bultema, J.B., Kaper, T., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L. & Dijkstra, B.W. (2007) Three-way stabilization of the covalent intermediate in amylomaltase, an alpha-amylase-like transglycosylase. *J Biol Chem* **282**, 17242-17249.
- Becker, S., Palm, D. & Schinzel, R. (1994) Dissecting differential binding in the forward and reverse reaction of *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase using 2-deoxyglucosyl substrates. *J Biol Chem* **269**, 2485-2490.
- Bell, M.R., Engleka, M.J., Malik, A. & Strickler, J.E. (2013) To fuse or not to fuse: what is your purpose? *Protein Sci* **22**, 1466-1477.
- Benkert, P., Biasini, M. & Schwede, T. (2011) Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **27**, 343-350.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L. & Schwede, T. (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **42**, W252-258.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blencke, H.M., Homuth, G., Ludwig, H., Mader, U., Hecker, M. & Stulke, J. (2003) Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab Eng* **5**, 133-149.

- Böhm, A. & Boos, W. (2004) Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr Opin Microbiol* 7, 151-156.
- Böhm, A., Diez, J., Diederichs, K., Welte, W. & Boos, W. (2002) Structural model of MalK, the ABC subunit of the maltose transporter of *Escherichia coli*: implications for mal gene regulation, inducer exclusion, and subunit assembly. *J Biol Chem* 277, 3708-3717.
- Boivin, S., Kozak, S. & Meijers, R. (2013) Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expr Purif* 91, 192-206.
- Bolam, D.N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M.P., Rixon, J.E., Boraston, A., Hazlewood, G.P. & Gilbert, H.J. (1998) *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J* 331 (Pt 3), 775-781.
- Bolam, D.N., Xie, H., White, P., Simpson, P.J., Hancock, S.M., Williamson, M.P. & Gilbert, H.J. (2001) Evidence for synergy between family 2b carbohydrate binding modules in *Cellulomonas fimi* xylanase 11A. *Biochemistry* 40, 2468-2477.
- Boos, W. & Böhm, A. (2000) Learning new tricks from an old dog: MalT of the *Escherichia coli* maltose system is part of a complex regulatory network. *Trends Genet* 16, 404-409.
- Boos, W. & Shuman, H. (1998) Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 204-229.
- Boraston, A.B., Healey, M., Klassen, J., Ficko-Blean, E., Lammerts van Bueren, A. & Law, V. (2006) A structural and functional analysis of alpha-glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. *J Biol Chem* 281, 587-598.
- Boraston, A.B., Kwan, E., Chiu, P., Warren, R.A. & Kilburn, D.G. (2003) Recognition and hydrolysis of noncrystalline cellulose. *J Biol Chem* 278, 6120-6127.
- Braberg, H., Webb, B.M., Tjioe, E., Pieper, U., Sali, A. & Madhusudhan, M.S. (2012) SALIGN: a web server for alignment of multiple protein sequences and structures. *Bioinformatics* 28, 2072-2073.
- Bragg, W.L. (1913) The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* 17, 43-57.
- Brass, J.M. & Manson, M.D. (1984) Reconstitution of maltose chemotaxis in *Escherichia coli* by addition of maltose-binding protein to calcium-treated cells of maltose regulon mutants. *J Bacteriol* 157, 881-890.
- Brown, A.D. & Simpson, J.R. (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* 72, 589-591.
- Brzozowski, A.M. & Davies, G.J. (1997) Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 36, 10837-10845.
- Bucher, M.H., Evdokimov, A.G. & Waugh, D.S. (2002) Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 392-397.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Bunaciu, A.A., Udristioiu, E.G. & Aboul-Enein, H.Y. (2014) X-ray diffraction: instrumentation and applications. *Crit Rev Anal Chem* 45, 289-299.
- Busby, S. & Ebricht, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* 293, 199-213.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. & Henrissat, B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37, D233-238.
- Carvalho, C.C., Phan, N.N., Chen, Y. & Reilly, P.J. (2015) Carbohydrate-binding module tribes. *Biopolymers* 103, 203-214.

- Cavaggoni, A., Findlay, J.B. & Tirindelli, R. (1990) Ligand binding characteristics of homologous rat and mouse urinary proteins and pyrazine-binding protein of calf. *Comp Biochem Physiol B* **96**, 513-520.
- Chapon, C. (1982a) Expression of *malT*, the regulator gene of the maltose region in *Escherichia coli*, is limited both at transcription and translation. *Embo J* **1**, 369-374.
- Chapon, C. (1982b) Role of the catabolite activator protein in the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **150**, 722-729.
- Charnock, S.J., Bolam, D.N., Turkenburg, J.P., Gilbert, H.J., Ferreira, L.M., Davies, G.J. & Fontes, C.M. (2000) The X6 "thermostabilizing" domains of xylanases are carbohydrate-binding modules: structure and biochemistry of the *Clostridium thermocellum* X6b domain. *Biochemistry* **39**, 5013-5021.
- Chaudhuri, B.N., Kleywegt, G.J., Bjorkman, J., Lehman-McKeeman, L.D., Oliver, J.D. & Jones, T.A. (1999) The structures of alpha 2u-globulin and its complex with a hyaline droplet inducer. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 753-762.
- Chen, R., Schmidmayr, W., Kramer, C., Chen-Schmeisser, U. & Henning, U. (1980) Primary structure of major outer membrane protein II (ompA protein) of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 4592-4596.
- Cheng, Y., Liu, D., Feng, Y. & Jing, G. (2003) An efficient fusion expression system for protein and peptide overexpression in *Escherichia coli* and NMR sample preparation. *Protein Pept Lett* **10**, 175-181.
- Chruszcz, M., Potrzebowski, W., Zimmerman, M.D., Grabowski, M., Zheng, H., Lasota, P. & Minor, W. (2008) Analysis of solvent content and oligomeric states in protein crystals - does symmetry matter? *Protein Sci* **17**, 623-632.
- Clausen, T., Schlegel, A., Peist, R., Schneider, E., Steegborn, C., Chang, Y.S., Haase, A., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. & Boos, W. (2000) X-ray structure of MalY from *Escherichia coli*: a pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme acting as a modulator in *mal* gene expression. *Embo J* **19**, 831-842.
- Consortium, T.U. (2008) The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* **36**, D190-195.
- Cooper, D.R., Boczek, T., Grelewska, K., Pinkowska, M., Sikorska, M., Zawadzki, M. & Derewenda, Z. (2007) Protein crystallization by surface entropy reduction: optimization of the SER strategy. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**, 636-645.
- Cotteville, M., Larquet, E., Jonic, S., Petoukhov, M.V., Caprini, G., Paravisi, S., Svergun, D.I., Vanoni, M.A. & Boisset, N. (2008) The subnanometer resolution structure of the glutamate synthase 1.2-MDa hexamer by cryoelectron microscopy and its oligomerization behavior in solution: functional implications. *J Biol Chem* **283**, 8237-8249.
- Cowtan, K. (2006) The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 1002-1011.
- Creighton, T.E. (1997) *Protein Structure: A Practical Approach*, Oxford, University Press.
- D'Aquino, J.A., Gomez, J., Hilser, V.J., Lee, K.H., Amzel, L.M. & Freire, E. (1996) The magnitude of the backbone conformational entropy change in protein folding. *Proteins* **25**, 143-156.
- Danot, O., Marquet, E., Vidal-Ingigliardi, D. & Richet, E. (2009) Wheel of Life, Wheel of Death: A Mechanistic Insight into Signaling by STAND Proteins. *Structure* **17**, 172-182.
- Danot, O., Vidal-Ingigliardi, D. & Raibaud, O. (1996) Two amino acid residues from the DNA-binding domain of MalT play a crucial role in transcriptional activation. *J Mol Biol* **262**, 1-11.
- Dardonville, B. & Raibaud, O. (1990) Characterization of *malT* mutants that constitutively activate the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 1846-1852.
- 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 1.7A resolution. *Biochemistry* **38**, 8385-8392.

- Davidson, A.L., Laghaeian, S.S. & Mannering, D.E. (1996) The maltose transport system of *Escherichia coli* displays positive cooperativity in ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 271, 4858-4863.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853-859.
- Davis, I.W., Leaver-Fay, A., Chen, V.B., Block, J.N., Kapral, G.J., Wang, X., Murray, L.W., Arendall, W.B., 3rd, Snoeyink, J., Richardson, J.S. & Richardson, D.C. (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 35, W375-383.
- De Schrijver, A. & De Mot, R. (1999) A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* 145 (Pt 6), 1287-1288.
- Death, A., Notley, L. & Ferenci, T. (1993) Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *J Bacteriol* 175, 1475-1483.
- Débarbouillé, M., Cossart, P. & Raibaud, O. (1982) A DNA sequence containing the control sites for gene *malT* and for the *malPQ* operon. *Mol Gen Genet* 185, 88-92.
- Decker, K., Plumbridge, J. & Boos, W. (1998) Negative transcriptional regulation of a positive regulator: the expression of *malT*, encoding the transcriptional activator of the maltose regulon of *Escherichia coli*, is negatively controlled by Mlc. *Mol Microbiol* 27, 381-390.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos, CA, USA, DeLano Scientific.
- Derewenda, Z.S. & Vekilov, P.G. (2006) Entropy and surface engineering in protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 116-124.
- Derosa, G. & Maffioli, P. (2012) Efficacy and safety profile evaluation of acarbose alone and in association with other antidiabetic drugs: a systematic review. *Clin Ther* 34, 1221-1236.
- Desseaux, V., Payan, F., Ajandouz, E.H., Svensson, B., Haser, R. & Marchis-Mouren, G. (1991) Effect of limited proteolysis in the 8th loop of the barrel and of antibodies on porcine pancreas amylase activity. *Biochim Biophys Acta* 1080, 237-244.
- Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 939-1031.
- Dippel, R. & Boos, W. (2005) The maltodextrin system of *Escherichia coli*: metabolism and transport. *J Bacteriol* 187, 8322-8331.
- Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Liss, J. & Meyer, O. (2004) Carbon monoxide induced decomposition of the active site [Ni-4Fe-5S] cluster of CO dehydrogenase. *J Am Chem Soc* 126, 5382-5387.
- Double, S. (1997) Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol* 276, 523-530.
- Doye, J.P., Louis, A.A. & Vendruscolo, M. (2004) Inhibition of protein crystallization by evolutionary negative design. *Phys Biol* 1, P9-13.
- Eckert, K., Vigouroux, A., Lo Leggio, L. & Morera, S. (2009) Crystal structures of *A. acidocaldarius* endoglucanase Cel9A in complex with cello-oligosaccharides: strong -1 and -2 subsites mimic cellobiohydrolase activity. *J Mol Biol* 394, 61-70.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 486-501.
- Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., Detitta, G.T., Dekker, N. & Nordlund, P. (2006) Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem* 357, 289-298.
- Ewald, P.P. (1969) Introduction to the dynamical theory of X-ray diffraction. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 103-108.
- Facey, S.J. & Kuhn, A. (2004) Membrane integration of *E. coli* model membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1694, 55-66.
- Farnum, M. & Zukoski, C. (1999) Effect of glycerol on the interactions and solubility of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biophys J* 76, 2716-2726.

- Fellouse, F.A., Wiesmann, C. & Sidhu, S.S. (2004) Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: a dominant role for tyrosine in antigen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12467-12472.
- Ferenci, T. & Boos, W. (1980) The role of the *Escherichia coli* lambda receptor in the transport of maltose and maltodextrins. *J Supramol Struct* 13, 101-116.
- Ferenci, T., Brass, J. & Boos, W. (1980) The role of the periplasmic maltose-binding protein and the outer-membrane phage lambda receptor in maltodextrin transport of *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* 8, 680-681.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155, 83-88.
- Flower, D.R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318 (Pt 1), 1-14.
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K. & Nunez, G. (2009) Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 227, 106-128.
- Freundlieb, S., Ehmann, U. & Boos, W. (1988) Facilitated diffusion of p-nitrophenyl-alpha-D-maltohexaoside through the outer membrane of *Escherichia coli*. Characterization of LamB as a specific and saturable channel for maltooligosaccharides. *J Biol Chem* 263, 314-320.
- Galkin, O. & Vekilov, P.G. (2000) Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid-liquid phase boundary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6277-6281.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Gilson, E., Clement, J.M., Brutlag, D. & Hofnung, M. (1984) A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *Embo J* 3, 1417-1421.
- Gilson, E., Rousset, J.P., Charbit, A., Perrin, D. & Hofnung, M. (1986) *malM*, a new gene of the maltose regulon in *Escherichia coli* K12. I. *malM* is the last gene of the *malk-lamB* operon and encodes a periplasmic protein. *J Mol Biol* 191, 303-311.
- Godany, A., Vidova, B. & Janecek, S. (2008) The unique glycoside hydrolase family 77 amyloamylase from *Borrelia burgdorferi* with only catalytic triad conserved. *FEMS Microbiol Lett* 284, 84-91.
- Goldberg, R.N., Bell, D., Tewari, Y.B. & McLaughlin, M.A. (1991) Thermodynamics of hydrolysis of oligosaccharides. *Biophys Chem* 40, 69-76.
- Görke, B. & Stülke, J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6, 613-624.
- Gouridis, G., Karamanou, S., Gelis, I., Kalodimos, C.G. & Economou, A. (2009) Signal peptides are allosteric activators of the protein translocase. *Nature* 462, 363-367.
- Hall, P.R., Wang, Y.F., Rivera-Hainaj, R.E., Zheng, X., Pustai-Carey, M., Carey, P.R. & Yee, V.C. (2003) Transcarboxylase 12S crystal structure: hexamer assembly and substrate binding to a multienzyme core. *Embo J* 22, 2334-2347.
- He, K., Shi, J.C. & Mao, X.M. (2014) Safety and efficacy of acarbose in the treatment of diabetes in Chinese patients. *Ther Clin Risk Manag* 10, 505-511.
- Hendrickson, W.A. (1991) Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* 254, 51-58.
- Hendrickson, W.A. (2000) Synchrotron crystallography. *Trends Biochem Sci* 25, 637-643.
- Hendrickson, W.A. & Ogata, C.M. (1997) Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements. *Methods in Enzymology* 276, 494-523.
- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 (Pt 2), 309-316.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 293 (Pt 3), 781-788.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316 (Pt 2), 695-696.

- Hernandez-Santoyo, A., Dominguez-Ramirez, L., Reyes-Lopez, C.A., Gonzalez-Mondragon, E., Hernandez-Arana, A. & Rodriguez-Romero, A. (2012) Effects of a buried cysteine-to-serine mutation on yeast triosephosphate isomerase structure and stability. *Int J Mol Sci* **13**, 10010-10021.
- Hikita, C. & Mizushima, S. (1992) Effects of total hydrophobicity and length of the hydrophobic domain of a signal peptide on in vitro translocation efficiency. *J Biol Chem* **267**, 4882-4888.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, R., Gentz, R. & Stüber, D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology* **6**, 321-1325.
- Hofnung, M., Hatfield, D. & Schwartz, M. (1974) *malB* region in *Escherichia coli* K-12: characterization of new mutations. *J Bacteriol* **117**, 40-47.
- Holm, L. & Rosenström, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**, W545-549.
- Horinouchi, S., Kito, M., Nishiyama, M., Furuya, K., Hong, S.K., Miyake, K. & Beppu, T. (1990) Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **95**, 49-56.
- Hosono, K., Kakuda, H. & Ichihara, S. (1995) Decreasing accumulation of acetate in a rich medium by *Escherichia coli* on introduction of genes on a multicopy plasmid. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 256-261.
- Hytonen, V.P., Laitinen, O.H., Airene, T.T., Kidron, H., Meltola, N.J., Porkka, E.J., Horha, J., Paldanius, T., Maatta, J.A., Nordlund, H.R., Johnson, M.S., Salminen, T.A., Airene, K.J., Yla-Herttuala, S. & Kulomaa, M.S. (2004) Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*. *Biochem J* **384**, 385-390.
- Inada, T., Kimata, K. & Aiba, H. (1996) Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes Cells* **1**, 293-301.
- Inohara, N. & Nunez, G. (2001) The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* **20**, 6473-6481.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**, 318-356.
- Jahandideh, S., Jaroszewski, L. & Godzik, A. (2014) Improving the chances of successful protein structure determination with a random forest classifier. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**, 627-635.
- Janecek, S., Svensson, B. & Henrissat, B. (1997) Domain evolution in the alpha-amylase family. *J Mol Evol* **45**, 322-331.
- Joly, N., Bohm, A., Boos, W. & Richet, E. (2004) MalK, the ATP-binding cassette component of the *Escherichia coli* maltodextrin transporter, inhibits the transcriptional activator malt by antagonizing inducer binding. *J Biol Chem* **279**, 33123-33130.
- Joly, N., Danot, O., Schlegel, A., Boos, W. & Richet, E. (2002) The Aes protein directly controls the activity of MalT, the central transcriptional activator of the *Escherichia coli* maltose regulon. *J Biol Chem* **277**, 16606-16613.
- Jones, S. & Thornton, J.M. (1996) Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13-20.
- Jung, J.H., Jung, T.Y., Seo, D.H., Yoon, S.M., Choi, H.C., Park, B.C., Park, C.S. & Woo, E.J. (2011) Structural and functional analysis of substrate recognition by the 250s loop in amyloamylase from *Thermus brockianus*. *Proteins* **79**, 633-644.
- Kabsch, W. (2010) Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 133-144.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Kanagawa, M., Satoh, T., Ikeda, A., Adachi, Y., Ohno, N. & Yamaguchi, Y. (2011) Structural insights into recognition of triple-helical beta-glucans by an insect fungal receptor. *J Biol Chem* **286**, 29158-29165.

- Kantardjieff, K.A. & Rupp, B. (2003) Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* 12, 1865-1871.
- Kaper, T., Talik, B., Ettema, T.J., Bos, H., van der Maarel, M.J. & Dijkhuizen, L. (2005) Amylomaltase of *Pyrobaculum aerophilum* IM2 produces thermoreversible starch gels. *Appl Environ Microbiol* 71, 5098-5106.
- Kartal, O., Mahlow, S., Skupin, A. & Ebenhoh, O. (2011) Carbohydrate-active enzymes exemplify entropic principles in metabolism. *Mol Syst Biol* 7, 542.
- Katsuya, Y., Mezaki, Y., Kubota, M. & Matsuura, Y. (1998) Three-dimensional structure of *Pseudomonas isoamylase* at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* 281, 885-897.
- Keegan, R.M. & Winn, M.D. (2008) MrBUMP: an automated pipeline for molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64, 119-124.
- Kelman, Z. & White, M.F. (2005) Archaeal DNA replication and repair. *Curr Opin Microbiol* 8, 669-676.
- Killian, J.A., Keller, R.C., Struyve, M., de Kroon, A.I., Tommassen, J. & de Kruijff, B. (1990) Tryptophan fluorescence study on the interaction of the signal peptide of the *Escherichia coli* outer membrane protein PhoE with model membranes. *Biochemistry* 29, 8131-8137.
- Kim, H.J., Ha, S., Lee, H.Y. & Lee, K.J. (2014) ROSics: Chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology. *Mass Spectrom Rev*.
- Kita, Y., Arakawa, T., Lin, T.Y. & Timasheff, S.N. (1994) Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions. *Biochemistry* 33, 15178-15189.
- Klein, C. & Schulz, G.E. (1991) Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 217, 737-750.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2256-2268.
- Krug, M., Weiss, M.S., Heinemann, U. & Mueller, U. (2012) XDSAPP : a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS. *J. Appl. Cryst.* 45, 568-572.
- Kuan, G., Dassa, E., Saurin, W., Hofnung, M. & Saier, M.H., Jr. (1995) Phylogenetic analyses of the ATP-binding constituents of bacterial extracytoplasmic receptor-dependent ABC-type nutrient uptake permeases. *Res Microbiol* 146, 271-278.
- Kühnau, S., Reyes, M., Sievertsen, A., Shuman, H.A. & Boos, W. (1991) The activities of the *Escherichia coli* MalK protein in maltose transport, regulation, and inducer exclusion can be separated by mutations. *J Bacteriol* 173, 2180-2186.
- Kundig, W., Ghosh, S. & Roseman, S. (1964) Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52, 1067-1074.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laskowski, R.A., Hutchinson, E.G., Michie, A.D., Wallace, A.C., Jones, M.L. & Thornton, J.M. (1997) PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem Sci* 22, 488-490.
- LaVallie, E.R. & McCoy, J.M. (1995) Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 6, 501-506.
- Lawson, C.L., van Montfort, R., Strokopytov, B., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., de Vries, G.E., Penninga, D., Dijkhuizen, L. & Dijkstra, B.W. (1994) Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J Mol Biol* 236, 590-600.
- Leahy, D.J., Hendrickson, W.A., Aukhil, I. & Erickson, H.P. (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* 258, 987-991.
- Lee, J.C. & Timasheff, S.N. (1981) The stabilization of proteins by sucrose. *J Biol Chem* 256, 7193-7201.

- Lee, S.J., Boos, W., Bouche, J.P. & Plumbridge, J. (2000) Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *Embo J* 19, 5353-5361.
- Leipe, D.D., Koonin, E.V. & Aravind, L. (2004) STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J Mol Biol* 343, 1-28.
- Lengsfeld, C., Schonert, S., Dippel, R. & Boos, W. (2009) Glucose- and glucokinase-controlled mal gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191, 701-712.
- Li, Y. (2011) Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expr Purif* 80, 260-267.
- Lim, J.C., Choi, H.I., Park, Y.S., Nam, H.W., Woo, H.A., Kwon, K.S., Kim, Y.S., Rhee, S.G., Kim, K. & Chae, H.Z. (2008) Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. *J Biol Chem* 283, 28873-28880.
- Lim, J.C., You, Z., Kim, G. & Levine, R.L. (2011) Methionine sulfoxide reductase A is a stereospecific methionine oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10472-10477.
- Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J.E., Zhao, K., Jin, D.J. & Blattner, F.R. (2005) Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280, 15921-15927.
- Liu, Y. & Bolen, D.W. (1995) The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 34, 12884-12891.
- Lo Conte, L., Chothia, C. & Janin, J. (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 285, 2177-2198.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42, D490-495.
- Longenecker, K.L., Garrard, S.M., Sheffield, P.J. & Derewenda, Z.S. (2001) Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 679-688.
- Low, K.O., Muhammad Mahadi, N. & Md Illias, R. (2013) Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3811-3826.
- Lu, Y. & Sharkey, T.D. (2006) The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant Cell Environ* 29, 353-366.
- Lunin, V.V., Li, Y., Schrag, J.D., Iannuzzi, P., Cygler, M. & Matte, A. (2004) Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose. *J Bacteriol* 186, 6915-6927.
- MacGregor, E.A., Janecek, S. & Svensson, B. (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1546, 1-20.
- Magasanik, B. (1961) Catabolite repression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 26, 249-256.
- Main, A.L., Harvey, T.S., Baron, M., Boyd, J. & Campbell, I.D. (1992) The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell* 71, 671-678.
- Makrides, S.C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60, 512-538.
- Marquenet, E. & Richet, E. (2007) How integration of positive and negative regulatory signals by a STAND signaling protein depends on ATP hydrolysis. *Mol Cell* 28, 187-199.
- Marquenet, E. & Richet, E. (2010) Conserved motifs involved in ATP hydrolysis by MalT, a signal transduction ATPase with numerous domains from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 192, 5181-5191.
- Mateja, A., Devedjiev, Y., Krowarsch, D., Longenecker, K., Dauter, Z., Otlewski, J. & Derewenda, Z.S. (2002) The impact of Glu-->Ala and Glu-->Asp mutations on the crystallization properties of RhoGDI: the structure of RhoGDI at 1.3 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 1983-1991.

- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 33, 491-497.
- Matthews, B.W. (1976) X-ray crystallographic studies of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 27, 493-523.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. & Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658-674.
- McLean, B.W., Boraston, A.B., Brouwer, D., Sanaie, N., Fyfe, C.A., Warren, R.A., Kilburn, D.G. & Haynes, C.A. (2002) Carbohydrate-binding modules recognize fine substructures of cellulose. *J Biol Chem* 277, 50245-50254.
- McPherson, A. (2001) A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. *Protein Sci* 10, 418-422.
- Means, G.E. & Feeney, R.E. (1968) Reductive alkylation of amino groups in proteins. *Biochemistry* 7, 2192-2201.
- Meier, A. & Soding, J. (2015) Automatic Prediction of Protein 3D Structures by Probabilistic Multi-template Homology Modeling. *PLoS Comput Biol* 11, e1004343.
- Messerschmidt, A. (2007) *X-Ray Crystallography of Biomacromolecules: A Practical Guide*, Hoboken, Wiley-Blackwell.
- Meyer, E.A., Castellano, R.K. & Diederich, F. (2003) Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 1210-1250.
- Miller, J.M. & Enemark, E.J. (2016) Fundamental Characteristics of AAA+ Protein Family Structure and Function. *Archaea* 2016, 9294307.
- Monod, J. & Torriani, A.M. (1950) Amylomaltase of *Escherichia coli*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 78, 65-77.
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.P. (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model. *J Mol Biol* 12, 88-118.
- Monroe, N. & Hill, C.P. (2016) Meiotic Clade AAA ATPases: Protein Polymer Disassembly Machines. *J Mol Biol* 428, 1897-1911.
- Mossessova, E. & Lima, C.D. (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* 5, 865-876.
- Mueller, U., Darowski, N., Fuchs, M.R., Forster, R., Hellmig, M., Paithankar, K.S., Puhlinger, S., Steffien, M., Zocher, G. & Weiss, M.S. (2012) Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J Synchrotron Radiat* 19, 442-449.
- Murphy, K.P. (2001) *Protein Structure, Stability, and Folding*, New York City, USA, Humana Press.
- Murshudov, G.N., Skubak, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F. & Vagin, A.A. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 355-367.
- Nabeshima, Y., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M. & Ogata, K. (1982) Molecular cloning and nucleotide sequences of the complementary DNAs to chicken skeletal muscle myosin two alkali light chain mRNAs. *Nucleic Acids Res* 10, 6099-6110.
- Nakatani, H. (1999) Monte Carlo simulation of 4-alpha-glucanotransferase reaction. *Biopolymers* 50, 145-151.
- Nam, T.W., Jung, H.I., An, Y.J., Park, Y.H., Lee, S.H., Seok, Y.J. & Cha, S.S. (2008) Analyses of Mlc-IIBGlc interaction and a plausible molecular mechanism of Mlc inactivation by membrane sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3751-3756.
- Nilsson, J., Stahl, S., Lundeberg, J., Uhlen, M. & Nygren, P.A. (1997) Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 11, 1-16.
- Nunnari, J. & Walter, P. (1992) Protein targeting to and translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 4, 573-580.
- Nuoffer, C., Zanolari, B. & Erni, B. (1988) Glucose permease of *Escherichia coli*. The effect of cysteine to serine mutations on the function, stability, and regulation of transport and phosphorylation. *J Biol Chem* 263, 6647-6655.
- Oldham, M.L. & Chen, J. (2011) Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 15152-15156.

- Onesti, S., Miller, A.D. & Brick, P. (1995) The crystal structure of the lysyl-tRNA synthetase (LysU) from *Escherichia coli*. *Structure* **3**, 163-176.
- Ortega, S., Schaeffer, M.T., Soderman, D., DiSalvo, J., Linemeyer, D.L., Gimenez-Gallego, G. & Thomas, K.A. (1991) Conversion of cysteine to serine residues alters the activity, stability, and heparin dependence of acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* **266**, 5842-5846.
- Painter, J. & Merritt, E.A. (2006) Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 439-450.
- Palmer, T.N., Ryman, B.E. & Whelan, W.J. (1976) The action pattern of amylomaltase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **69**, 105-115.
- Pape, T. & Schneider, T.R. (2004) HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs. *Journal of Applied Crystallography* **37**, 843-844.
- Park, J.T., Shim, J.H., Tran, P.L., Hong, I.H., Yong, H.U., Oktavina, E.F., Nguyen, H.D., Kim, J.W., Lee, T.S., Park, S.H., Boos, W. & Park, K.H. (2011) Role of maltose enzymes in glycogen synthesis by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **193**, 2517-2526.
- Pathak, E., Atri, N. & Mishra, R. (2014) Analysis of P-Loop and its Flanking Region Subsequence of Diverse NTPases Reveals Evolutionary Selected Residues. *Bioinformatics* **10**, 216-220.
- Peist, R., Koch, A., Bolek, P., Sewitz, S., Kolbus, T. & Boos, W. (1997) Characterization of the *aes* gene of *Escherichia coli* encoding an enzyme with esterase activity. *J Bacteriol* **179**, 7679-7686.
- Peist, R., Schneider-Fresenius, C. & Boos, W. (1996) The MalT-dependent and *malZ*-encoded maltodextrin glucosidase of *Escherichia coli* can be converted into a dextrinyltransferase by a single mutation. *J Biol Chem* **271**, 10681-10689.
- Perkins, S.J. (1986) Protein volumes and hydration effects. The calculations of partial specific volumes, neutron scattering matchpoints and 280-nm absorption coefficients for proteins and glycoproteins from amino acid sequences. *Eur J Biochem* **157**, 169-180.
- Piccolino, M. (2000) Biological machines: from mills to molecules. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 149-153.
- Polayes, D.A., Rice, P.W., Garner, M.M. & Dahlberg, J.E. (1988) Cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein as a repressor of transcription of the *spf* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**, 3110-3114.
- Pollard, A. & Wyn Jones, R.G. (1979) Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta* **144**, 291-298.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W. & Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 543-594.
- Przylas, I., Terada, Y., Fujii, K., Takaha, T., Saenger, W. & Strater, N. (2000a) X-ray structure of acarbose bound to amylomaltase from *Thermus aquaticus*. Implications for the synthesis of large cyclic glucans. *Eur J Biochem* **267**, 6903-6913.
- Przylas, I., Tomoo, K., Terada, Y., Takaha, T., Fujii, K., Saenger, W. & Strater, N. (2000b) Crystal structure of amylomaltase from *Thermus aquaticus*, a glycosyltransferase catalysing the production of large cyclic glucans. *J Mol Biol* **296**, 873-886.
- Pugsley, A.P. & Dubreuil, C. (1988) Molecular characterization of *malQ*, the structural gene for the *Escherichia coli* enzyme amylomaltase. *Mol Microbiol* **2**, 473-479.
- 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**, 785-799.
- Quillin, M.L. & Matthews, B.W. (2000) Accurate calculation of the density of proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 791-794.
- Raibaud, O., Debarbouille, M. & Schwartz, M. (1983) Use of deletions created in vitro to map transcriptional regulatory signals in the *malA* region of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **163**, 395-408.

- Raibaud, O., Gutierrez, C. & Schwartz, M. (1985) Essential and nonessential sequences in *malPp*, a positively controlled promoter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **161**, 1201-1208.
- Raibaud, O., Roa, M., Braun-Breton, C. & Schwartz, M. (1979) Structure of the *malB* region in *Escherichia coli* K12. I. Genetic map of the *malk-lamB* operon. *Mol Gen Genet* **174**, 241-248.
- Rapoport, T.A. (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* **258**, 931-936.
- Rauert, W., Eddine, A.N., Kaufmann, S.H., Weiss, M.S. & Janowski, R. (2007) Reductive methylation to improve crystallization of the putative oxidoreductase Rv0765c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**, 507-511.
- Ray, M.V., Meenan, C.P., Consalvo, A.P., Smith, C.A., Parton, D.P., Sturmer, A.M., Shields, P.P. & Mehta, N.M. (2002) Production of salmon calcitonin by direct expression of a glycine-extended precursor in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **26**, 249-259.
- Rayment, I. (1997) Reductive alkylation of lysine residues to alter crystallization properties of proteins. *Methods Enzymol* **276**, 171-179.
- Reardon, D. & Farber, G.K. (1995) The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *Faseb J* **9**, 497-503.
- Reidl, J. & Boos, W. (1991) The *malX malY* operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *J Bacteriol* **173**, 4862-4876.
- Rhodes, G. (2010) *Crystallography Made Crystal Clear*, Cambridge, Academic Press.
- Richet, E. (2000) Synergistic transcription activation: a dual role for CRP in the activation of an *Escherichia coli* promoter depending on MalT and CRP. *Embo J* **19**, 5222-5232.
- Richet, E., Joly, N. & Danot, O. (2005) Two domains of MalT, the activator of the *Escherichia coli* maltose regulon, bear determinants essential for anti-activation by MalK. *J Mol Biol* **347**, 1-10.
- Richet, E. & Raibaud, O. (1987) Purification and properties of the MalT protein, the transcription activator of the *Escherichia coli* maltose regulon. *J Biol Chem* **262**, 12647-12653.
- Richet, E. & Raibaud, O. (1989) MalT, the regulatory protein of the *Escherichia coli* maltose system, is an ATP-dependent transcriptional activator. *Embo J* **8**, 981-987.
- Riedl, S.J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher, R. & Shi, Y. (2005) Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature* **434**, 926-933.
- Riedl, S.J. & Salvesen, G.S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 405-413.
- Roderick, S.L. (2005) The *lac* operon galactoside acetyltransferase. *C R Biol* **328**, 568-575.
- Rosenblum, B.B., Lee, L.G., Spurgeon, S.L., Khan, S.H., Menchen, S.M., Heiner, C.R. & Chen, S.M. (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res* **25**, 4500-4504.
- Roujeinikova, A., Raasch, C., Burke, J., Baker, P.J., Liebl, W. & Rice, D.W. (2001) The crystal structure of *Thermotoga maritima* maltosyltransferase and its implications for the molecular basis of the novel transfer specificity. *J Mol Biol* **312**, 119-131.
- 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**, 149-162.
- Rousset, J.P., Gilson, E. & Hofnung, M. (1986) *malM*, a new gene of the maltose regulon in *Escherichia coli* K12. II. Mutations affecting the signal peptide of the MalM protein. *J Mol Biol* **191**, 313-320.
- Rupp, B. (2010) *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*, New York, Garland Science.
- Rusch, S.L. & Kendall, D.A. (2007) Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. *Biochemistry* **46**, 9665-9673.

- Ruzanski, C., Smirnova, J., Rejzek, M., Cockburn, D., Pedersen, H.L., Pike, M., Willats, W.G., Svensson, B., Steup, M., Ebenhoh, O., Smith, A.M. & Field, R.A. (2013) A bacterial glucanotransferase can replace the complex maltose metabolism required for starch to sucrose conversion in leaves at night. *J Biol Chem* **288**, 28581-28598.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakamoto, K., Tada, Y., Yokozeki, Y., Akagi, H., Hayashi, N., Fujimura, T. & Ichikawa, N. (1999) Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. *Plant Mol Biol* **40**, 847-855.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, S.L. & Schekman, R. (1992) Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **267**, 13791-13794.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. & Wittinghofer, A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**, 430-434.
- Sauer, R.T. & Baker, T.A. (2011) AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu Rev Biochem* **80**, 587-612.
- Saurin, W. & Dassa, E. (1994) Sequence relationships between integral inner membrane proteins of binding protein-dependent transport systems: evolution by recurrent gene duplications. *Protein Sci* **3**, 325-344.
- Schiefner, A., Gerber, K., Brosig, A. & Boos, W. (2014) Structural and mutational analyses of Aes, an inhibitor of MalT in *Escherichia coli*. *Proteins* **82**, 268-277.
- Schiefner, A., Gerber, K., Seitz, S., Welte, W., Diederichs, K. & Boos, W. (2005) The crystal structure of Mlc, a global regulator of sugar metabolism in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**, 29073-29079.
- Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F. & Rosenbusch, J.P. (1995) Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**, 512-514.
- Schlegel, A., Bohm, A., Lee, S.J., Peist, R., Decker, K. & Boos, W. (2002a) Network regulation of the *Escherichia coli* maltose system. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 301-307.
- Schlegel, A., Danot, O., Richet, E., Ferenci, T. & Boos, W. (2002b) The N terminus of the *Escherichia coli* transcription activator MalT is the domain of interaction with MalY. *J Bacteriol* **184**, 3069-3077.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528-1535.
- Schneider, E., Francoz, E. & Dassa, E. (1992a) Completion of the nucleotide sequence of the 'maltose B' region in *Salmonella typhimurium*: the high conservation of the *malM* gene suggests a selected physiological role for its product. *Biochim Biophys Acta* **1129**, 223-227.
- Schneider, E., Freundlieb, S., Tapio, S. & Boos, W. (1992b) Molecular characterization of the MalT-dependent periplasmic alpha-amylase of *Escherichia coli* encoded by *malS*. *J Biol Chem* **267**, 5148-5154.
- Schreiber, V. & Richet, E. (1999) Self-association of the *Escherichia coli* transcription activator MalT in the presence of maltotriose and ATP. *J Biol Chem* **274**, 33220-33226.
- Schreiber, V., Steegborn, C., Clausen, T., Boos, W. & Richet, E. (2000) A new mechanism for the control of a prokaryotic transcriptional regulator: antagonistic binding of positive and negative effectors. *Mol Microbiol* **35**, 765-776.
- Schwartz, M. (1987) The maltose regulon. *Escherichia Coli and Salmonella typhimurium* **1**, 1482-1502.

- Seitz, S., Lee, S.J., Pennetier, C., Boos, W. & Plumbridge, J. (2003) Analysis of the interaction between the global regulator Mlc and EIIBGlc of the glucose-specific phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**, 10744-10751.
- Sharff, A.J., Rodseth, L.E., Spurlino, J.C. & Quioco, F.A. (1992) Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* **31**, 10657-10663.
- Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra, A. & Schmidt, T.G. (2000) Use of the *Strep*-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol* **326**, 271-304.
- Slabinski, L., Jaroszewski, L., Rodrigues, A.P., Rychlewski, L., Wilson, I.A., Lesley, S.A. & Godzik, A. (2007a) The challenge of protein structure determination--lessons from structural genomics. *Protein Sci* **16**, 2472-2482.
- Slabinski, L., Jaroszewski, L., Rychlewski, L., Wilson, I.A., Lesley, S.A. & Godzik, A. (2007b) XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics* **23**, 3403-3405.
- Sletta, H., Tondervik, A., Hakvag, S., Aune, T.E., Nedal, A., Aune, R., Evensen, G., Valla, S., Ellingsen, T.E. & Brautaset, T. (2007) The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 906-912.
- Soding, J., Biegert, A. & Lupas, A.N. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* **33**, W244-248.
- Sorimachi, K., Le Gal-Coeffet, M.F., Williamson, G., Archer, D.B. & Williamson, M.P. (1997) Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to beta-cyclodextrin. *Structure* **5**, 647-661.
- Sousa, R. (2014) Structural mechanisms of chaperone mediated protein disaggregation. *Front Mol Biosci* **1**, 12.
- Spurlino, J.C., Lu, G.Y. & Quioco, F.A. (1991) The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J Biol Chem* **266**, 5202-5219.
- Standl, E., Theodorakis, M.J., Erbach, M., Schnell, O. & Tuomilehto, J. (2014) On the potential of acarbose to reduce cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* **13**, 81.
- Steegborn, C., Danot, O., Huber, R. & Clausen, T. (2001) Crystal structure of transcription factor MalT domain III: a novel helix repeat fold implicated in regulated oligomerization. *Structure* **9**, 1051-1060.
- Steichen, J.M., Petty, R.V. & Sharkey, T.D. (2008) Domain characterization of a 4-alpha-glucanotransferase essential for maltose metabolism in photosynthetic leaves. *J Biol Chem* **283**, 20797-20804.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned gene. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G.S., Grant, E.P., Bertin, J., Coyle, A.J., Galan, J.E., Askenase, P.W. & Flavell, R.A. (2006) Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* **24**, 317-327.
- Svensson, B. (1994) Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol Biol* **25**, 141-157.
- Syson, K., Stevenson, C.E., Rashid, A.M., Saalbach, G., Tang, M., Tuukkanen, A., Svergun, D.I., Withers, S.G., Lawson, D.M. & Bornemann, S. (2014) Structural insight into how *Streptomyces coelicolor* maltosyl transferase GlgE binds alpha-maltose 1-phosphate and forms a maltosyl-enzyme intermediate. *Biochemistry* **53**, 2494-2504.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1995) A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6339-6343.

- Tagami, H. & Aiba, H. (1998) A common role of CRP in transcription activation: CRP acts transiently to stimulate events leading to open complex formation at a diverse set of promoters. *Embo J* **17**, 1759-1767.
- Takaha, T., Yanase, M., Okada, S. & Smith, S.M. (1993) Disproportionating enzyme (4-alpha-glucanotransferase; EC 2.4.1.25) of potato. Purification, molecular cloning, and potential role in starch metabolism. *J Biol Chem* **268**, 1391-1396.
- Takahashi, T., Kato, K., Ikegami, Y. & Irie, M. (1985) Different behavior towards raw starch of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* Sp. *J Biochem* **98**, 663-671.
- Tameling, W.I., Elzinga, S.D., Darmin, P.S., Vossen, J.H., Takken, F.L., Haring, M.A. & Cornelissen, B.J. (2002) The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* **14**, 2929-2939.
- Tang, C., Williams, D.C., Jr., Ghirlando, R. & Clore, G.M. (2005) Solution structure of enzyme IIA(Chitobiose) from the N,N'-diacetylchitobiose branch of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J Biol Chem* **280**, 11770-11780.
- Tapio, S., Yeh, F., Shuman, H.A. & Boos, W. (1991) The *malZ* gene of *Escherichia coli*, a member of the maltose regulon, encodes a maltodextrin glucosidase. *J Biol Chem* **266**, 19450-19458.
- Tellinghuisen, J. (2000) Nonlinear Least-Squares Using Microcomputer Data Analysis Programs: KaleidaGraph™ in the Physical Chemistry Teaching Laboratory. *J. Chem. Educ.* **77**, 1233.
- Terada, Y., Fujii, K., Takaha, T. & Okada, S. (1999) *Thermus aquaticus* ATCC 33923 amyloamylase gene cloning and expression and enzyme characterization: production of cycloamylose. *Appl Environ Microbiol* **65**, 910-915.
- Traut, T.W. (1994) The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. *Eur J Biochem* **222**, 9-19.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 22-25.
- Vagin, A.A., Steiner, R.A., Lebedev, A.A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F. & Murshudov, G.N. (2004) REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2184-2195.
- van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Rothlisberger, M. & Witholt, B. (2001) Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology* **147**, 1621-1630.
- van Ooijen, G., van den Burg, H.A., Cornelissen, B.J. & Takken, F.L. (2007) Structure and function of resistance proteins in solanaceous plants. *Annu Rev Phytopathol* **45**, 43-72.
- Vidal-Ingigliardi, D., Richet, E., Danot, O. & Raibaud, O. (1993) A small C-terminal region of the *Escherichia coli* MalT protein contains the DNA-binding domain. *J Biol Chem* **268**, 24527-24530.
- von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* **184**, 99-105.
- Voss, S. & Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* **10**, 975-982.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. & Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-951.
- Walter, T.S., Meier, C., Assenberg, R., Au, K.F., Ren, J., Verma, A., Nettleship, J.E., Owens, R.J., Stuart, D.I. & Grimes, J.M. (2006) Lysine methylation as a routine rescue strategy for protein crystallization. *Structure* **14**, 1617-1622.
- Wang, Z., Li, H., Guan, W., Ling, H., Wang, Z., Mu, T., Shuler, F.D. & Fang, X. (2010) Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility. *Protein Expr Purif* **73**, 203-208.

- Wiesmeyer, H. & Cohn, M. (1960a) The characterization of the pathway of maltose utilization by *Escherichia coli*. I. Purification and physical chemical properties of the enzyme amyloamylase. *Biochim Biophys Acta* **39**, 417-426.
- Wiesmeyer, H. & Cohn, M. (1960b) The characterization of the pathway of maltose utilization by *Escherichia coli*. II. General properties and mechanism of action of amyloamylase. *Biochim Biophys Acta* **39**, 427-439.
- Xia, T., Han, Q., Costanzo, W.V., Zhu, Y., Urbauer, J.L. & Eiteman, M.A. (2015) Accumulation of d-Glucose from Pentoses by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*
- Yamada, K., Ariyoshi, M. & Morikawa, K. (2004) Three-dimensional structural views of branch migration and resolution in DNA homologous recombination. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 130-137.
- Yan, N., Xu, Y. & Shi, Y. (2006) 2:1 Stoichiometry of the CED-4-CED-9 complex and the tetrameric CED-4: insights into the regulation of CED-3 activation. *Cell Cycle* **5**, 31-34.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. & Somero, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Ye, Z., Lich, J.D., Moore, C.B., Duncan, J.A., Williams, K.L. & Ting, J.P. (2008) ATP binding by monarch-1/NLRP12 is critical for its inhibitory function. *Mol Cell Biol* **28**, 1841-1850.
- Yu, X. & Egelman, E.H. (1997) The RecA hexamer is a structural homologue of ring helicases. *Nat Struct Biol* **4**, 101-104.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E. & Hendrickson, W.A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**, 1606-1614.
- Zverlov, V.V., Volkov, I.Y., Velikodvorskaya, G.A. & Schwarz, W.H. (2001) The binding pattern of two carbohydrate-binding modules of laminarinase Lam16A from *Thermotoga neapolitana*: differences in beta-glucan binding within family CBM4. *Microbiology* **147**, 621-629.

Anhang

Tabelle 15: Für die Thermofluor-Experimente gewählte Pufferbedingungen.

Nr.	Well	Puffer	pH	Additiv	NaCl	DTT
1	A1	50 mM Tacsimat	4,0		100 mM	1 mM
2	B1	50 mM Natriumacetat	4,5		100 mM	1 mM
3	C1	50 mM Natriumcitrat	4,6		100 mM	1 mM
4	D1	50 mM Natriumacetat	5,0		100 mM	1 mM
5	E1	50 mM Kaliumphosphat	5,0		100 mM	1 mM
6	F1	50 mM Natriumphosphat	5,0		100 mM	1 mM
7	G1	50 mM Natriumcitrat	5,0		100 mM	1 mM
8	H1	50 mM Tacsimat	5,0		100 mM	1 mM
9	A2	50 mM MES	5,8		100 mM	1 mM
10	B2	50 mM Kaliumphosphat	6,0		100 mM	1 mM
11	C2	50 mM Cacodylat	6,0		100 mM	1 mM
12	D2	50 mM Tacsimat	6,0		100 mM	1 mM
13	E2	50 mM MES/NaOH	6,2		100 mM	1 mM
14	F2	50 mM Cacodylat	6,4		100 mM	1 mM
15	G2	50 mM Natriumphosphat	6,5		100 mM	1 mM
16	H2	50 mM Natriumcacodylat	6,5		100 mM	1 mM
17	A3	50 mM MES/NaOH	6,5		100 mM	1 mM
18	B3	50 mM Kaliumphosphat	7,0		100 mM	1 mM
19	C3	50 mM HEPES/NaOH	7,0		100 mM	1 mM
20	D3	50 mM Tacsimat	7,0		100 mM	1 mM
21	E3	50 mM Ammoniumacetat	7,3		100 mM	1 mM
22	F3	50 mM Natriumphosphat	7,5		100 mM	1 mM
23	G3	50 mM Tris/HCl	7,5		100 mM	1 mM
24	H3	50 mM Imidazol	8,0		100 mM	1 mM
25	A4	50 mM HEPES	8,0		100 mM	1 mM
26	B4	50 mM Tris/HCl	8,0		100 mM	1 mM
27	C4	50 mM Bicin	8,0		100 mM	1 mM
28	D4	50 mM Tacsimat	8,0		100 mM	1 mM
29	E4	50 mM Tris/HCl	8,5		100 mM	1 mM
30	F4	50 mM Bicin	9,0		100 mM	1 mM
31	G4	50 mM CAPSO	9,0		100 mM	1 mM
32	H4	50 mM Tacsimat	9,0		100 mM	1 mM
33	A5	50 mM CAPSO	9,4		100 mM	1 mM
34	B5	50 mM CAPS	10,5		100 mM	1 mM
35	C5	20 mM Tris/HCl	7,5		200 mM	1 mM
36	D5	20 mM Tris/HCl	7,5		500 mM	1 mM
37	E5	20 mM Tris/HCl	7,5	2 mM ATP	100 mM	1 mM
38	F5	20 mM Tris/HCl	7,5	2 mM ADP	100 mM	1 mM
39	G5	20 mM Tris/HCl	7,5	2 mM AMP	100 mM	1 mM
40	H5	20 mM Tris/HCl	7,5	2 mM AMPPNP	100 mM	1 mM
41	A6	20 mM Tris/HCl	7,5	1 % (v/v) Glycerin	100 mM	1 mM
42	B6	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (v/v) Glycerin	100 mM	1 mM
43	C6	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (v/v) Glycerin	100 mM	1 mM
44	D6	20 mM Tris/HCl	7,5	20 % (v/v) Glycerin	100 mM	1 mM
45	E6	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM CaCl ₂	100 mM	1 mM
46	F6	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM MgCl ₂	100 mM	1 mM
47	G6	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM MnCl ₂	100 mM	1 mM
48	H6	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM ZnCl ₂	100 mM	1 mM
49	A7	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM FeCl ₂	100 mM	1 mM
50	B7	20 mM Tris/HCl	7,5	100 mM KCl	100 mM	1 mM

Nr.	Well	Puffer	pH	Additiv	NaCl	DTT
51	C7	20 mM Tris/HCl	7,5	100 mM LiCl	100 mM	1 mM
52	D7	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM NiCl ₂	100 mM	1 mM
53	E7	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Magnesiumacetat	100 mM	1 mM
54	F7	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Calciumacetat	100 mM	1 mM
55	G7	20 mM Tris/HCl	7,5	200 mM Natriumthiocyanat	100 mM	1 mM
56	H7	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Phenol	100 mM	1 mM
57	A8	20 mM Tris/HCl	7,5	3 mM DMSO	100 mM	1 mM
58	B8	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Spermidin	100 mM	1 mM
59	C8	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Urea	100 mM	1 mM
60	D8	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (w/v) PEG400	100 mM	1 mM
61	E8	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (w/v) PEG400	100 mM	1 mM
62	F8	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (w/v) Glucose	100 mM	1 mM
63	G8	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (w/v) Glucose	100 mM	1 mM
64	H8	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (w/v) Galactose	100 mM	1 mM
65	A9	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (w/v) Galactose	100 mM	1 mM
66	B9	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (w/v) Mannose	100 mM	1 mM
67	C9	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (w/v) Mannose	100 mM	1 mM
68	D9	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (w/v) Fructose	100 mM	1 mM
69	E9	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (w/v) Fructose	100 mM	1 mM
70	F9	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (w/v) Trehalose	100 mM	1 mM
71	G9	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (w/v) Trehalose	100 mM	1 mM
72	H9	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (w/v) Maltose	100 mM	1 mM
73	A10	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (w/v) Maltose	100 mM	1 mM
74	B10	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (w/v) Saccharose	100 mM	1 mM
75	C10	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (w/v) Saccharose	100 mM	1 mM
76	D10	20 mM Tris/HCl	7,5	0,5 % (w/v) n-Octyl-β-D-Glycosid	100 mM	1 mM
77	E10	20 mM Tris/HCl	7,5	0,5 % (w/v) n-Dodecyl-β-D-Maltosid	100 mM	1 mM
78	F10	20 mM Tris/HCl	7,5	5 % (w/v) Betain	100 mM	1 mM
79	G10	20 mM Tris/HCl	7,5	10 % (w/v) Betain	100 mM	1 mM
80	H10	20 mM Tris/HCl	7,5	100 mM Glycin	100 mM	1 mM
81	A11	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Alanin	100 mM	1 mM
82	B11	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Serin	100 mM	1 mM
83	C11	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Methionin	100 mM	1 mM
84	D11	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Prolin	100 mM	1 mM
85	E11	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Arginin	100 mM	1 mM
86	F11	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Phenylalanin	100 mM	1 mM
87	G11	20 mM Tris/HCl	7,5	5 mM FAD	100 mM	1 mM
88	H11	20 mM Tris/HCl	7,5	5 mM NADH	100 mM	1 mM
89	A12	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Cholsäure	100 mM	1 mM
90	B12	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM CHAPS	100 mM	1 mM
91	C12	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Vanillinsäure	100 mM	1 mM
92	D12	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM 4-Hydroxybenzoesäure	100 mM	1 mM
93	E12	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Benzamidin	100 mM	1 mM
94	F12	20 mM Tris/HCl	7,5	10 mM Maltotriose	100 mM	1 mM
95	G12	20 mM Tris/HCl	7,5	225 mM Saccharose	150 mM	1 mM
96	H12	20 mM Tris/HCl	7,5	7,5 % (v/v) Glycerin	150 mM	1 mM

Quellcode der mit Software Turbo Pascal 7.0 (Borland,Austin, TX, USA) programmierten MalQ-Simulation:

```
PROGRAM MalQ_Assay(Input, Output);

CONST
Ende = 1000000 { eine Million };
Trennzeile = '=====';

VAR
  AkzeptorWeight, DonorWeight, Maltodex, MaltodexSumme: Array[1..50] of LongInt;
  Fehler, Zucker, Zuckeranzahl, GlyBndgAnfang, GlyBndgGlGew, Glukoseanzahl, Maltoseanzahl, Maltotrioseanzahl: Integer;
  Simulation: Byte;
  Datei: Text;

PROCEDURE InitAllgemein;
VAR i: Byte; h: Integer;
BEGIN
  FOR i:=1 TO 30 DO AkzeptorWeight[i]:=1;
  FOR i:= 31 TO 50 DO AkzeptorWeight[i]:=0;
  DonorWeight[1]:=0;
  FOR i:=2 TO 50 DO DonorWeight[i]:=1;
  Fehler := 0
END { Procedure initAllgemein };

PROCEDURE InitReaktion;
VAR i,h: Byte;
BEGIN
  Maltodex[1] := 0;
  Maltodex[2] := 1000;
  Maltodex[3] := 0;
  Maltodex[4] := 0;
  Maltodex[5] := 0;
  Maltodex[6] := 0;
  Maltodex[7] := 0;
  Maltodex[8] := 0;
  Maltodex[9] := 0;
  For i:= 10 TO 50 DO Maltodex[i] :=0;
  zuckeranzahl:=0;
  glukoseanzahl:=maltodex[1];
  maltoseanzahl:=maltodex[2];
  maltotrioseanzahl:=maltodex[3];
  FOR i:= 1 TO 50 DO zuckeranzahl:=zuckeranzahl+maltodex[i];
  glyBndgAnfang := 0;
  FOR i:=1 TO 50 DO
  BEGIN
    h := (i-1)* Maltodex[i];
    glyBndgAnfang := glyBndgAnfang+h;
  END { For i := 1 to 50 };
END; { Procedure InitReaktion }
```

```

PROCEDURE Reaktion;
VAR { möglichst viele Variablen LOKAL definiert, weil Zugriff schneller wird }
  AkzeptorWeighted, AkzeptorWeightedSum, DonorWeighted, DonorWeightedSum: ARRAY[1..50] OF LongInt;
  Runde, Zaehler1, Zaehler2, AkzeptorGewichtsumme, DonorGewichtsumme, groesserGlu, nurGlu: LongInt;
  a, b, d, i, j, x, y, z, Ergebnis, Anzahl, Reaktionen: Integer;
  h: Byte;
BEGIN { Procedure Reaktion }
  Runde := 0;
  REPEAT { Until Runde >= Ende }
  FOR h := 1 TO 50 DO
  BEGIN
    MaltodexSumme[h] := 0;
    DonorWeightedSum[h] := 0;
    AkzeptorWeightedSum[h] := 0
  END { For h := 1 to 50 };
  MaltodexSumme[1] := Maltodex[1];
  FOR h := 2 TO 50
  DO MaltodexSumme[h] := MaltodexSumme[h-1] + Maltodex[h];
  DonorGewichtsumme := 0;
  AkzeptorGewichtsumme := 0;
  FOR h := 1 TO 50 DO
  BEGIN
    DonorWeighted[h] := Maltodex[h] * DonorWeight[h];
    AkzeptorWeighted[h] := Maltodex[h] * AkzeptorWeight[h];
  END { For h := 1 to 50 };
  DonorWeightedSum[1] := DonorWeighted[1];
  AkzeptorWeightedSum[1] := AkzeptorWeighted[1];
  DonorGewichtsumme := DonorWeighted[1];
  AkzeptorGewichtsumme := AkzeptorWeighted[1];
  FOR h := 2 TO 50 DO
  BEGIN
    DonorWeightedSum[h] := DonorWeightedSum[h-1] + DonorWeighted[h];
    DonorGewichtsumme := DonorGewichtsumme + DonorWeighted[h];
    AkzeptorWeightedSum[h] := AkzeptorWeightedSum[h-1] + AkzeptorWeighted[h];
    AkzeptorGewichtsumme := AkzeptorGewichtsumme + AkzeptorWeighted[h];
  END { For h := 2 to 50 };
  a := Random(AkzeptorGewichtsumme-1)+1;
  x := 0;
  FOR b := 50 DOWNTO 1 DO
  BEGIN
    IF a <= AkzeptorWeightedSum[b]
    THEN x := b;
  END { For b :=50 downto 1 };
  Zaehler1 := 0;
  REPEAT { UNTIL (d <> a) AND (y > 1) }
  Inc(Zaehler1);
  Zaehler2 := 0;
  REPEAT
  Inc(Zaehler2);
  d := 0;
  groesserGlu := 0;
  nurGlu := DonorWeightedSum[1];

```

```

groesserGlu := DonorGewichtsumme - nurGlu;
d := random(groesserGlu-1)+1;
d := d + nurGlu;
IF zaehler2 >= 10 THEN {leite Fehlerausgabe und Programmabbruch ein}
BEGIN
  Writeln(Trennzeile);
  Writeln('Finde keinen Donor (d=',d,')');
  Writeln('Runde = ',Runde);
  Writeln('nurGlu = ',nurGlu);
  Writeln('groesser Glu = ',groesserGlu);
  Writeln('Zaehler 2: ',zaehler2);
  Writeln('DonorGewichtsumme = ',DonorGewichtsumme);
  Write('AkzeptorGewichtsumme = ',AkzeptorGewichtsumme);
  Readln;
  d := DonorWeightedSum[1]+1;
  Runde := 1000000;
  a := d - 1;
END { Fehler durch Zaehler2 >= 10 }
UNTIL d > DonorWeightedSum[1];
y := 0;
FOR b := 50 DOWNT0 1 DO
BEGIN
  IF d <= DonorWeightedSum[b]
  THEN y := b;
END { For b := 50 downto 1 };
IF Zaehler1 > 10 THEN {leite Fehlerausgabe und Programmabbruch ein}
BEGIN
  Writeln(Trennzeile);
  Writeln('Runde = ',Runde);
  Writeln('nurGlu = ',nurGlu);
  Writeln('groesser Glu = ',groesserGlu);
  Writeln('A: ',a);
  Writeln('Y: ',y);
  Writeln('D: ',d);
  Writeln('X: ',x);
  Writeln('Zahler1: ',zaehler1);
  Writeln('DonorGewichtsumme = ',DonorGewichtsumme);
  Write('AkzeptorGewichtsumme = ',AkzeptorGewichtsumme);
  a := d - 1;
  y := 2;
  Readln
END { Fehler durch Zaehler1 > 10 };
UNTIL (d <> a) AND (y > 1);
z := Random(100)+1;
If (y >= 8)
THEN CASE z OF
  1.. 10: z := 1;
  11.. 20: z := 2;
  21.. 80: z := random(y-5)+3;
  81.. 90: z := (y-2);
  91..100: z := (y-1)
END { y = 8 & CASE z }

```

```

ELSE IF (y = 7)
  THEN CASE z OF
    1.. 16: z:=6;
    17.. 33: z:=5;
    34.. 50: z:=4;
    51.. 67: z:=3;
    68.. 84: z:=2;
    85..100: z:=1
  END; { y = 7 & Case z }
ELSE IF (y = 6)
  THEN CASE z OF
    1.. 20: z:=1;
    21.. 40: z:=2;
    41.. 60: z:=3;
    61.. 80: z:=4;
    81..100: z:=5;
  END { y = 6 & Case z }
ELSE IF (y = 5)
  THEN CASE z OF
    1.. 25: z:=4;
    26.. 50: z:=3;
    51.. 75: z:=2;
    76..100: z:=1
  END { y = 5 & CASE z }
ELSE IF (y = 4)
  THEN CASE z OF
    1.. 33: z:=1;
    34.. 67: z:=2;
    68..100: z:=3
  END { y = 4 & CASE z }
ELSE IF (y = 3)
  THEN IF (z < 51)
    THEN z := 1
    ELSE z := 2
  END
ELSE IF (y = 2)
  THEN z := 1
ELSE BEGIN
  { Kann der Fall y = 1 oder 0 eintreten ??? }
  END { y <= 1 };
Ergebnis := x + y;
Ergebnis := Ergebnis - z;
IF (Ergebnis < 50) THEN
BEGIN {Simulation der stattfindenden Reaktion}
Inc(Maltodex[Ergebnis]);
Inc(Maltodex[z]);
Dec(Maltodex[x]);
Dec(Maltodex[y]);
END { Then: Ergebnis < 50 }
ELSE BEGIN { Ergebnis >= 50 }
inc(fehler);
dec(runde);
END { Else: Ergebnis >= 50 };

```

```
inc(runde);
UNTIL Runde >= Ende;
glyBndgGIGew:=0;
FOR i := 1 TO 50 DO
BEGIN
h := 0;
h := (i-1)*Maltodex[i];
glyBndgGIGew := glyBndgGIGew + h;
END
END {Procedure Reaktion };

PROCEDURE Ausgabe; {nur in Datei nicht mehr auf Bildschirm }
VAR i: Byte;
BEGIN
Write(Datei, 'Gleichgewicht Nummer ',simulation,': ');
FOR i:=1 TO 50 DO
BEGIN
Write(Datei, Maltodex[i]);
Write(Datei, ' ');
END;
WriteLn(Datei);
Write(Datei, 'Donorgewichte: ');
FOR i:=1 TO 50 DO
BEGIN
Write(Datei, DonorWeight[i]);
Write(Datei, ' ');
END;
WriteLn(Datei);
Write(Datei, 'Akzeptorgewichte: ');
FOR i:=1 TO 50 DO
BEGIN
Write(Datei, AkzeptorWeight[i]);
Write(Datei, ' ');
END;
WriteLn(Datei);
END { Procedure Ausgabe };

BEGIN {Hauptprogramm}
Randomize;
InitAllgemein;
Assign(Datei, 'MalQ_001.txt');
ReWrite(Datei);
For simulation:=1 TO 5 DO
BEGIN
InitReaktion;
Reaktion;
Ausgabe;
END; {Anzahl der Simulationen}
Close(Datei);
END. {Hauptprogramm}
```

Mit der Software MS Office Excel 2007 (Microsoft, Redmont, WA, USA) erstellte Kreuztabelle zur Bestimmung der Maltodextringleichgewichtskonzentrationen:

Mögliche MaltQ Reaktionen											
Tabelle der möglichen MaltQ Reaktionen für Substratkettenlängen bis zu 10 Glucose Einheiten und ihre Konzentrationen zu Beginn der Reaktion mit 100% Maltotriose als Substrat											
rel. Konz.	Donor Länge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.00	2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.00	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	16	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	17	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.00	18	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

1. Simulation														
Donor Länge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	Nach der 1. Simulation:	Länge	Konzentration	Konz. gl. Bndg.
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Glucose	1	0.25	0.00
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltose	2	0.25	0.00
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltotriose	3	0.00	0.00
4	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltotetraose	4	0.25	0.75
5	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltopentaose	5	0.25	1.00
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltohexaose	6	0.00	0.00
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltoseptaose	7	0.00	0.00
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltooctaose	8	0.00	0.00
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltononaose	9	0.00	0.00
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltodecaose	10	0.00	0.00
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltoundecaose	11	0.00	0.00
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltododecaose	12	0.00	0.00
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltotridecaose	13	0.00	0.00
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltotetradecaose	14	0.00	0.00
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltopentadecaose	15	0.00	0.00
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltohexadecaose	16	0.00	0.00
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltoseptaadecaose	17	0.00	0.00
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Maltooctaadecaose	18	0.00	0.00
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		19	1.00	2.00

2. Simulation

Donor	Nach der 2. Simulation:										Konz.		
Länge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	Länge	Konzentration	gl. Bndg.
1	0.06	0.06	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0	0.35	0.00
2	0.06	0.06	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0	0.15	0.15
3	0.06	0.06	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0	0.14	0.28
4	0	0	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0	0.10	0.30
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.11	0.43
6	0.06	0.06	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0	0.08	0.38
7	0.06	0.06	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0	0.04	0.22
8	0.06	0.06	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0	0.03	0.18
9	0.06	0.06	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0	0.01	0.06
10	0.06	0.06	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0	0.00	0.00
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
Akzeptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	2.00

3. Simulation

Donor	Nach der 3. Simulation:										Konz.		
Länge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	Länge	Konzentration	gl. Bndg.
1	0.13	0.05	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0.39	0.00
2	0.13	0.05	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0.16	0.16
3	0.05	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0.12	0.24
4	0.05	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0.09	0.28
5	0.05	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0.07	0.30
6	0.05	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0.29
7	0.04	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0.04	0.24
8	0.04	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0.19
9	0.04	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0.13
10	0.04	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0.08
11	0.03	0.01	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.05
12	0.03	0.01	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.02
13	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.01
14	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
15	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
Akzeptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	2.00

6. Simulation

Donor	Nach der 6. Simulation:										Konz.		
Länge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	Länge	Konzentration	gl. Bndg.
1	0.2	0.07	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	1	0.45	0.00
2	0.2	0.07	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	2	0.15	0.15
3	0.07	0.03	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	3	0.10	0.21
4	0.07	0.03	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	4	0.07	0.22
5	0.05	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	5	0.05	0.22
6	0.05	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	6	0.04	0.20
7	0.03	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.03	0.17
8	0.03	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.02	0.15
9	0.03	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.01	0.12
10	0.03	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.01	0.09
11	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.01	0.05
12	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0.00	0.03
13	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0.00	0.02
14	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.00	0.01
15	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0.00	0.01
16	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0.00	0.00
17	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0.00	0.00
18	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0.00	0.00
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
121	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
129	0												

8. Simulation

Donor	Nach der 8. Simulation:										Konz.		
Länge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	Länge	Konzentration	gl. Bndg.
1	0.22	0.08	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	1	0.48	0.00
2	0.22	0.08	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	2	0.16	0.16
3	0.08	0.03	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	3	0.10	0.20
4	0.08	0.03	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	4	0.07	0.21
5	0.05	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	5	0.05	0.20
6	0.05	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	6	0.04	0.18
7	0.03	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.03	0.15
8	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.02	0.12
9	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.01	0.10
10	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.01	0.07
11	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.00	0.04
12	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0.00	0.02
13	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0.00	0.01
14	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.00	0.00
15	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0.00	0.00
16	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0.00	0.00
17	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0.00	0.00
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0.00	0.00
Akzeptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0.96	1.48

9. Simulation

Donor	Nach der 9. Simulation:										Konz.		
Länge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	Länge	Konzentration	gl. Bndg.
1	0.24	0.08	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	1	0.49	0.00
2	0.24	0.08	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	2	0.16	0.16
3	0.08	0.03	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	3	0.10	0.20
4	0.08	0.03	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	4	0.07	0.21
5	0.05	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	5	0.05	0.19
6	0.05	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	6	0.03	0.17
7	0.03	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.02	0.14
8	0.03	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.02	0.12
9	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.01	0.09
10	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.01	0.07
11	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.00	0.04
12	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0.00	0.02
13	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0.00	0.01
14	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.00	0.01
15	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0.00	0.00
16	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0.00	0.00
17	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0.00	0.00
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0.00	0.00
Akzeptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0.96	1.42

10. Simulation

Donor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	Länge	Konzentration	Konz.
Länge	1	0.25	0.08	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
	2	0.25	0.08	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.16	0.16
	3	0.08	0.03	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0.10	0.20
	4	0.08	0.03	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0.07	0.20
	5	0.05	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0.05	0.19
	6	0.05	0.02	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	0.03	0.16
	7	0.03	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0.14
	8	0.03	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0.11
	9	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0.08
akzeptor	10	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0.06
	11	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.03
	12	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.02
	13	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.01
	14	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.01
	15	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
	16	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
	17	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
												0.97	1.37

Nach der 10. Simulation:

Glucose
Maltose
Maltotriose
Maltotetraose
Maltopentaose
Maltohexaose
Maltoseptaose
Maltooctaose
Maltotriosaose
Maltodecaose
Maltoundecaose
Maltododecaose
Maltotridecaose
Maltotetradecaose
Maltopentadecaose
Maltohexadecaose
Maltoseptaadecaose
Maltooctaadecaose

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Arne Skerra danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem exzellent ausgestatteten Lehrstuhl unter seinen hilfreichen Ratschlägen anzufertigen.

Ich danke insbesondere Dr. André Schiefner für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine ständige und wertvolle Diskussionsbereitschaft, die mich auf meinem Weg zum wissenschaftlichen Arbeiten ein entscheidendes Stück vorangebracht hat.

Ich danke allen Mitarbeitern und Ehemaligen des Lehrstuhls für Biologische Chemie der Technischen Universität München für ihre Kollegialität und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen langjährigen Mitstreitern Joscha Breibeck und Nadine Kuhn für die gemeinsame Zeit inner- und außerhalb des Labors.

Prof. Dr. Winfried Boos danke ich für seine wissenschaftlichen Anregungen.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung bzw. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel "Strukturelle Charakterisierung von katalytischen und regulatorischen Proteinen des *Escherichia Coli* Maltose/Maltodextrin-Systems" am Lehrstuhl für Biologische Chemie unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. Arne Skerra ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Simon Weiß

Freising, den 15. Mai 2015