

Institut für Organische Chemie und Biochemie der
Technischen Universität München

**Kinetische Untersuchungen von Enzymen der
Tetrahydrobiopterin-, Riboflavin- und Folsäure-
Biosynthesewege**

Nicholas Schramek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
3. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 12.04.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 05.07.2001 angenommen.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Januar 1997 bis Dezember 2000 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Dr. A Bacher danke ich sehr herzlich für die gewährte Unterstützung, die Betreuung und Förderung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Markus Gütlich für die ausgezeichnete Einführung in die Arbeitstechniken und seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ebenso herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Andreas Bracher für die Einführung in die Stopped-Flow und Quenched-Flow Techniken sowie manch hilfreiche Kinetik-Diskussion.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Wolfgang Eisenreich, Frau Dipl.-Chem. Petra Adam und Herrn Dipl.-Chem. Stefan Hecht, die mir bei meinen NMR-Experimenten immer hilfreich zur Seite standen.

Frau Dr. Sabine Eberhart und Herrn Dr. Stefan Herz möchte ich für die Einführung in die DNA-Sequenzierung herzlich danken.

Herrn Dr. Klaus Kis möchte ich für zahlreiche, wertvolle Diskussionen danken.

Herrn Dipl.-Biol. Johannes Kaiser möchte ich für die Zusammenarbeit bei den GTP Cyclohydrolase II Experimenten danken.

Frau Stephanie Dernbach und Frau Ulrike Herrmann danke ich für die Hilfe bei der Literaturbeschaffung.

Herrn Fritz Wendling danke ich für die Unterstützung bei vielen kleinen und großen Computerproblemen.

Meinen Laborkollegen Frau Dr. Anja Herrmann, Frau Heike Bochtler-Hock, Frau Dipl.-Chem. Susanne Schiffmann, Frau Dr. Karin Schott, Herr Leb.-Chem. Norbert Fuchsbauer und Herrn Christoph Graßberger danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor.

Bei allen meinen Kollegen im Arbeitskreis Bacher möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Für Lisa

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Biosynthese von Tetrahydrobiopterin	1
1.2 Die Biosynthese von Tetrahydrofolat	3
1.3 Die Biosynthese von Riboflavin	5
1.4 Die GTP Cyclohydrolasen	6
1.4.1 Die GTP Cyclohydrolase I aus <i>E. coli</i>	7
1.4.2 Die GTP Cyclohydrolase II aus <i>E. coli</i>	9
1.5 Die 6-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase	10
2. Material und Methoden	13
2.1 Geräte	13
2.2 Chemikalien und Enzyme	15
2.3 Bakterienstämme und Expressionsvektoren	16
2.4 Stammhaltung und proteinchemische Methoden	16
2.4.1 Kulturmedien	16
2.4.2 Haltung der Stammkulturen	17
2.4.3 Anzucht von Bakterien	17
2.4.4 Fermentation	18
2.4.4.1 Fermentation im Schüttelkolben	18
2.4.4.2 Fermentation im 2 l Fermenter	18
2.4.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	20
2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration	22
2.4.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivität	23
2.4.7.1 Bestimmung der GTP Cyclohydrolase I Aktivität	23
2.4.7.2 Bestimmung der GTP Cyclohydrolase II Aktivität	24
2.4.7.3 Bestimmung der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase Aktivität	26
2.4.8 Reinigung der GTP Cyclohydrolase I aus <i>E. coli</i>	27
2.4.9 Reinigung der GTP Cyclohydrolase II aus <i>E. coli</i>	29
2.4.10 Reinigung der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase	31

2.5 Molekularbiologische Methoden	32
2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	32
2.5.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	33
2.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen	34
2.5.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA	34
2.5.3.2 Plasmidisolierung mittels Anionenaustausch-Chromatographie	34
2.5.4 Reinigung isolierter DNA	36
2.5.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen	37
2.5.6 Agarosegelelektrophorese von DNA	37
2.5.7 Restriktionsanalyse	38
2.5.8 Dephosphorylierung von DNA	38
2.5.9 Ligierung von DNA-Fragmenten	39
2.5.10 Auffüllen von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase	39
2.5.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	39
2.5.12 cDNA-Erststrang-Synthese	41
2.5.13 Polymerase-Kettenreaktion	41
2.5.14 DNA-Sequenzierung	42
2.6 Enzymatische Synthesen	44
2.6.1 Synthese von [3- ¹³ C]Ribulose-5-Phosphat	44
2.6.2 Synthese von [3'- ¹³ C]Guanosintriphosphat	44
2.7 Kinetische Messungen	45
2.7.1 Quenched-Flow Experimente	45
2.7.2 Stopped-Flow Experimente	47
3. Ergebnisse	50
3.1 Die GTP Cyclohydrolase I	50
3.1.1 Reinigung der GTP Cyclohydrolase I aus <i>E. coli</i>	50
3.1.2 Untersuchungen zum Katalysezyklus der GTP Cyclohydrolase I	52
3.1.3 Eigenschaften der GTP Cyclohydrolase I aus <i>Aquifex aeolicus</i>	54
3.1.3.1 Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität	55
3.1.3.2 Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Aktivität	56

3.1.4 Enzymatische Eigenschaften der GTP Cyclohydrolase I	
E111Q/V182M	56
3.1.5 Bestimmung des Gleichgewichtes im ersten Schritt der GTP	
Cyclohydrolase I Reaktion	58
3.1.6 Quenched-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase I aus <i>E. coli</i>	59
3.1.7 Stopped-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase I aus <i>E. coli</i>	69
3.1.7.1 Stopped-Flow Experimente mit H179A GTP Cyclohydrolase I	70
3.1.7.2 Stopped-Flow Experimente mit Wildtyp GTP Cyclohydrolase I	74
3.1.7.3 pH-Abhängigkeit der GTP Cyclohydrolase I Reaktion	85
3.1.7.4 Isotopeneffekte der GTP Cyclohydrolase I Reaktion	91
3.1.8 Umsetzung von [1',2',3',4',5',8-¹³C₆, 7-¹⁵N₁]GTP mit GTP	
Cyclohydrolase I	93
3.1.9 Die Rolle des Zink in der GTP Cyclohydrolase I Reaktion	96
3.2 Die GTP Cyclohydrolase II aus <i>E. coli</i>	98
3.2.1 Reinigung der GTP Cyclohydrolase II	98
3.2.2 Quenched-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase II	98
3.2.3 Stopped-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase II	102
3.3 Die Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase	109
3.3.1 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Pyruvoyltetra-	
hydropterin-Synthase aus Maus	109
3.3.1.1 Stopped-Flow Experimente mit Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase	109
3.3.1.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen zum Mechanismus der	
Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase	115
3.3.1.2.1 Enzymatische Synthese von [3'- ¹³ C]Guanosintriphosphat	116
3.3.1.2.2 Umsetzung von [1- ¹³ C]Dihydroneopterintriphosphat mit PTPS	118
3.3.2 Die Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Huhn	120
3.3.2.1 Klonierung der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase	120
3.3.2.2 Expression und Reinigung der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase	122
3.3.2.3 Hybridisierungsexperimente an Hühner-Retina	122
4. Diskussion	124
4.1 Die GTP Cyclohydrolase I	124

4.2 Die GTP Cyclohydrolase II	129
4.3 Die Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase	132
5. Zusammenfassung	135
6. Literaturverzeichnis	138
Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

α KG	α -Ketoglutarat
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ADA	Adenosin-Deaminase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DTE	Dithioerithrol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
hGTP	2-Amino-5-formylamino-6-(ribofuranosyl-1'-amino)-4(3H)- pyrimidinon-5'-triphosphat (hydrolisiertes GTP)
MBP	Maltose bindendes Protein (<i>E. coli</i>)
ME	β -Mercaptoethanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NADH	β -Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	β -Nicotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat
NH ₂ TP	Dihydroneopterintriphosphat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
pABA	para-Aminobenzoesäure
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PEP	2-Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Abkürzungsverzeichnis

PPH ₄	Pyruvoyltetrahydropterin
PRI	Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerase
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PTPS	Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	1,1,1',1'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
wt	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Die Biosynthese von Tetrahydrobiopterin

Tetrahydrobiopterin dient in tierischen Zellen als Cofaktor der aromatischen Aminosäurehydroxylasen [1-3]. Tetrahydrobiopterin ist daher essentiell für die Biosynthese vieler Neurotransmitter. Am Beginn der Biosynthese der Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin stehen die Monooxygenasen für Phenylalanin [4, 5] und Tyrosin [6, 7]. Die Monooxygenase für Tryptophan führt zur Bildung von Serotonin (5-Hydroxytryptamin), einem weiteren Neurotransmitter des zentralen Nervensystems [8, 9].

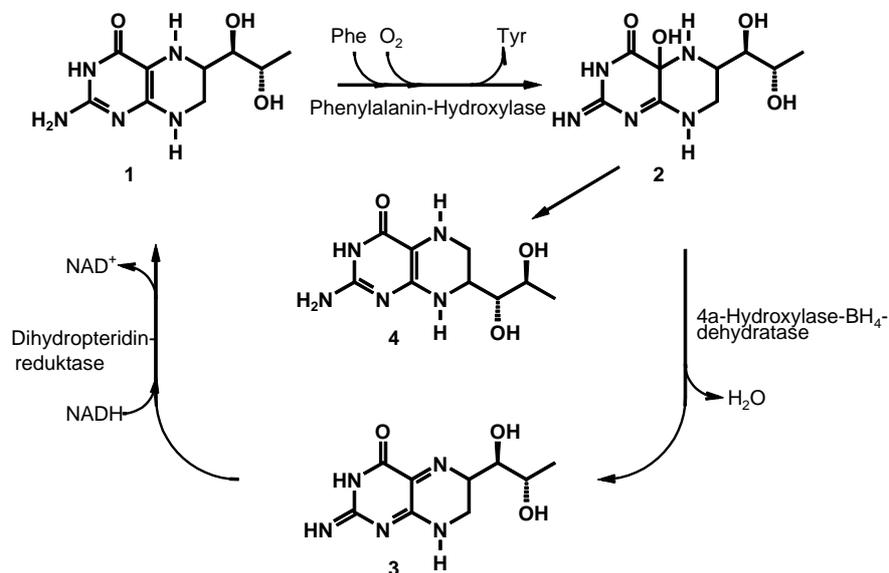


Abb. 1: Regenerationszyklus von Tetrahydrobiopterin. Tetrahydrobiopterin (1), 4a-Hydroxytetrahydrobiopterin (2), chinoides Dihydrobiopterin (3), 7-Tetrahydrobiopterin (4).

Bei der Reaktion der Monooxygenasen aromatischer Aminosäuren dient Tetrahydrobiopterin (1) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff als Elektronendonator für die Hydroxylierung (Abb. 1). Aus dem hierbei entstandenen 4a-Hydroxytetrahydrobiopterin (2) wird durch die 4a-Hydroxytetrahydrobiopterin-Dehydratase Wasser abgespalten [10]. Durch anschließende Reduktion von chinoidem Dihydrobiopterin (3) durch die NADH-abhängige Dihydropteridin-Reduktase wird Tetrahydrobiopterin regeneriert [11-13]. Fehlt die 4a-Hydroxytetrahydrobiopterin-Dehydratase Aktivität, so entsteht über eine nicht-enzymatische Reorganisation des Pyrazin-Rings 7-Tetrahydrobiopterin (4), welches einen sehr wirkungsvollen Inhibitor der Phenylalanin-Hydroxylase darstellt [14, 15].

Tetrahydrobiopterin ist außerdem essentieller Cofaktor der NO-Synthase [16-20]. Die von NADPH, FAD, FMN, Calmodulin, Häm und Tetrahydrobiopterin abhängige NO-Synthase katalysiert die Bildung von NO aus Arginin. Bis heute ist nicht genau bekannt, welche Rolle dem Cofaktor Tetrahydrobiopterin bei der Reaktion der NO-Synthase zukommt [21]. Die NO-Synthase stellt ein Dimer aus zwei gleichen, etwa 125 kDa großen Monomeren dar [22, 23]. Die Dimerisierung des Enzyms findet nur in Anwesenheit von Tetrahydrobiopterin statt. Bindet Tetrahydrobiopterin an ein Monomer, so ändert sich die Raumstruktur des Enzyms [22]. Dies führt zu einer Bindung des Substrates Arginin.

Tetrahydrobiopterin wird außerdem als Cofaktor für die Spaltung von Glycidethern benötigt [24].

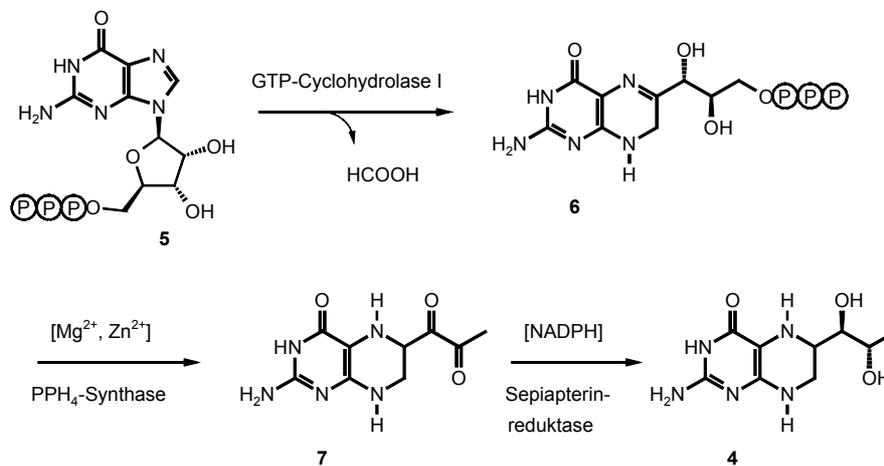


Abb. 2: Biosynthese von Tetrahydrobiopterin (4). GTP (5), Dihydroneopterintriphosphat (NH₂TP, 6), Pyruvoyltetrahydropterin (7).

Die Biosynthese von Tetrahydrobiopterin (Abb. 2) beginnt mit der Umsetzung von GTP (5) zu Dihydroneopterintriphosphat (6) durch die GTP Cyclohydrolase I [25-28]. Die Kristallstruktur der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* wurde 1994 gelöst [29, 30]. Im weiteren wird durch die Mg²⁺- und Zn²⁺-abhängige Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase (PTPS) Dihydroneopterintriphosphat (6) zu Pyruvoyltetrahydropterin (7) umgesetzt [31-33]. Die Kristallstruktur der PTPS aus Ratte wurde 1994 gelöst [34]. Die NADPH-abhängige Sepiapterin-Reduktase katalysiert schließlich durch die schrittweise Reduktion der Carbonylgruppen in der Seitenkette die Reaktion von Pyruvoyltetrahydropterin (7) zu Tetrahydrobiopterin (4) [2, 35, 36]. Die Struktur der Sepiapterin-Reduktase aus Maus wurde 1997 von Auerbach *et al.* gelöst [37].

1.2 Die Biosynthese von Tetrahydrofolat

Die Biosynthesewege von Tetrahydrobiopterin und Tetrahydrofolat verzweigen nach der gemeinsamen Vorstufe Dihydroneopterintriphosphat. Säuger produzieren aus Dihydroneopterintriphosphat Tetrahydrobiopterin, während in Bakterien und Pflanzen Dihydroneopterintriphosphat das erste Intermediat in der Folsäure-Biosynthese darstellt [38]. Folsäure ist für Säugetiere ein Vitamin. Sie sind jedoch in der Lage, Folat über Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat zu reduzieren. Protozoen wie die verschiedenen *Plasmodium*-Arten besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur *de novo* Synthese von Folsäure, worauf die Behandlung von Patienten mit Inhibitoren der Folat-Biosynthese bei Erkrankungen wie Malaria beruht.

Tetrahydrofolat ist Cofaktor zahlreicher Enzyme im C1-Stoffwechsel. So katalysiert die Thymidylat-Synthase die reduktive Methylierung von 2'-Desoxyuridylat zu Thymidylat. Cofaktor für diese Reaktion ist 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat. Dabei wird Tetrahydrofolat zu Dihydrofolat reduziert. Diese Reaktion unterscheidet sich von allen anderen C1-Übertragungsreaktionen durch die gleichzeitige Übertragung von Wasserstoff vom Cofaktor auf das Substrat. Das gebildete Dihydrofolat wird durch die Reaktion der Dihydrofolat-Reduktase zu Tetrahydrofolat reduziert [38]. Viele Pflanzen und Protozoen besitzen eine bifunktionelles Enzym, welches die Aktivität der Dihydrofolat-Reduktase und Thymidylat-Synthase trägt [39-43].

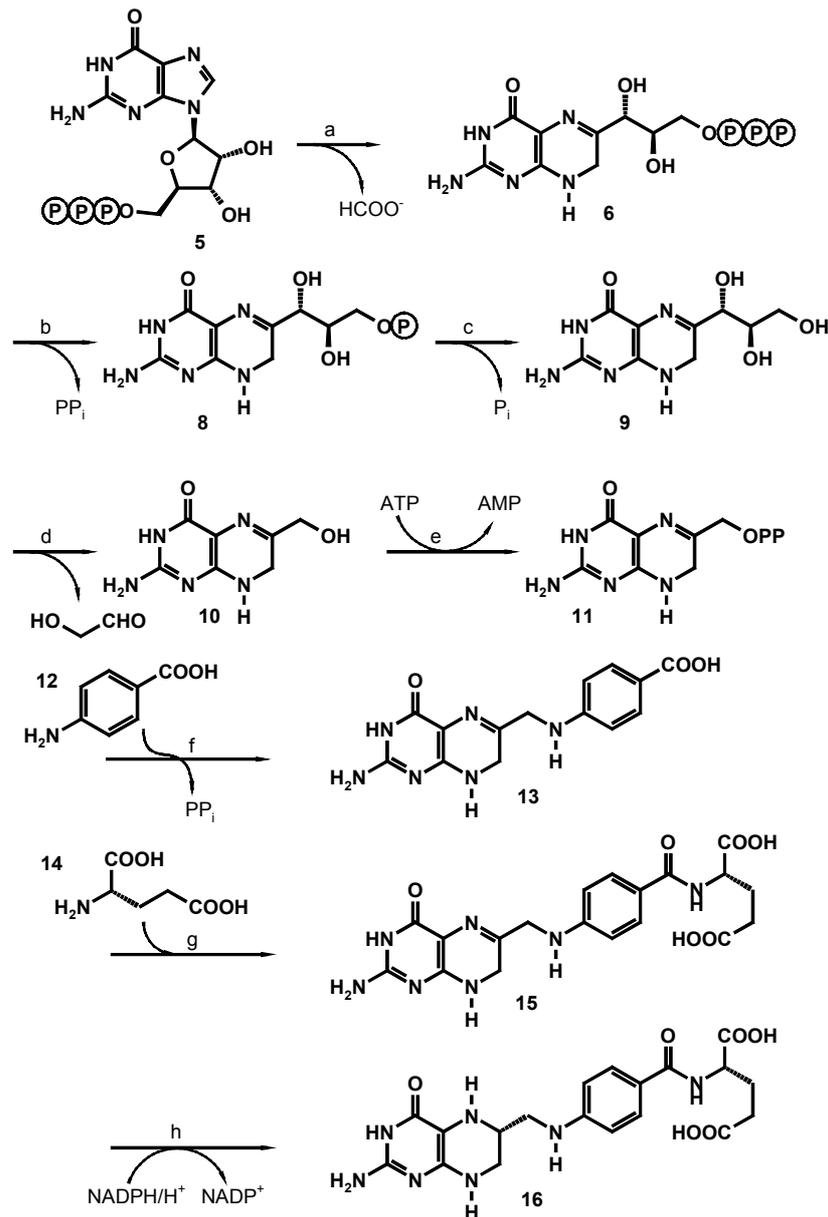


Abb. 3: Biosynthese von Tetrahydrofolat. GTP (5), Dihydroneopterintriphosphat (6), Dihydroneopterinphosphat (8), Dihydroneopterin (9), 6-Hydroxymethyldihydroneopterin (10), 6-Hydroxymethyldihydroneopterin-diphosphat (11), Dihydropteroinsäure (13), Dihydrofolsäure (15), Tetrahydrofolsäure (16). a: GTP Cyclohydrolase I; b, c: Phosphatasen; d: Dihydroneopterin-Aldolase; e: Hydroxymethyldihydropterin-Pyrophosphokinase; f: Dihydropteroat-Synthase; g: 7,8-Dihydrofolat-Synthase; h: Dihydrofolat-Reduktase.

Die Biosynthese von Tetrahydrofolat beginnt analog der Biosynthese von Tetrahydrobiopterin mit der Bildung von 7,8-Dihydroneopterintriphosphat (6) aus GTP (5) durch die GTP Cyclohydrolase I (Abb. 3). Die Dephosphorylierung von 7,8-Dihydroneopterintriphosphat (6) im nächsten Schritt wird vermutlich durch unspezifische Phosphatasen katalysiert. 7,8-Dihydroneopterin (9) wird durch die Dihydroneopterin-Aldolase in einer Retroaldolreaktion zu Glykolaldehyd und 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (10) umgesetzt. Die nachfolgende Aktivierung der Seitenkette erfolgt durch die 6-

Hydroxymethyldihydropterin-Pyrophosphokinase. Die Kopplung des so entstandenen 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin-1'-diphosphats (**11**) mit p-Aminobenzoensäure (**12**) zu Dihydropterinsäure (**13**) wird durch die Dihydropteroat-Synthase katalysiert. Die nachfolgende Kopplung mit Glutamat (**14**) zu Dihydrofolsäure (**15**) erfolgt durch die 7,8-Dihydrofolat-Synthase. Im letzten Schritt wird Dihydrofolsäure (**15**) durch die NADPH-abhängige Dihydrofolatreduktase zu Tetrahydrofolat (**16**) reduziert.

1.3 Die Biosynthese von Riboflavin

Riboflavin, dessen Isolierung erstmals 1933 aus Molke und Eiklar gelang [44], ist in seinen beiden Coenzymformen, dem Flavin-mononukleotid (FMN) und dem Flavinadenin-dinukleotid (FAD) an vielen elektronenübertragenden Prozessen der Zelle beteiligt [45]. So sind z.B. die Acyl-CoA-Dehydrogenase der β -Oxidation, die NADH-Dehydrogenase der Atmungskette, die Succinat-Dehydrogenase des Citratzykluses oder die Monoaminoxidasen Flavoproteine. Zur Biosynthese von Riboflavin sind ausschließlich Bakterien, Pilze und Pflanzen befähigt. Vertebraten sind auf die Zufuhr von Riboflavin mit der Nahrung angewiesen. Ein Mangel an Riboflavin führt beim Menschen unter anderem zu Stomatitis, Dermatitis und hypochromer Anämie [46].

Erste Untersuchungen zur Biosynthese (Abb. 4) zeigten, dass Riboflavin aus Guanin gebildet wird [47-49]. Die vollständige Aufklärung des Biosyntheseweges gelang Volk *et al.* [50]. Die Biosynthese von Riboflavin (**24**) beginnt mit der Umsetzung von GTP (**5**) zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**17**) durch die GTP Cyclohydrolase II. Die nächsten beiden Schritte sind bei Prokaryoten die Desaminierung von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**17**) an C-2 durch die Pyrimidindesaminase und nachfolgend die Reduktion der Ribosylseitenkette durch die Pyrimidinreduktase. Endprodukt beider Reaktionen ist 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**20**). In Eukaryoten findet die Reduktion des Zuckers vor der Desaminierung statt. Nach Dephosphorylierung dieser Verbindung durch vermutlich unspezifische Phosphatasen erfolgt durch die 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazinsynthase die Kondensation von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**21**) mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**22**) zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**23**). Die Riboflavinsynthase katalysiert im letzten Schritt der Biosynthese die Bildung von 7,8-Dimethyl-10(D-1-ribityl)-isoalloxazin (Riboflavin, **24**) aus zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-

ribityllumazin (**23**). Das bei dieser Dismutasereaktion zusätzlich entstehende 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**21**) wird in den Biosyntheseweg zurückgeführt.

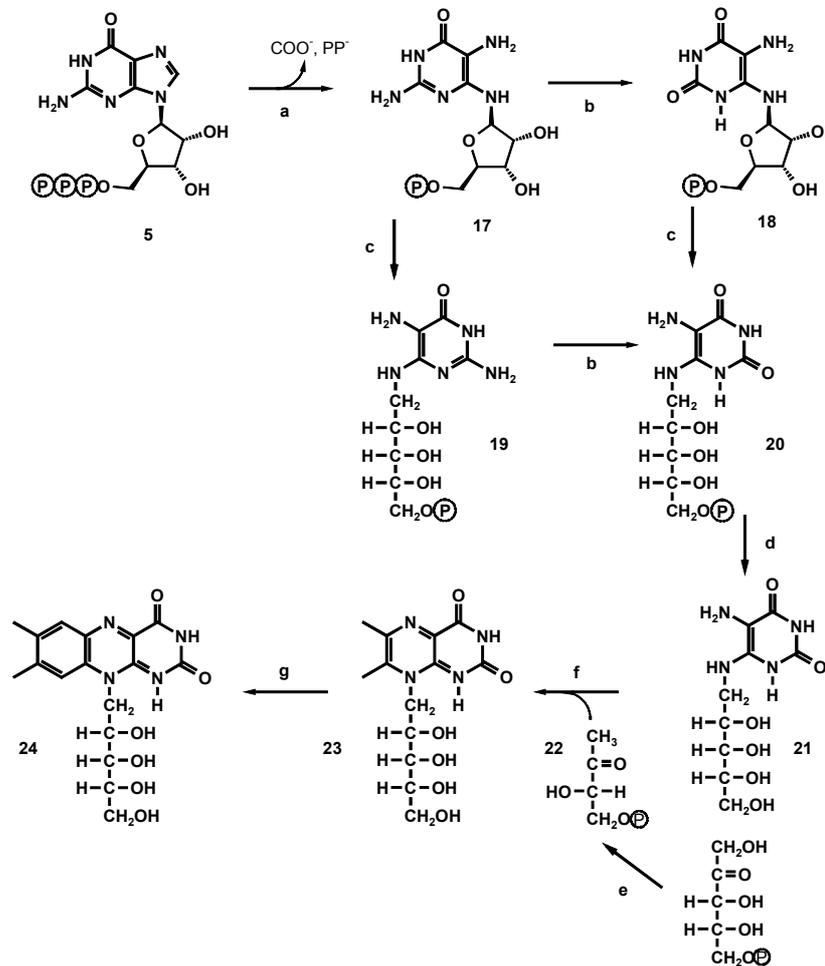


Abb. 4: Biosynthese von Riboflavin. GTP (**5**), 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**17**), 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**20**), 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**21**), 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**22**), 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**23**), Riboflavin (**24**). a: GTP Cyclohydrolase II; b: Deaminase; c: Reduktase; d: Phosphatase; e: 2,3-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (Mutase); f: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase; g: Riboflavin-Synthase.

1.4 Die GTP Cyclohydrolasen

Die GTP Cyclohydrolasen katalysieren die katalytische Ringöffnung des Imidazolrings von GTP. Bekannt sind zwei Enzyme dieses Typs. Die GTP Cyclohydrolase II ist das erste Enzym im Biosyntheseweg von Riboflavin (Abb. 4) [51]. Die GTP Cyclohydrolase II öffnet den Imidazolring (Abspaltung von C-8 als Formiat) und spaltet zusätzlich Pyrophosphat ab [52]. Produkt der Reaktion ist 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**17**).

Die GTP Cyclohydrolase I stellt das erste Enzym im Biosyntheseweg von Tetrahydrobiopterin (**1**, Abb. 2) und Tetrahydrofolat (**16**, Abb. 3) dar [38, 53]. Das Enzym öffnet wie die GTP Cyclohydrolase II den Imidazolring durch Abspaltung von C-8 als Formiat. Im weiteren führt die Reaktion der GTP Cyclohydrolase I zu einer Amadori-Umlagerung der Ribose mit anschließender Ringbildung. Produkt dieser Reaktion ist Dihydroneopterintriphosphat (**6**) [27, 28].

Das Gen für die GTP Cyclohydrolase I ist stark konserviert und wurde aus vielen verschiedenen Pro- und Eukaryoten kloniert [54-57]. In Mycoplasmen und Archaeobakterien wurden noch keine homologen Sequenzen gefunden.

Das Gen der GTP Cyclohydrolase II (*ribA*) ist ebenfalls stark konserviert [58]. Die Aminosäuresequenzen der GTP Cyclohydrolase I und II zeigen untereinander keinerlei Homologie.

Ein weiterer Typ GTP Cyclohydrolase wird in Archaeobakterien vermutet. Produkt dieser GTP Cyclohydrolase III soll 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidindion-5'-triphosphat sein [59].

1.4.1 Die GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*

Das Gen für die GTP Cyclohydrolase I (*folE*) aus *E. coli* ist bei 2251 kbp auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert [60]. Es kodiert für ein Protein mit 221 Aminosäuren (24,7 kDa). Unterstützt durch elektronenmikroskopische Aufnahmen des Enzyms wurde 1994 die Kristallstruktur der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* gelöst [29, 30]. Der Enzymkomplex besteht aus zehn identischen Untereinheiten und weist D₅-Symmetrie auf.

Die Position der 10 aktiven Zentren des Enzyms konnte durch Lösung der Struktur in Gegenwart von dGTP lokalisiert werden. An der Bildung eines aktiven Zentrums sind Aminosäuren aus drei monomeren Untereinheiten beteiligt. Durch gezielte Mutation einzelner Aminosäuren des aktiven Zentrums konnten teil- und inaktive Mutanten des Enzyms hergestellt und die Funktion einzelner Aminosäuren untersucht werden [61]. Kristallographische Daten der humanen GTP Cyclohydrolase I zeigten ein Zink-Ion im aktiven Zentrum des Enzyms [62]. Der postulierte Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase I Reaktion ist in Abb. 5 gezeigt [61].

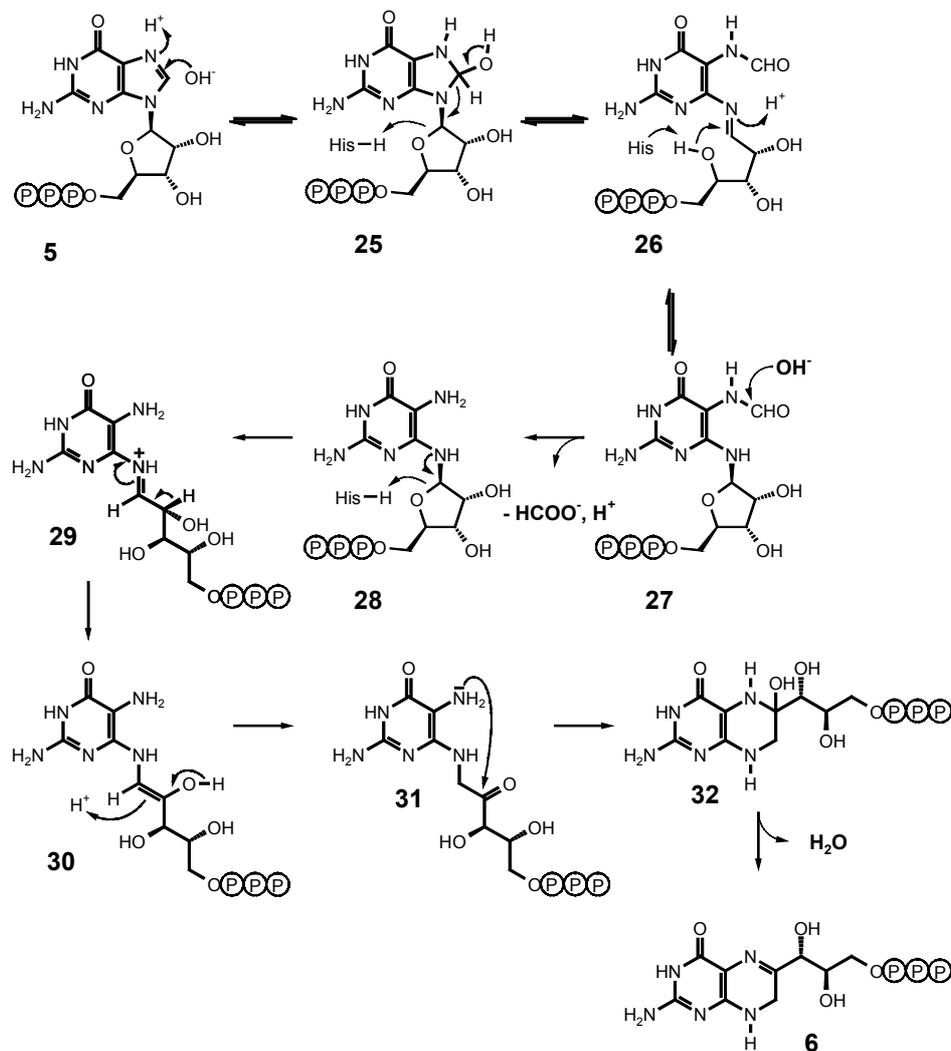


Abb. 5: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase I.

Eingeleitet wird die Reaktion durch die reversible Hydratisierung von GTP (5) an C-8. An dieser Hydratisierung sind die Aminosäurereste C110, C181 und H113 durch Polarisierung des angreifenden Wassermoleküls beteiligt. Im Folgenden soll durch Polarisierung der Bindung O-4' und C-1' durch die Aminosäure H112 die Öffnung des Imidazolrings über eine Imin-Zwischenstufe (26) erfolgen. Das gebildete 2-Amino-5-formylamino-6-[ribofuranosyl-1'-amino]-4(3H)-pyrimidinon-5'-triphosphat (27) wurde durch NMR-spektroskopische Untersuchungen als Zwischenprodukt der Reaktion nachgewiesen [63]. Die Hydrolyse des gebildeten Formamids (27) könnte durch Protonierung von N-7 durch den Aminosäurerest H179 erleichtert werden. Die nachfolgende Amadori-Umlagerung soll durch die Protonierung von O-4' durch H112 eingeleitet werden. Das so gebildete Iminiumion (29) geht durch Abstraktion eines Protons von C-2' in eine Enol Zwischenstufe (30) über. Diese wird stereospezifisch auf der *re*-Seite durch ein Proton aus dem Lösungsmittel

protoniert [64]. Durch nachfolgende intramolekulare Imin-Kondensation der 2'-Carbonylgruppe mit der 5'-Aminogruppe entsteht über 8-Hydroxytetrahydroneopterintriphosphat (**32**) als Zwischenprodukt Dihydroneopterintriphosphat (**6**) als Endprodukt der Reaktion.

1.4.2 Die GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli*

Die Mg^{2+} -abhängige GTP Cyclohydrolase II katalysiert den ersten Schritt in der Biosynthese von Riboflavin (Vitamin B₂). Das Gen der GTP Cyclohydrolase II (*ribA*) befindet sich auf dem *E. coli* Chromosom bei 1356 kbp [65]. 1993 wurde das Gen kloniert und das Enzym in *E. coli* überexprimiert [66]. Das Gen kodiert für ein Protein mit 196 Aminosäuren (21,8 kDa). Durch Gelfiltration wurde eine Masse von 44 kDa für das native Protein bestimmt, so daß sich für das Protein eine Dimerstruktur annehmen lässt [51, 66]. Ultrazentrifugationsexperimente von Ritz *et al.* lassen eine teilweise Aggregation der GTP Cyclohydrolase II zu größeren Aggregaten vermuten [65]. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die GTP Cyclohydrolase II ebenfalls Zink enthält (J. Kaiser, nicht veröffentlicht).

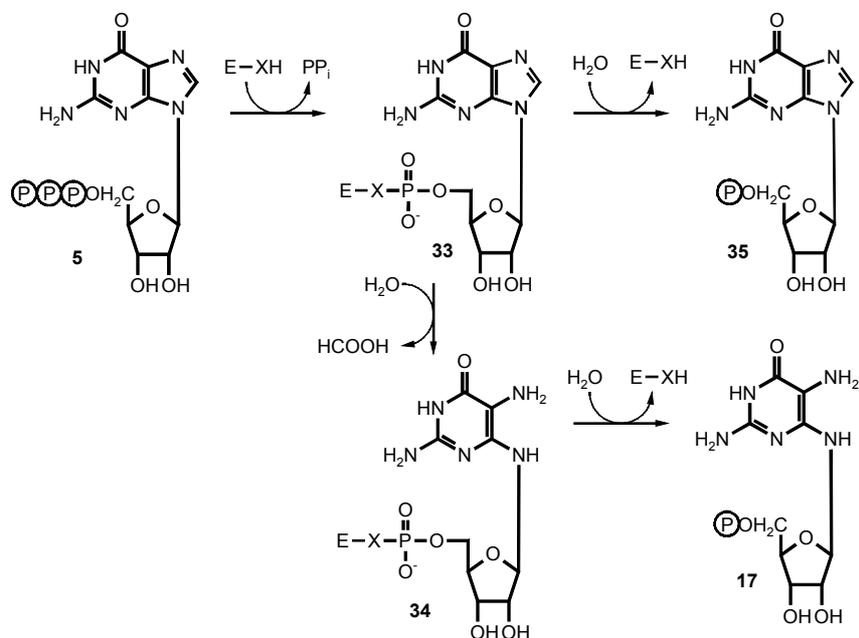


Abb. 6: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase II [65].

Die postulierte Reaktion der GTP Cyclohydrolase II ist in Abb. 6 dargestellt [65]. Die Reaktion beginnt mit der kovalenten Bindung des Substrats GTP (**5**) an das Enzym [67]. Durch Hydrolyse von enzymgebundenem GTP (**33**) vor der Öffnung des Imidazolrings entsteht GMP (**35**), ein Nebenprodukt der enzymatischen Reaktion. Auch Foor und Brown fanden in ihren Reaktionsansätzen GMP, konnten sich dessen Herkunft jedoch nicht erklären [51]. Spätere Untersuchungen von Kobajashi *et al.* zeigten, dass der Imidazolring von 8-Oxoguaninnukleotiden durch die GTP Cyclohydrolase II nicht hydrolysiert wird, jedoch Phosphathydrolyse auftritt [68]. Die Öffnung des Imidazolrings sollte ähnlich wie bei der GTP Cyclohydrolase I ablaufen. Aufgrund der fehlenden Proteinstruktur der GTP Cyclohydrolase II lassen sich keine detaillierten Aussagen über die Formiat-Hydrolyse machen. Die abschließende Hydrolyse führt zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat (**17**), dem Hauptprodukt der GTP Cyclohydrolase II Reaktion.

1.5 Die 6-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase

Die Zn^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase (PTPS) ist das zweite Enzym im Biosyntheseweg von Tetrahydrobiopterin[69]. Das Enzym katalysiert die Tautomerisierung von Dihydroneopterintriphosphat (**6**) zu 6-Pyruvoyltetrahydropterin (**7**) unter Abspaltung von Triphosphat (Abb. 2) [53, 70]. Die Raumstruktur der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Ratte wurde 1994 gelöst [34, 71]. Abb. 7 zeigt schematisch die Lage des Substrates im aktiven Zentrum des Enzyms. Ein Zink-Ion, welches durch die Aminosäuren His23, His48 und His50 koordiniert wird, führt zu einer Polarisierung der beiden Hydroxylgruppen des Substrats. Die Abstraktion der beiden Protonen an C-1' und C-2' erfolgt durch Cys42, welches Teil einer katalytischen Triade aus His89 und Asp88 ist.

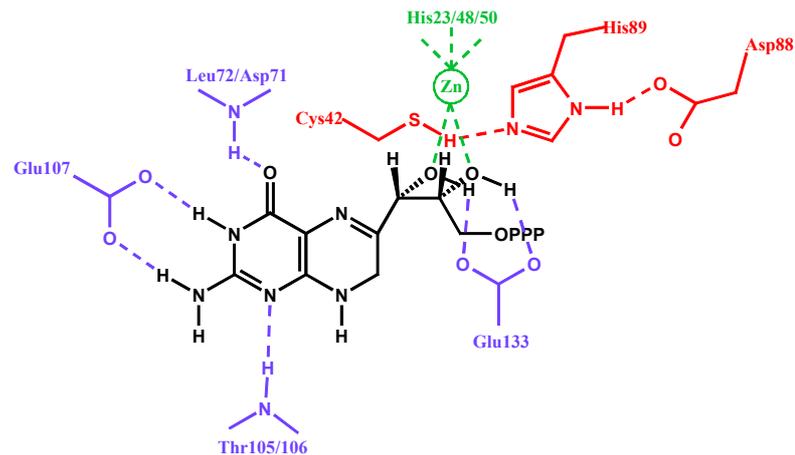


Abb. 7: Aktives Zentrum der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Maus.

Die Reaktion beginnt mit der Abstraktion eines Protons von C-1' durch Cystein42 als Base (Abb. 8) [72, 73]. Das entstehende Carbanion (**36**) lagert zum Enol (**37**) um. Nach Enolisierung, welche zur Bildung einer Carbonylgruppe an C-1' führt (**38**), erfolgt Abstraktion eines Protons von C-2', ebenfalls durch Cys42 als Base. Das entstehende Carbanion (**39**) spaltet Triphosphat ab. Durch Enolisierung von **40** unter Beteiligung des Aminosäurerestes E133 bildet sich das Produkt der Reaktion (**7**).

Die Reaktion der PTPS kann auch mit der Abstraktion eines Protons an C-2' beginnen. Das gebildete Carbanion (**41**) geht durch Triphosphatabspaltung in das Enol (**42**) über. Nach Enolisierung zu **43** erfolgt Abstraktion eines Protons von C-1'. Das entstehende Carbanion (**44**) lagert sich zum Enol (**45**) um, welches zum Produkt (**7**) enolisiert.

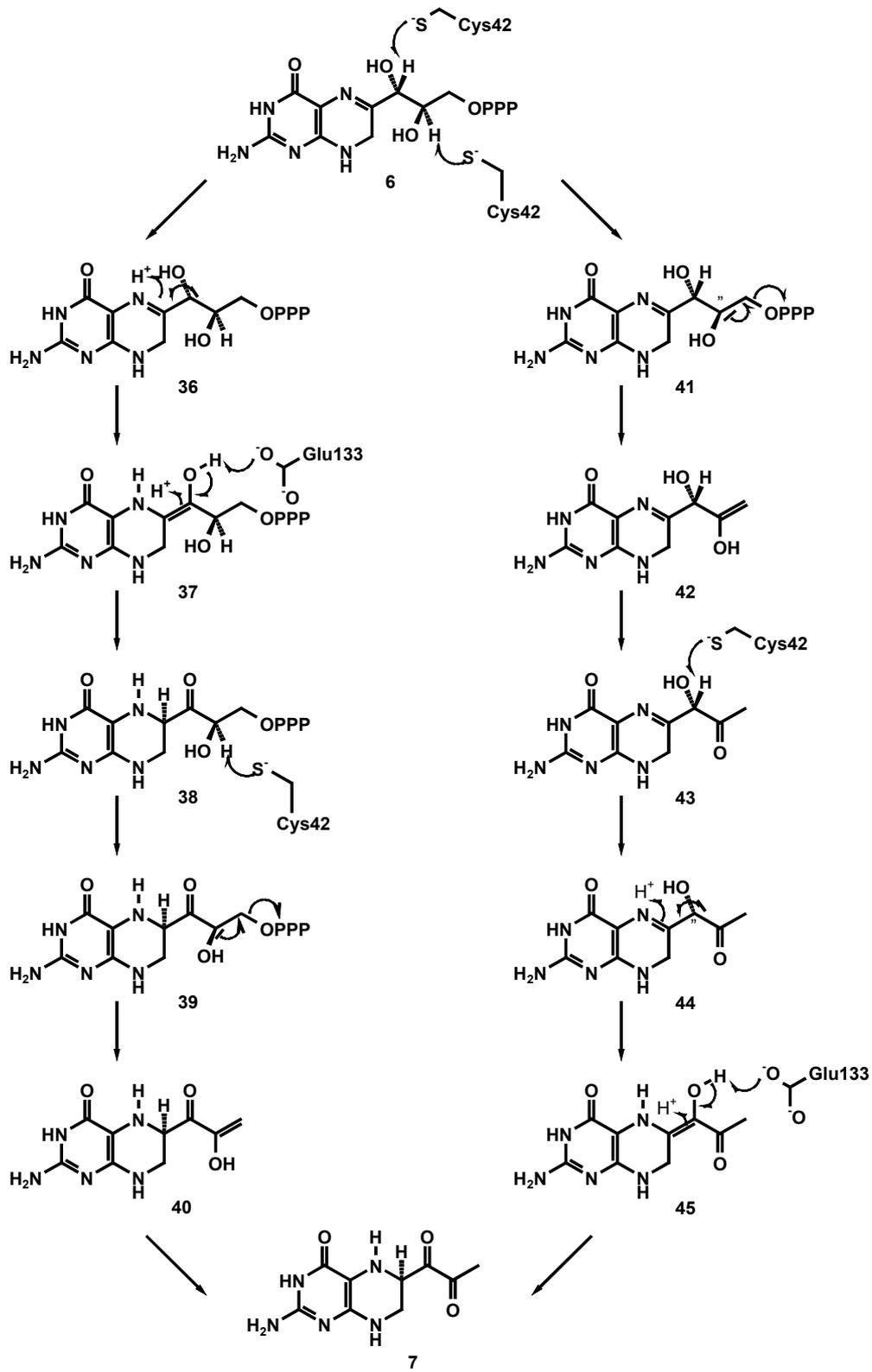


Abb. 8: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthese.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Anlagen für die HPLC:

Integrator SP 4270 (Spectra-Physics)

Pumpe SP 8810 4270 (Spectra-Physics) und Knauer 64 (Knauer, Berlin)

Fluorescence-Spektrophotometer RF-530 (Shimadzu)

HP 1504A Diodenarraydetektor (Hewlett Packard, Boise, Idaho, USA)

β-RAM (Biostep, Jahnsdorf)

Automatischer Probengeber ASI 45 (Kontron) und AS-100 HRLC (Bio-Rad)

Reversed Phase Säulen (Schambeck, Bad Honnef)

Brutschrank:

B5060 EK-CO (Heraeus)

DNA-Sequenzierung:

ABI-Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Norwalk, USA)

Dokumentationssystem:

Video Copy Processor P68E (Mitsubishi)

Elektrophoresekammern:

SE 250 „Mighty Small II“ (Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco) mit Spannungsquelle LKB-GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg) für die SDS-PAGE

Appligene 210 mit Spannungsquelle PHERO-stab. 200 (Biotech-Fischer, Reiskirchen)

GNA-100/200 mit Spannungsquelle GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg)

für die Agarosegelelektrophorese

Fluorimeter:

HSI TKO 100 (Hoefer, San Francisco)

Hochdrucksterilisator:

Sanoclav CV 2/1600, Kelomat Haushaltsgeräte (Traun, Österreich)

NMR:

Bruker DRX 500 Spektrometer, Meßfrequenz: 500,12 MHz bei ¹H- und 125,7 MHz bei ¹³C-Experimenten (Bruker, Karlsruhe)

PCR:

GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, USA)

pH-Meter:

E 603 mit Standard-Glaselektrode (Deutsche Metrohm, Filderstadt)

Proteinreinigung:

Komplettsysteme vom Typ HiLoad und Piccolo (Pharmacia Biotech, Freiburg)

Spektralphotometer:

UV-VIS-Spektralphotometer Ultraspec Plus (Pharmacia, Freiburg) mit Quarzküvetten (Helma/Mühlheim, Baden) für die RNA-Konzentrationsbestimmung

Spektralphotometer Novaspec II (Pharmacia, Freiburg) für die OD₆₀₀-Messungen und die Proteingehaltsbestimmungen.

Stopped-Flow und Quenched-Flow-Experimente:

SFM4/QS-Reaktionsapparat (BioLogic, Claix, Frankreich)

TIDAS Diodenarray (J&M Analytische Meß- und Regeltechnik, Aalen)

CLD 35W Deuteriumlampe (J&M Analytische Meß- und Regeltechnik, Aalen)

Szintillationszähler:

LS 7800 (Beckmann Instruments, München)

Thermoblock:

Teche DRI-Block DB-2A (Gesellschaft für Laborgeräte mbH, Wertheim)

Tischrundschtüttler:

Lab Shaker und Certomat MO/HK (Braun Biotech, Melsungen)

Ultraschallgerät:

Sonifier B-12A mit „L“-Converter (Branson SONIC Power Company, Dunbury, USA)

Vakuumpumpen:

MZ 2C (Vakubrand GmbH & Co, Wertheim)

E2M8 (Edwards, Sussex England)

Zentrifugen:

Z 230 M mit Rotor 220 59 V, BHG Hermle (Gosheim)

GS-15R mit Rotor S4180 (Beckman, Fullerton USA)

Sorval Superspeed RC2-B und RC-5B mit den Rotoren GSA, GS-3 und SS-34 (DuPont Instruments, Bad Homburg)

Roto-Vac-3 (Biotech-Fischer, Reiskirchen)

LE-70 mit Rotor Ti 70, Ti 70.1 (Beckman, Fullerton USA)

2.2 Chemikalien und Enzyme

Verwendet wurden Chemikalien der Firmen Aldrich (Steinheim), Boehringer GmbH (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Amersham (England) und Serva (Heidelberg).

[3-¹³C]Glucose stammen von Isotec, Miamisburg, Ohio, USA.

D₂O (99,9 % Anreicherung) stammt von EurisoTop, Gif-sur-Yvette, Frankreich.

Pterine stammen von Schircks Laboratories, Joan, Schweiz.

Die Restriktionsenzyme stammen von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia LBK (Freiburg) sowie Boehringer (Mannheim).

Die Reagentien zur DNA-Sequenzierung stammen aus dem Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt).

Die verwendete T4-Ligase stammt von New England Biolabs (Schwalbach) bzw. Boehringer (Mannheim).

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm, Grade II), DNase I und Lysozym stammen von Boehringer, Mannheim.

Hexokinase (E.C. 2.7.1.1), Pyruvat-Kinase (E.C. 2.7.1.40), 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.44), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49), Glutamat-Dehydrogenase (E.C.1.4.3.11), Pentosephosphat-Isomerase (E.C.5.3.1.6), Phosphoribosylpyrophosphat-Synthetase (E.C. 2.7.6.1), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (E.C. 2.4.2.8), Nucleosid-Monophosphat-Kinase (E.C. 2.7.4.4) und Guanylat-Kinase (E.C. 2.7.4.8) stammen von Sigma-Aldrich, Deisenhofen.

2.3 Bakterienstämme und Expressionsvektoren

Folgende *E. coli* Stämme wurden verwendet:

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F', proAB, lacI^qZΔM15, Tn(<i>tet</i>^r)]</i>	[74]
M15 [pREP4]	<i>lac, ara, gal, mtl, recA⁺, uvr⁺, [pREP4:lac, kan^r]</i>	[75]

Als Vektoren fanden pMAL-c2 (New England Biolabs), pNCO113 (Hoffman La Roche) und pBlueskript SK- (Pharmacia) Verwendung.

2.4 Stammhaltung und proteinchemische Methoden

2.4.1 Kulturmedien

Alle Medien wurden bei 121 °C und 2 bar für 45 min autoklaviert. Antibiotikallösungen wurden den erkalteten Medien zugegeben.

LB-Medium:
(Luria-Bertani)

- 10 g Caseinhydrolysat
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- ad 1 l Wasser
- für Agarplatten zusätzlich 14 g Agar

LB-Medium/Glycerin:

- 10 g Caseinhydrolysat
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- 500 ml Glycerin
- ad 1 l Wasser

Terrific Broth Medium:	12 g Casein
[76]	24 g Hefeextrakt
	4 ml Glycerol
	2,31 g Kaliumdihydrogenphosphat
	12,54 g Dikaliumhydrogenphosphat
	ad 1 l Wasser
Antibiotikallösungen (1000x):	Ampicillin 170 mg/ml in 1 M NaOH
	Kanamycin 25 mg/ml in H ₂ O
	Tetracyclin 50 mg/ml in Ethanol
	Chloramphenicol 34 mg/ml in Ethanol

2.4.2 Haltung der Stammkulturen

Bakterienkulturen auf Agarplatten wurden nach Bebrüten über Nacht bei 4 °C für maximal 4 Wochen gelagert.

Die Langzeitlagerung erfolgte als Glycerinkultur in flüssigem Stickstoff. Dazu wurde antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft, bei 37 °C über Nacht bebrütet, 10 ml der so erhaltenen Zellsuspension abzentrifugiert (2500 Upm, 10 min, RT), in sterilem 50 % Glycerin/LB-Medium suspendiert und sofort in flüssigen Stickstoff gegeben. Das Auftauen erfolgte langsam auf Eis.

2.4.3 Anzucht von Bakterien

Zur Anzucht auf Agarplatten wurden die Zellen entweder als Suspension ausplattiert oder mit einer Impföse übertragen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Für Übernachtskulturen wurden 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium im Reagenzglas mit einer Einzelkolonie von Platte bzw. mit einer Stickstoffkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bebrütet.

Für eine Anzucht wurden 25 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit 1 ml stationärer Vorkultur angeimpft, 2 bis 3 Stunden bei 37 °C geschüttelt, anschließend durch Zugabe von

IPTG-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert und weitere fünf Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.4.4 Fermentation

2.4.4.1 Fermentation im Schüttelkolben

50 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C mit 220 Upm geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 1000 ml Terrific-Broth-Medium in einem 2 l Erlenmeyer-Schikanekolben mit 50 ml Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Nach Zugabe von 1 mM β-Isopropylthio-D-galactopyranosid (IPTG) zur Induktion der Expression wurde über Nacht inkubiert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einem GS3-Rotor bei 4 °C, 3000 Upm geerntet und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Die so erhaltenen Zellen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Ausbeute betrug 5 bis 10 g feuchte Zellmasse je Liter Kultur.

2.4.4.2 Fermentation im 2 l Fermenter

Benötigte Lösungen:

- Phosphatpuffer: 33,3 g Na₂HPO₄
17,6 g KH₂PO₄
21,8 g K₂HPO₄
ad 2 l Wasser, pH 7,0
autoklaviert
- Starterlösung: 2 g MgCl₂
2 g NH₄Cl
4 g Glucose
ad 20 ml
steril filtriert

- Futterlösung: 500g Glucose
100 g NH_4Cl
20 g MgCl_2
ad 1 l
autoklaviert

- Vitamin-Mix: 20 mg Pyridoxamin-HCl
40 mg Thiamin-HCl
20 mg Riboflavin
20 mg Ca-Pantothenat
20 mg Biotin
10 mg Folsäure
15 mg Nicotinsäureamid
100 mg Cyanocobalamin (1:1000 Mannit-Verreibung)
ad 1 l Wasser, unter Erwärmen lösen,
steril filtrieren,
aliquotiert bei -20°C lagern

- Spurenelement-Mix: 50 g EDTA
8,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
13,5 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0,9 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,2 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,2 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,1 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,1 g H_3BO_3
ad 1 l Wasser, mit 50 %iger NaOH auf pH 7,4 einstellen,
autoklaviert

Die Gewinnung größerer Zellmengen erfolgte durch Fermentation von *E. coli* M15 [pREP4] im 2 l Fermenter in Minimalmedium. 2 l Phosphatpuffer pH 7,0 wurden im Fermenter autoklaviert. Nach Abkühlen wurden 8 ml Vitamin-Mix, 20 ml Starterlösung, 2 ml Spurenelement-Mix und 0,2 ml Calciumchlorid-Lösung (0,5 g/ml) zugesetzt. Das

Minimalmedium wurde mit 200 ml Übernachtkultur angeimpft. Der pH des Mediums wurde während der Fermentation auf 6,9 mit 10 %iger NH_3 -Lösung reguliert. Zu Beginn der Fermentation erfolgte keine zusätzliche Fütterung von Glucose. Nach Verbrauch der durch die Starterlösung zugeführten Glucose (absinken der O_2 -Sättigung im Medium) wurde rechnergesteuert die Futterlösung so zugeführt, daß eine Wachstumsrate von 0,15 erreicht wurde. Nach Erreichen einer OD von ca. 25 wurde mit 5 mM IPTG induziert. Gleichzeitig wurde die Fütterung so umgestellt, daß die Zufuhr von Glucose pulsweise immer dann erfolgte, wenn die O_2 -Sättigung des Mediums unter 30 % absank. Die Fermentation wurde beendet, wenn die O_2 -Sättigung des Mediums nicht mehr über 40 % stieg.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einem GS3-Rotor bei 4 °C, 3000 Upm geerntet und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Die so erhaltenen Zellen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Ausbeute betrug 30 bis 50 g feuchte Zellmasse je Liter Kultur.

2.4.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Benötigte Lösungen:

- Acrylamid-Lösung: 38,8 g Acrylamid
1,2 g N,N'-Methylenbisacrylamid
ad 100 ml entionisiertes Wasser
- Sammelgelpuffer: 250 mM Tris/HCl pH 6,8
0,2 % (w/v) SDS
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
0,4 % (w/v) SDS
- SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

- Auftragspuffer: 124 mM Tris/HCl pH 6,8
6 % (v/v) β -Mercaptoethanol
6 % (w/v) SDS
10 % (v/v) Glycerol
0,3 % (w/v) Bromphenolblau
- Färbelösung: 4 g Coomassie Brilliant Blue R-250
454 ml Methanol
454 ml dest. Wasser
92 ml Eisessig
- Entfärber I: 50 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Eisessig
- Entfärber II: 20 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Eisessig

Das 15 %ige Trenngel wurde aus 3,75 ml Acrylamidlösung, 3,75 ml dest. Wasser, 2,5 ml Trenngelpuffer, 70 μ l 10 %iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) und 5 μ l Tetramethylethylendiamin (TEMED) hergestellt. Nach Überschichten des Trenngels mit 20 %igem Isopropanol erfolgte die Polymerisation innerhalb einer Stunde. Das 4 %ige Sammelgel wurde aus 2,1 ml dest. Wasser, 2,5 ml Sammelgelpuffer, 0,4 ml Acrylamidlösung, 70 μ l 10 %iger APS-Lösung und 5 μ l TEMED hergestellt.

Die Proteinproben wurden 1:1 mit Auftragspuffer verdünnt und 5 min bei 100 °C gekocht. Pro Tasche wurden zwischen 10 und 100 μ g Protein aufgetragen. Als Proteinstandard wurde der Molekulargewichtsstandard Dalton Mark VII-L (Sigma, Deisenhofen) mit Proteinbanden bei 66, 44, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 30 mA pro Gel.

Zum Färben und Fixieren wurden die Gele für 30 min in die Färbelösung gegeben. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Einlegen der gefärbten Gele in Entfärber I und Entfärber II entfernt.

2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Benötigte Lösungen:

- Bradfordpuffer: 2,0 g Na_2HPO_4
0,6 g NaH_2PO_4
7,0 g NaCl
0,02 % NaN_3
1 l H_2O pH 8,2
- Bradford-Reagenz: 100 mg Serva Blue G
100 ml 16 M H_3PO_4
47 ml Ethanol
1 l H_2O

Zur Konzentrationsbestimmung nach Bradford [77-79] wurden die Proteinlösung mit Bradfordpuffer auf ca. 50 bis 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt. 50 μl dieser Lösung wurden mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Als Referenz dienten 50 ml Bradfordpuffer in 1 ml Bradfordreagenz. Zur Kalibrierung diente eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA).

UV-Spektrometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration reiner GTP Cyclohydrolase I wurde mittels UV-Spektroskopie bei 280 nm bestimmt. Als Extinktionskoeffizient wurde $\epsilon_{280} = 0,33 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [61] verwendet. Gebundene Liganden wie GTP oder Dihydroneopterintriphosphat stören die Bestimmung erheblich.

2.4.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

2.4.7.1 Bestimmung der GTP Cyclohydrolase I Aktivität

a) Direkte Bestimmung

Benötigte Lösungen:

- Reaktionspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,5
100 mM KCl
0,002 % NaN₃

Zur Bestimmung der GTP Cyclohydrolase I Aktivität [64] wurde das Enzym im Reaktionspuffer in einem Küvettenblock etwa 10 min auf 37 °C temperiert. Nach Zugabe von GTP in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Extinktionszunahme bei 330 nm bestimmt. Bei 330 nm beträgt der Extinktionskoeffizient von Dihydroneopterintriphosphat 6600 M⁻¹ cm⁻¹ [80].

b) Indirekte Bestimmung

Benötigte Lösungen:

- Reaktionspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,5
100 mM KCl
0,002 % NaN₃
- Phosphatase-Puffer: 50 mM MgCl₂
65 mM ZnCl₂
1 M Tris/HCl pH 8,5
- Iod-Lösung: 1 % (w/v) Iod
2 % (w/v) KI
1 M HCl

- Ascorbinsäure-Lösung: 3 % (w/v) Ascorbinsäure
- HPLC-Eluent:
 - 3 % (v/v) Methanol
 - 1 % (v/v) Acylnitril
 - 0,2 % 16 M Phosphorsäure

Zur indirekten Bestimmung von Dihydroneopterintriphosphat [81, 82] wurde das Enzym in 200 µl Reaktionspuffer bei 37 °C mit GTP in einer Endkonzentration von 1 mM inkubiert. Die Reaktion wurde nach einer definierten Zeit durch Zugabe von 30 µl Iod-Lösung gestoppt. Nach 30 min Inkubation der Reaktionslösung bei RT im Dunkeln wurde überschüssiges Iod durch Zugabe von 15 µl Ascorbinsäurelösung reduziert. Nach Zugabe von 100 µl 1M Tris/HCl pH 8,5, 10 µl Phosphatasepuffer und 2µl Phosphatase wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 40 % (w/v) Trichloressigsäure wurde ausgefallenes Protein abzentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte mittels HPLC an Nucleosil RP18 5 µm (Schambeck, Bad Honnef). Der Fluß betrug 1 ml/min. Die Detektion erfolgte fluorimetrisch (Anregung: 350 nm, Detektion 450 nm). Als Standard wurde im Handel befindliches Neopterin (Schircks, Joan, Schweiz) verwendet.

2.4.7.2 Bestimmung der GTP Cyclohydrolase II Aktivität

a) Direkte Bestimmung:

Benötigte Lösungen:

- Reaktionspuffer:
 - 100 mM Tris/HCl pH 8,2
 - 5 mM MgCl₂
 - 5 mM DTT
 - 0,002 % NaN₃

Zur Bestimmung der GTP Cyclohydrolase II Aktivität wurde das Enzym im Reaktionspuffer in einem 37 °C warmen Küvettenblock etwa 10 min temperiert. Nach Zugabe von GTP in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Extinktionszunahme bei

293 nm bestimmt. Bei 293 nm beträgt der Extinktionskoeffizient von 2,5-diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinone 5'-phosphat $8500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

b) Indirekte Bestimmung:

Benötigte Lösungen:

- Reaktionspuffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0
5 mM MgCl₂
5 mM DTT
- GTP-Lösung: 100 mM
- Stopplösung: 1 % Diacetyl
100 mM EDTA pH 8,0
- HPLC-Eluent: 40 % Methanol
100 mM Ammoniumformiat

Die Bestimmung der GTP Cyclohydrolase II Aktivität erfolgte mittels HPLC und fluorimetrischer Detektion von 6,7-Dimethylpterin [83].

Für die Bestimmung wurde das Enzym in Reaktionspuffer mit GTP in einer Endkonzentration von 1 mM versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stopplösung abgebrochen und 1 h bei 95 °C mit Diacetyl derivatisiert. Das bei der Reaktion gebildete 6,7-Dimethylpterin wurde fluorimetrisch (Anregung: 365 nm, Emission: 435 nm) mittels HPLC (Hypersil RP 18, 5 μm) bestimmt.

2.4.7.3 Bestimmung der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase Aktivität

Benötigte Lösungen:

- Reaktionspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,5
100 mM KCl
2 mM MgCl₂
0,002 % NaN₃
- GTP Cyclohydrolase I: 5 mg/ml
- Sepiapterin-Reduktase: 2 mg/ml
- NADPH-Lösung: 0,833 mg NADPH
ad 1 ml Wasser
frisch bereitet
- GTP-Lösung: 2 mM
- Quench-Lösung: 1 % (w/v) Iod
2 % KI
1 M HCl
- Ascorbinsäure-Lösung: 3 % Ascorbinsäure
- Phosphatase-Puffer: 50 mM MgCl₂
65 mM ZnCl₂
1 M Tris/HCl pH 8,5
- HPLC-Eluent: 3 % (v/v) Methanol
1 % (v/v) Acetonitril
0,2 % 16 M Phosphorsäure

Die Aktivität der PPH₄-Synthase wurde über die NADPH-abhängige Reduktion von 6-Pyruvoyltetrahydropterin zu Dihydrobiopterin durch die Sepiapterin-Reduktase mit anschließender Iodoxidation bestimmt [84].

Für jeden Testansatz wurden 0,75 µl GTP (2 mM) in 29 µl Reaktionspuffer mit 0,3 µl GTP Cyclohydrolase I versetzt und 2 h bei 37°C unter Lichtausschluß inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl NADPH-Lösung, 2 µl Sepiapterin-Reduktase-Lösung und 10 - 50 µl Probe wurde auf 300 µl Wasser aufgefüllt und 5 min bei 37 °C unter Lichtausschluß inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Iod-Lösung zugegeben und weitere 30 min bei RT unter Lichtausschluß inkubiert. Ausgefällene Proteine wurden abzentrifugiert und zum Überstand 25 µl 3 %ige Ascorbinsäure gegeben.

Die Auswertung des Tests erfolgte durch HPLC an einer Nucleosil 10 RP 18 Säule, die Biopterinkonzentration wurde mittels Fluoreszenzdetektion (Anregung: 350 nm, Emission: 450 nm) und automatischer Integration bestimmt. Als Negativkontrolle wurde ein Test ohne Enzym angesetzt.

2.4.8 Reinigung der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*

Benötigte Lösungen:

- Lysepuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5
1 mM DTT
1 mM PMSF
- Puffer A: 20 mM Tris/HCl pH 7,5
0,02 % NaN₃
- Puffer B: 20 mM Tris/HCl pH 7,5
1 M KCl
0,02 % NaN₃
- Phosphatase-Puffer: 50 mM MgCl₂
65 mM ZnCl₂

- Puffer C: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 6,5
0,02 % NaN₃
- Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,5
100 mM KCl
0,02 % NaN₃

Zellaufschluß von *E. coli*

Ca. 10 g feuchte Zellmasse wurden in 100 ml Lysepuffer suspendiert. Nach Zugabe von 15 mg Lysozym und 2 mg DNase I wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Zellaufschluß wurde durch eine Ultraschallbehandlung vervollständigt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation in einem SS-34 Rotor bei 15000 Upm und 4 °C abgetrennt.

Anionenaustausch-Chromatographie an Q Sepharose FF

Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand (Rohextrakt) wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Q Sepharose FF Säule (Pharmacia, 40 x 170 mm) bei 4 °C aufgetragen. Die Säule wurde mit 300 ml Puffer A gewaschen. Anschließend wurde über 50 ml ein linearer Gradient von 0 bis 80 mM KCl gemischt. Über weitere 200 ml wurde die Säule mit 80 mM KCl in Puffer A gespült. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 80 bis 250 mM KCl über 1350 ml eluiert. Die Flußrate betrug 3 ml/min. Fraktionen, die GTP Cyclohydrolase I enthielten, wurden vereinigt und anaerob bei 4 °C gelagert.

Die Proteinlösung wurde durch Ultrafiltration an einer 100 kDa-Membran auf ca. 10 mg/ml aufkonzentriert. Zur Abtrennung enzymgebundener, phosphorylierter Pterine und GTP wurde zu 40 ml Proteinkonzentrat 2,5 mg alkalische Phosphatase und 40 µl Phosphatase-Puffer gegeben. Die Lösung wurde 12 h bei 37 °C anaerob inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 10 min auf 65 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf 4°C wurden ausgefallene Proteine bei 15000 Upm und 4°C abgetrennt.

Der Proteinüberstand wurde mit 60 ml Puffer A verdünnt und auf eine mit Puffer A equilibrierte Q Sepharose FF Säule (20 x 100 mm) bei 4°C aufgetragen. Die Säule wurde mit 150 ml Puffer C gewaschen. Anschließend wurde über 300 ml mit einem linearen Gradienten von 0 bis 400 mM KCl eluiert. GTP Cyclohydrolase I haltige Fraktionen wurden vereinigt,

Zellaufschluß von *E. coli* M15 [pREP4, pECYII]

Ca. 10 g feuchte Zellmasse wurden in 100 ml Lysepuffer suspendiert. Nach Zugabe von 15 mg Lysozym und 2 mg DNase I wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Zellaufschluß wurde durch eine Ultraschallbehandlung vervollständigt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation in einem SS-34 Rotor bei 15000 Upm und 4 °C abgetrennt.

Anionenaustausch-Chromatographie an Q Sepharose FF

Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand (Rohextrakt) wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Q Sepharose FF Säule (Pharmacia, 40 x 170 mm) bei 4 °C aufgetragen. Die Säule wurde mit 300 ml Puffer A und 200 mM KCl gewaschen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 200 bis 1000 mM KCl über 500 ml eluiert. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Fraktionen, die GTP Cyclohydrolase II enthielten, wurden vereinigt und anaerob bei 4 °C gelagert.

Die Proteinlösung wurde durch Ultrafiltration an einer 30 kDa-Membran auf ca. 10 mg/ml aufkonzentriert.

Gelfiltration an Superdex-75

Zur Gelfiltration wurde eine Superdex-75 Säule (Pharmacia Biotech, 40 x 900 mm) verwendet. Die Säule wurde mit Gelfiltrationspuffer bei Raumtemperatur equilibriert. Aufgetragen wurden 5 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von ca. 6 bis 8 mg/ml. Der Fluß betrug 3 ml/min. Fraktionen, welche die GTP Cyclohydrolase II enthielten, wurden vereinigt, durch Ultrafiltration an einer 10 kDa-Membran auf ca. 20 mg/ml aufkonzentriert und aliquotiert bei -70 °C gelagert.

2.4.10 Reinigung der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase

Benötigte Lösungen:

- Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0
5 mg Lysozym
1 mg DNase
frisch bereitet
- Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 8,0
0,02 % NaN₃
- Spaltpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0
100 mM NaCl
2 mM CaCl₂

Die Expression der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Maus und Huhn erfolgte als Fusionsprotein mit dem maltosebindenden Protein (MBP) aus *E. coli*. Die Reinigung der mit MBP fusionierten Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase erfolgte durch Affinitätschromatographie an Amylose-Harz (New England Biolabs).

Zellaufschluß von *E. coli*

Ca. 5 g feuchte Zellmasse wurden in 50 ml Lysepuffer suspendiert und 20 min bei 25°C inkubiert. Der Zellaufschluß wurde durch eine Ultraschallbehandlung vervollständigt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation in einem SS-34 Rotor bei 15000 Upm und 4 °C abgetrennt.

Affinitätschromatographie an Amylose-Harz (New England Biolabs)

Der nach Zentrifugation erhaltene klare Rohextrakt wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Amylose-Harz-Säule (15 x 30 mm) aufgetragen. Der Durchlauf wurde gesammelt. Die Säule wurde mit 300 ml Puffer A gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit 10 mM Maltose in Puffer A. Das Säulenmaterial wurde laut Vorschrift

regeneriert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Reinigung mit dem gesammelten Durchlauf mehrfach wiederholt. Die vereinigten Proteinfractionen wurden durch Ultrafiltration an 100 kDa Membranen auf ca. 5 mg/ml aufkonzentriert und aliquotiert bei -70 °C gelagert.

Spaltung des MBP-Fusionsproteins mit Faktor Xa

Das Fusionsprotein aus MBP und Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Huhn wurde mittels Faktor Xa gespalten und das MBP durch Anionenaustausch-Chromatographie abgetrennt.

Zur Spaltung des MBP-Fusionsproteins wurden 15 mg MBP-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Huhn in 4 ml Spaltpuffer zusammen mit 100 µg Faktor Xa 20 h bei 25 °C inkubiert. Zur Abtrennung des MBP wurde die Proteinlösung auf eine mit Puffer A equilibrierte Q Sepharose FF aufgetragen. Die Säule wurde mit 200 ml Puffer A gewaschen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl über 400 ml eluiert. Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase haltige Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration an einer 30 kDa Membran auf ca. 5 mg/ml aufkonzentriert und bei -70 °C gelagert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Benötigte Lösungen:

- RF1-Puffer: 100 mM KCl
50 mM $\text{MnCl}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
30 mM Kaliumacetat
10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
15 % (v/v) Glycerin
pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, autoklaviert

- RF2-Puffer: 10 mM MOPS
10 mM KCl
75 mM CaCl₂*2 H₂O
15 % (v/v) Glycerin
pH 6,8 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen [85] wurden 400 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz mit 2 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bebrütet. Nach Zentrifugation (2000 Upm, 20 min, 4 °C) wurde das Sediment in 100 ml RF1-Puffer aufgenommen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (2000 Upm, 30 min, 4 °C), das Sediment in 10 ml RF2-Puffer suspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden portioniert und bei -70 °C gelagert.

2.5.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA nach der high efficiency Methode [86-89] wurden 200 µl auf Eis gekühlte kompetente Zellen mit ca. 100 ng DNA versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock bei 42 °C für 90 s und 2 min Eiskühlung wurden 1000 µl LB-Medium ohne Antibiotikazusatz zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C unter ständigem Schütteln wurden 50 bzw. 200 µl der Kultur auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

2.5.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Benötigte Lösungen:

- STET-Puffer: 8 % (w/v) Saccharose
5 % (v/v) Triton X-100
50 mM Tris
10 mM EDTA
pH 8,0 mit HCl eingestellt
- Lysozymlösung: 10 mg/ml, frisch bereitet

Für Restriktionsanalysen wurde Plasmid-DNA durch Schnellpräparation mit Hitzeschock nach Holmes und Quigley isoliert [90]. Dazu wurde eine stationäre 5 ml Übernachtskultur abzentrifugiert (2500 Upm, 10 min, RT) und die Zellen in 300 µl STET-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozymlösung wurde 30 Sekunden bei Raumtemperatur und anschließend 90 Sekunden bei 95 °C inkubiert.

Zelltrümmer und Proteine wurden durch Zentrifugation (17000 Upm, 15 min, RT) entfernt. Der DNA-haltige Überstand wurde abdekantiert und die DNA mit 200 µl Isopropanol ausgefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert (17000 Upm, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 200 µl EtOH (70 %, -20 °C) gewaschen, 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen.

2.5.3.2 Plasmidisolierung mittels Anionenaustausch-Chromatographie

Nucleobond-Chromatographiesäulen (Macherey & Nagel, Düren) binden DNA an ein Anionentauscherharz, wobei Proteine und RNA bei niedriger Salzkonzentration von der Säule gewaschen werden.

Folgende Lösungen wurden benötigt:

- Puffer S1: 50 mM Tris/HCl
10 mM EDTA
400 µg RNase A/ml
pH 8,0

- Puffer S2: 200 mM NaOH
1 % SDS

- Puffer S3: 2,6 M Kaliumacetat
pH 5,2

- Puffer N2: 100 mM Tris/Phosphat
15 % Ethanol
900 mM KCl
pH 6,3

- Puffer N3: 100 mM Tris/Phosphat
15 % Ethanol
1150 mM KCl
pH 6,3

- Puffer N5: 100 mM Tris/H₃PO₄
15 % Ethanol
1000 mM KCl
pH 8,5

- TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH
1 mM EDTA
pH 7,4

Von einer Übernachtskultur wurden 400 ml abzentrifugiert (5000 Upm, 12 min, 4 °C), die Zellen in 4 ml Puffer S1 resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml

Puffer S2 wurde vorsichtig mehrmals invertiert und weitere 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer S3 wurde die Mischung vorsichtig homogenisiert, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (12000 Upm, 50 min, 4 °C). Der Überstand wurde auf eine mit 2 ml Puffer N2 equilibrierte Säule gegeben, zweimal mit je 4 ml Puffer N3 gewaschen und das Plasmid mit 4 ml Puffer N5 eluiert. Nach Zugabe von Isopropanol bis zu einer Endkonzentration von 70 % (v/v) zum Eluat und 10 min Inkubation bei RT wurde die DNA abzentrifugiert (17000 Upm, 30 min, 4 °C), das Pellet mit EtOH (70 %, -20 °C) gewaschen, getrocknet, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration fluorometrisch bestimmt.

2.5.4 Reinigung isolierter DNA

Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA aus PCR – oder Restriktionsansätzen erfolgte durch Isopropanolfällung. Dazu wurden 100 µl DNA-haltiger Lösung mit 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5,6 und 250 µl Isopropanol versetzt und die ausgefallene DNA 20 min bei 14000 Upm und 19 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 200 µl 70 %igem EtOH gewaschen. Nach Trocknen der DNA im Vakuum wurde die DNA in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

Reinigung von DNA-Fragmenten nach Agarosegelaufreinigung

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Quiaquick-Isolierkits (Quiagen). Dazu wurden 200 mg Agarosegel mit 800 µl Puffer versetzt und bei 55 °C inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst war. Diese Lösung wurde durch eine Ionentauschersäule zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl Puffer gewaschen und die DNA mit 40 µl Wasser von der Säule eluiert.

Reinigung von DNA zur Sequenzierung

Die zur Sequenzierung verwendete DNA wurde durch Phenolisierung gereinigt. Dazu wurde der Ansatz mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt, 100 µl Phenol (mit TE-Puffer gesättigt)

zugegeben, geschüttelt, abzentrifugiert (14000 Upm, 30 s, 20 °C), die obere Phase vorsichtig abgezogen, die Extraktion mit Phenol sowie zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt, durch Zugabe von 10 µl Natriumacetat-Lösung (2,6 M) und 100 µl Isopropanol die DNA gefällt, abzentrifugiert (14000 Upm, 30 min, 18 °C), mit Ethanol (100 %, -20 °C) gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.5.5 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäure-Lösungen

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktionseinheit entsprach hierbei einer Menge von 40 µg RNA/ml. Zur Reinheitsbestimmung wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient der beiden Extinktionen gebildet. Für RNA guter Reinheit muß gelten:

$$\frac{OD_{260}}{OD_{280}} = 1,9 - 2,0$$

Die DNA-Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Fluoreszenzphotometer Perkin-Elmer 1000 durchgeführt. Komplexe von DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (Bisbenzimid) wurden bei 365 nm angeregt und besaßen ein Emissionsmaximum bei 458 nm. Eine Kalibrierung wurde mit DNA-Lösung bekannter Konzentration durchgeführt.

2.5.6 Agarosegelelektrophorese von DNA

Benötigte Lösungen:

- TAE-Puffer (50x): 2 M Tris/Acetat pH 8,2
 100 mM EDTA
- Probenpuffer: 50 % (v/v) Glycerol
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
 0,25 % (w/v) Xylencyanol
 in TAE-Puffer

- Ethidiumbromid-Lösung: 1 mg/ml Ethidiumbromid
in Wasser

Abhängig von der Länge der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele zwischen 1 und 3 % Agarose in TAE-Puffer gegossen. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer gekocht und nach Abkühlen der klaren Lösung auf ca. 50 °C in Gelträger gegossen. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Agarosegelpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit 2 µl Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 45 min durchgeführt. Dabei durchläuft der Farbmarker Bromphenolblau etwa 3/4 des Gels.

Nach zwanzigminütigem Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid-Lösung unter Lichtausschluß wurde das Gel mit dest. Wasser gewaschen und unter UV-Einstrahlung bei 312 nm photographiert. Die einzelnen Fragmente konnten anhand des mitgelaufenen Längenstandards zugeordnet werden.

Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Leiter-Marker (StrataGene) mit folgenden DNA-Bruchstücken verwendet:

250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 12000.

2.5.7 Restriktionsanalyse

DNA-Hydrolysen mit Restriktionsenzymen wurden im Bezug auf Pufferbedingungen und Inkubationstemperaturen den Angaben der Hersteller entsprechend durchgeführt.

Für Hydrolysen im analytischen Maßstab wurden 5 µl der Minipräparation verwendet, 2 µl des entsprechenden Puffers (10x) sowie je 1 µl Restriktionsenzym zugegeben, auf 20 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt, 1 h bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 3 µl Auftragspuffer direkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.5.8 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen der DNA wurde unter Verwendung von alkalischer Kälberdarm-Phosphatase durchgeführt. Dazu wurde zu einem Restriktionsansatz 1 µl Phosphatase (10 U/µl) gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. DNA-

Fragmente mit 3'-überhängenden oder doppelsträngigen Enden wurden zunächst für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend weitere 15 min bei 55 °C.

2.5.9 Ligierung von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation über Nacht wurde zu ca. 100 ng geschnittenem Plasmid das Insert in dreifachem molarem Überschuß gegeben, mit Wasser auf 8 µl aufgefüllt, 1 µl Ligationspuffer (10x) sowie 1 µl T4-Ligase zugegeben und über Nacht bei 12 °C inkubiert.

Für eine schnellere Ligation wurde der „Rapid-DNA“-Ligationskit (Boehringer, Mannheim) verwendet. Hierfür wird die Vektor-DNA mit dem Insert im Verhältnis 1:3 gemischt, mit Wasser auf 8 µl aufgefüllt, 2 µl DNA-Ligationspuffer zugegeben, geschüttelt, 10 µl Ligasepuffer sowie 1 µl Ligase zugegeben, gut geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz konnte ohne Reinigung zur Transformation verwendet werden.

2.5.10 Auffüllen von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde verwendet, um überhängende DNA-Enden zu doppelsträngigen Enden aufzufüllen. Dazu wurden zu einem Restriktionsansatz, der die DNA in einer Konzentration von 50 ng/µl enthielt, nach Ende der Hydrolyse 0,7 µl dNTP's (je 5 mM) sowie 1 µl Klenow-Polymerase (New England Biolabs, 5 U/µl) gegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei 25 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Polymerase wurde weitere 10 min bei 75 °C inkubiert.

2.5.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen wurde nach der modifizierten Methode von Chirgwin et al. durchgeführt [91].

Folgende Lösungen wurden dazu benötigt:

- Rhodanidlösung: 120 g Guanidiniumthiocyanat
1 g Na-laurylsarcosinat
10 ml Tri-Na-citrat*2 H₂O
ad 200 ml bidest. Wasser
durch Erwärmen lösen
1 ml β-Mercaptoethanol
steril filtriert, portioniert und bei –20 °C gelagert

Ca. 1 g Gewebestücke wurden in einer mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Reibschale mit einem Pistill zu einem feinen Pulver verrieben. Hierbei mußte mehrfach durch Zugabe von flüssigem Stickstoff nachgekühlt werden. Anschließend wurden 10 ml Rhodanidlösung in die trockene und kalte Reibschale gegeben, mit flüssigem Stickstoff übergossen und die entstandene feste Masse mit dem Pistill zerstoßen, bis sich ein rosafarbenes Pulver ergab. Sobald der Inhalt zu schmelzen begann, wurde er mit dem Pistill zu einem teigartigen Brei vermengt. Dieser wurde mit einer 10 ml Spritze und aufgesetzter Kanüle mehrmals aufgezogen und wieder in die Reibschale gedrückt, bis er eine gleichmäßige Konsistenz annahm.

Bei der Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen wurde auf das Verreiben unter flüssigem Stickstoff verzichtet. Statt dessen wurden 8 ml Rhodanidlösung direkt zu ca. 10⁸ gewaschenen Zellen gegeben und die Mischung mit Spritze und Kanüle homogenisiert. In einem SW 40 Rotorbecher wurden 3 ml 8,7 M CsCl vorgelegt und mit 8 ml der homogenisierten Rhodanidlösung überschichtet. Die Zentrifugation wurde in einem SW 40 Ausschwingrotor in der Beckman L7 Ultrazentrifuge bei 31000 Upm für 24 h bei RT durchgeführt.

Nach der Zentrifugation wurde die Lösung aus den Zentrifugenbechern bis auf einen Rest von ca. 1 ml abgesaugt und der Zentrifugenbecher mit einem erhitzten Skalpell oberhalb der verbliebenen Flüssigkeit abgeschnitten. Die restliche Flüssigkeit wurde vorsichtig dekantiert und die sedimentierte RNA in 1 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 1 ml Isopropanol wurde die RNA abzentrifugiert (17000 Upm, 30 min, 18 °C) und in 200 - 600 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt und die Lösung bei –70 °C gelagert.

2.5.12 cDNA-Erststrang-Synthese

Um ausgehend von Gesamt-RNA eine PCR zu initiieren, wurde zunächst unter Verwendung der Reversen Transkriptase (RTase) aus dem Moloney murine leukemia virus (M-MLV) ein cDNA Erststrang synthetisiert [86, 88]. Zur Inhibition von RNasen wurde RNasin zugesetzt [92].

Für jeden Ansatz zur reversen Transkription wurden zu 5 µg Gesamt-RNA 10 µl dNTP's (je 5 mM), 6,2 µl dT₁₅ und 5 µl RTase-Puffer (10x) gegeben und mit Wasser auf 46 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min auf 90°C erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1,3 µl RNasin (40 U/µl) sowie 2,5 µl RTase (200 U/µl) für 30 - 60 min bei 42 °C inkubiert. Nach Erhitzen des Ansatzes für 5 min auf 95 °C und anschließendem Abkühlen auf Eis konnte dieser direkt für PCR-Ansätze verwendet werden.

2.5.13 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR wurde genutzt, um gezielt einzelne DNA-Stücke zu amplifizieren.

Ein typischer Ansatz bestand aus:

DNA-Matritze	1 µl (ca. 10 ng)
dNTP's (je 5 mM)	2 µl
Oligonukleotide (10 µM)	2 x 2,5 µl
Puffer (10x)	5 µl
MgCl ₂ (100 mM)	4 µl
DMSO	6 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl
<u>bidest. Wasser</u>	<u>26,5 µl</u>
PCR-Ansatz	50 µl

Der PCR-Ansatz wurde anschließend einem dreistufigen Temperaturzyklus unterworfen:

Stufe	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Funktion
1	94	30	Trennung der DNA-Doppelstränge
2	48-56	30	Primer-Hybridisierung
3	72	30-180	Primer-Verlängerung

Tab. 1: Parameter einer PCR-Reaktion.

Die Dauer der letzten Stufe variierte je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Stückes. Je 1000 bp wurden ca. 60 s veranschlagt.

2.5.14 DNA-Sequenzierung

Benötigte Lösungen:

- TBE-Puffer: 89 mM Tris-Acetat pH 8,2
 89 mM Borsäure
 2,5 mM Na₂EDAT
- Ammoniumpersulfat : 10 %
- Natriumacetat : 3 M

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode [93, 94]. Für die Sequenzierreaktion wurde der „Taq DyeDeoxy Terminator Cyclo Sequencing Kit“ (Perkin Elmer, Norwalk, USA) verwendet.

Ein Ansatz enthielt:

50 – 250 ng Matrizen-DNA

2,7 µl Sequenzier-Mix

10 pmol Primer

ad 7 µl Wasser

Für die Sequenzier-PCR wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

15 s 95 °C

15 s 50 °C

4 min 60 °C

Nach Beendigung der Reaktion wurden 68 µl Wasser zugegeben. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 µl NaOAc und 300 µl Ethanol abs. gefällt. Die DNA wurde 15 min bei 14000 Upm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die gefällte DNA mit EtOH gewaschen. Nach Trocknen der DNA im Vakuum wurde die DNA in 1 µl Formamid-Lösung aufgenommen.

Die Herstellung des Polyacrylamidgels zur Auftrennung der DNA-Stücke erfolgte mit Hilfe des Long Ranger Gelkits (FCM Bioproducts, Rockland, Maine, USA). Dazu wurden 22,5 g Harnstoff, 6 ml Gellösung und 6 ml 10x TBE-Puffer auf 60 ml Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt. Nach vollständigem Lösen des Harnstoffs wurde die Lösung durch ein 0,2 µm Filter filtriert und entgast. Nach Zugabe von 180 µl APS-Lösung und 25 µl TEMED konnte das 0,2 mm dicke und 48 cm lange Gel gegossen werden. Die Polymerisierung erfolgte innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur.

Die Gelelektrophorese, Signalaufnahme und Auswertung erfolgte am automatischen DNA-Sequencer Modell ABI 377 (Perkin Elmer, Applied Biosystems). Als Laufpuffer dienten 2 l TBE-Puffer. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel einem einstündigen Vorlauf unterzogen.

Laufparameter:

Spannung: 2800 V

Leistung: 40 W

Geltemperatur: 51°C

Laufzeit: 10 h

Die Auswertung erfolgte mittels der Software „ABI Prism Sequencing Analysis Software“ (Perkin Elmer, Norwalk, USA).

2.6 Enzymatische Synthesen

2.6.1 Synthese von [3-¹³C]Ribulose-5-Phosphat

Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 300 mM KCl, 60 mM MgCl₂, 55,5 mM [4-¹³C]Glucose, 1 mM DTT, 66 mM Phosphoenolpyruvat, 5,5 mM ATP, 225 mM Ammoniumacetat, 225 mM α-Ketoglutarat, 5,5 mM NADP⁺, 5 U Hexokinase (E.C. 2.7.1.1), 4,3 U Pyruvatkinase (E.C. 2.7.1.40), 1,7 U 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.44), 5 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49) und 5 U Glutamat-Dehydrogenase (E.C. 1.4.3.11) in 2 ml Gesamtvolumen. Die Reaktionsmischung wurde bei 37 °C inkubiert und der pH durch Zugabe von KOH zwischen 7,5 und 8,0 gehalten. Die Reaktion wurde mittels ¹³C-NMR überwacht und beendet, sobald das Signal von 6-Phosphogluconat verschwunden war.

¹³C-NMR-Parameter (gemessen in H₂O/ D₂O pH 8,0 bei 90,55 MHz):

[4-¹³C]6-Phosphogluconat: 78,1 ppm (s)

[4-¹³C]Ribulose-5-phosphat: 74,8 ppm (s)

2.6.2 Synthese von [3'-¹³C]Guanosintriphosphat

Der Ansatz enthielt 250 mM Tris/HCl pH 7,8, 300 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM ATP, 10 mM Phosphoenolpyruvat, 20 U Pentosephosphat-Isomerase (E.C. 5.3.1.6), 120 mU Phosphoribosylpyrophosphat-Synthetase (E.C. 2.7.6.1), 120 mU Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (E.C. 2.4.2.8), 2 U Nucleosid-Monophosphat-Kinase (E.C. 2.7.4.4), 2 U Guanylat-Kinase (E.C. 2.7.4.8), 8 U Pyruvat-Kinase (E.C. 2.7.1.40) in 4 ml Gesamtvolumen H₂O. Der Ansatz wurde bei 37 °C inkubiert und durch Zugabe von [3-¹³C]Ribulose-5-phosphat und Guanin (100 mM in 0,5 M NaOH) gestartet. Ribulose-5-phosphat und Guanin wurden laufend ergänzt, der pH mittels konz. HCl auf 7,8 gehalten und Phosphoenolpyruvat bei Bedarf nachgegeben. Die Reaktion wurde mittels Ionenpaar-HPLC an Hypersil RP18 5µm (Schamböck, 4 x 250 mm) überwacht. Als Laufmittel wurde 1 % Triethylammoniumphosphat pH 7,0 und 0,8 % Isopropanol in Wasser verwendet [95]. Als Detektor wurde ein Diodenarray UV-VIS Photometer (Hewlett Packard HP1504A) verwendet. Nach ca. 24 h wurde die Reaktion beendet. Die Lösung wurde auf 100 ml Gesamtvolumen mit Wasser verdünnt, der pH mit HCl auf 4,0 eingestellt und der entstandene Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine

Säule aus DEAE-Cellulose (DE-52, Whatman, 20 x 145 mm) aufgetragen, welche mit 30 mM LiCl pH 3,5 equilibriert worden war. Die Chromatographie wurde bei 4 °C durchgeführt und anhand der Extinktion bei 280 nm verfolgt. Der Fluß betrug 0,8 ml/min. Die Säule wurde mit 150 ml 30 mM LiCl pH 3,5 gespült. Innerhalb von 10 ml wurde ein linearer Gradient bis 7 % 1 M LiCl pH 3,5 und anschließend über 400 ml ein linearer Gradient bis 20 % 1 M LiCl pH 3,5 gemischt. GTP wurde zwischen 570 und 680 ml eluiert. Die vereinigten Fraktionen wurden lyophilisiert, der Rückstand in abs. Methanol aufgenommen und das darin schwerlösliche Lithiumsalz von GTP durch Zentrifugation abgetrennt. Das GTP wurde im Vakuum getrocknet. Als Ausbeute wurden 12,7 mg (23 µmol, 33 % bezogen auf Glucose) GTP bestimmt ($\epsilon_{252\text{nm}} = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [96].

2.7 Kinetische Messungen

2.7.1 Quenched-Flow Experimente

Alle Quenched-Flow Experimente wurden mit dem SF4/Q-Gerät von BioLogic (Claix, France) durchgeführt. Das Gerät verfügt über vier unabhängig voneinander steuerbare Spritzen und drei Mischer (Abb. 9). Das gesamte Gerät ist thermostatisierbar. Das Gerät wird über einen Personal Computer mit dem Programmpaket MPS (BioLogic) gesteuert.

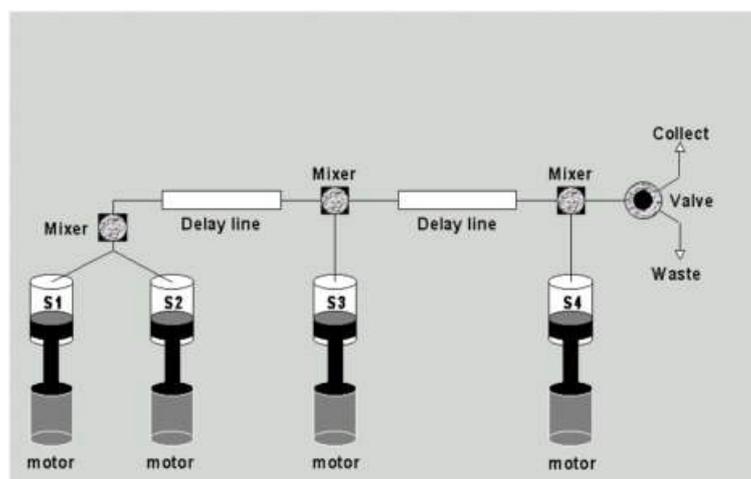


Abb. 9: Aufbau des Quenched-Flow Gerätes von BioLogic. S1-S4: computergesteuerte Spritzen. Delay Line: Auswechselbare Schleifen mit definiertem Volumen (für Quenched-Flow-Experimente 19 µl zwischen den ersten beiden Mixern und 190µl als Reaktionsloop).

Für Quenched-Flow Experimente wurde zwischen Mischer 1 und Mischer 2 ein delay loop mit 19 μl Volumen eingesetzt. Zwischen Mischer 2 und Mischer 3 wurde ein delay loop mit 190 μl Volumen (entspricht 230 μl Nominalvolumen) eingesetzt.

Für Quenched-Flow Experimente wurde das jeweilige Enzym über Nacht bei 4 °C gegen entgasten Reaktionspuffer dialysiert. Vor Gebrauch wurde die gesamte Apparatur mit Dialysepuffer gespült.

Spritze 1 wurde mit Dialysepuffer gefüllt. In Spritze 2 befand sich das Enzym in einer Konzentration von 2,5 bis 6 mg/ml. Spritze 3 wurde mit Substrat in Dialysepuffer gefüllt. Die Enzymkonzentration betrug das 1,5 bis dreifache der Substratkonzentration. Spritze 4 wurde mit 0,2 M TCA (Trichloressigsäure) als Quenchlösung gefüllt.

Zur Durchführung der Quenched-Flow Experimente wurde für das MPS-Programm die Parameter in Tab. 2 verwendet.

Phase	1	2	3	4	5	6	7
Zeit [ms]	345	20	75	125 -150000	125	12	100
Spritze 1 [μl]	690					48	200
Spritze 2 [μl]		40	150				
Spritze 3 [μl]			150				
Spritze 4 [μl]					500	48	200
Ventil	waste	waste	waste	waste	waste	waste	collect

Tab. 2: Parameter des MPS-Programmes zur Steuerung der Quenched-Flow Apparatur.

Computergesteuert wurde der zweite delay loop mit Reaktanden im Verhältnis 1:1 gefüllt und der Fluß gestoppt. Nach einer definierten Reaktionszeit wurde der Inhalt des delay loops im Verhältnis 1:1 mit TCA aus Spritze 4 gemischt und diese Mischung gesammelt. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert. Die gequenchte Reaktionsmischung wurde bis zur weiteren Analyse bei -70 °C gelagert.

2.7.2 Stopped-Flow Experimente

Alle Stopped-Flow Experimente wurden mit dem SF4/QS-Gerät von BioLogic (Claix, France) durchgeführt. Das Gerät verfügt über vier unabhängig voneinander steuerbare Spritzen und drei Mischer (Abb. 10) sowie eine Küvette mit 0,15 cm Lichtweg. Das gesamte Gerät ist thermostatisierbar. Das Gerät wird über einen Personal Computer mit dem Programmpaket MPS (BioLogic) gesteuert. Als Lichtquelle dient eine CLD 35 W Deuteriumlampe (J&M Analytische Meß- und Regeltechnik, Aalen). Die Aufnahme zeitabhängiger UV-Spektrenserien erfolgte mit einem TIDAS Diodenarray Photometer (J&M). Mit diesem Aufbau betrug das kleinste Messintervall 100 ms. Die Steuerung des Diodenarrayphotometers erfolgte mittels des Programmpaketes Spectralys 1.55 (J&M).

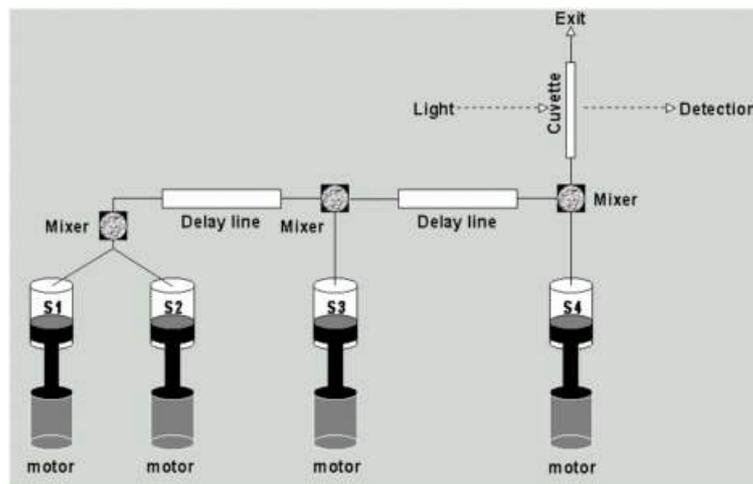


Abb. 10: Aufbau des Stopped-Flow Gerätes von BioLogic. S1-S4: computergesteuerte Spritzen. Delay Line: Auswechselbare Schleifen mit definiertem Volumen (beide Schleifen 19 μl für Stopped-Flow-Experimente).

Für Stopped-Flow Experimente wurde zwischen Mixer 1 und Mixer 2 sowie zwischen Mixer 2 und 3 ein delay loop mit 19 μl Volumen eingesetzt. Als Mixer 3 wurde der HDS-Mixer für Lösungen unterschiedlicher Dichte verwendet.

Für Stopped-Flow Experimente wurde das jeweilige Enzym über Nacht bei 4 °C gegen entgasten Reaktionspuffer dialysiert. Das verwendete Substrat wurde in geeigneter Konzentration in Dialysepuffer gelöst. Vor dem Befüllen der Apparatur wurden sämtliche Lösungen entgast und schwebstofffrei filtriert. Vor Gebrauch wurde die gesamte Apparatur mit Dialysepuffer gespült.

Die Spritzen 1 und 4 wurde mit Dialysepuffer gefüllt. In Spritze 2 befand sich das Enzym in einer Konzentration von 2,5 bis 6 mg/ml. Spritze 3 wurde mit Substrat in Dialysepuffer gefüllt. Die Substratkonzentration betrug das 1,5 bis dreifache der Enzymkonzentration.

Zur Durchführung der Stopped-Flow Experimente wurde folgendes MPS-Programm verwendet:

Phase	1	2	3	4
Zeit [ms]	85	250	15	50
Spritze 1 [µl]		500	30	
Spritze 2 [µl]				100
Spritze 3 [µl]				100
Spritze 4 [µl]		500		
Synchro 1	on	off	off	off

Tab. 3: Parameter des MPS-Programmes zur Steuerung der Stopped-Flow Apparatur.

Die Reaktanden wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Der Beginn der Messungen und der Stopp des Flusses wurden synchronisiert. Zur Aufnahme der Spektrenserien wurden folgende Parameter (Spectralys) verwendet:

Spektrum	220-400 nm
Integrationszeit	24 ms
Akkumulation	4
Aufnahmezeit	100 ms
Gruppierung	1
Autozero	Off
Trigger	External(2)
Shutter	Open for scan

Tab. 4: Zur Aufnahme der UV-Spektrenserien in Stopped-Flow Experimenten verwendete Parameter des Programms SPECTRALYS.

Ein Spektrum war das interne Mittel aus vier nacheinander innerhalb von 24 ms aufgezeichneter Einzelspektren.

Die erhaltenen Datensätze wurden mit dem Programm SPECFIT/32 (Spectrum Software Associates, Marlborough, MA, USA) ausgewertet. Mit diesem Programm ist es möglich, einen modellabhängigen globalen Fit für einen zeitabhängig aufgezeichneten kinetischen Datensatz zu errechnen.

3. Ergebnisse

3.1 Die GTP Cyclohydrolase I

3.1.1 Reinigung der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*

Die Reinigung der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* erfolgte durch Anionenaustausch-Chromatographie an Q Sepharose FF bei pH 7,5 in 20 mM Tris/HCl (Abb. 11). Die Elution erfolgte mittels KCl-Gradienten. Nach Entfernung gebundener Liganden (vor allem Dihydroneopterintriphosphat) mittels alkalischer Phosphatase wurde eine Hitzefällung durchgeführt. Nach einer weiteren Anionenaustausch-Chromatographie an Q Sepharose FF bei pH 6,5 in Bis-Tris/HCl erfolgte die abschließende Reinigung durch Gelfiltration an Sephacryl 200 (Abb. 12).

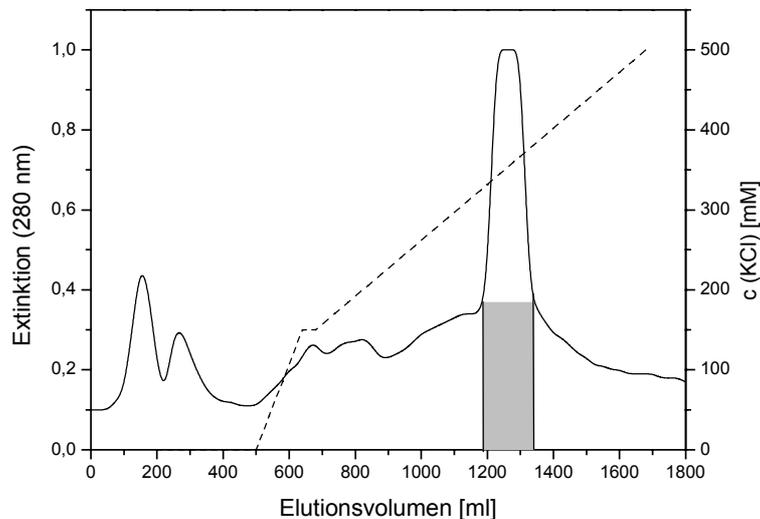


Abb. 11: Reinigung der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* an Q Sepharose FF. Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5.

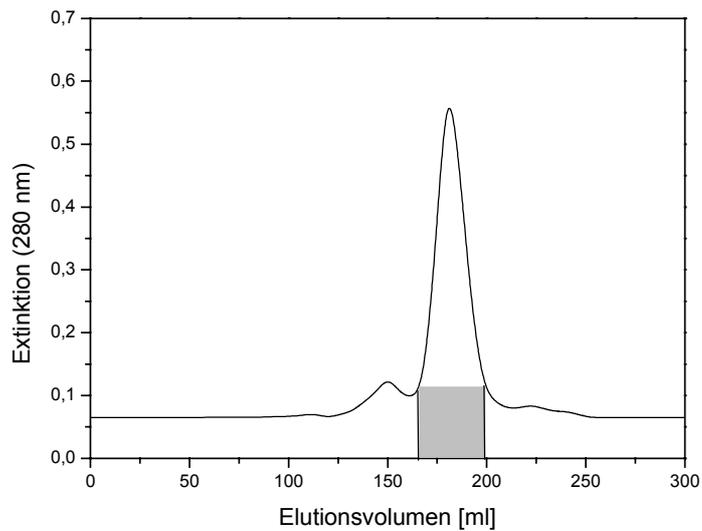


Abb. 12: Gelfiltration an S200. Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, 0,02 % NaN_3 .

Das nach der Gelfiltration erhaltene Protein war elektrophoretisch rein (Abb. 13).

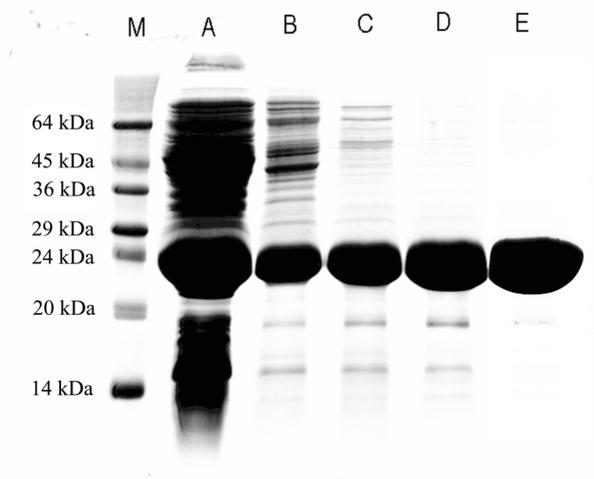


Abb. 13: Comassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel einzelner Reinigungsschritte von GTP Cyclohydrolase I aus *E.coli*. (A) Rohextraktüberstand, (B) nach 1. Q Sepharose FF, (C) nach Hitzefällung, (D) nach 2. Q Sepharose FF, (E) nach Sephacryl 200, (M) Molekulargewichtsstandard.

Der Verlauf der Reinigung wurde durch Aktivitätsbestimmungen der GTP Cyclohydrolase I verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Reinigungsstufe	Gesamtprotein [mg]	Aktivität [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]
Rohextrakt	1525	87
1. Q Sepharose	1000	109
Hitzefällung	700	n.d.
2. Q Sepharose	360	103
Gelfiltration	200	116

Tab. 5: Spezifische Aktivität der GTP Cyclohydrolase I während der Reinigung.

Bei anaerober Lagerung bei 4 °C in Tris-Puffer pH 8,5 war das Enzym über mehrere Monate stabil.

3.1.2 Untersuchungen zum Katalysezyklus der GTP Cyclohydrolase I

Die GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* ist ein Homodekamer. Ein aktives Zentrum wird aus je drei Monomeren (A, B und C) gebildet. An der Berührungsfläche dreier Monomere befinden sich die konservierten Reste C110^A, E111^A, H112^A, H113^A, V150^A, Q151^A, E152^A, R153^A, H179^A, C181^A, R185^A, I132^B, L134^B, S135^B, K136^B, R139^B, R65^C und K68^C. Eine GTP Cyclohydrolase I, welche die Mutationen C110S, S135H und R65A enthält, ist inaktiv. Eine mutierte Untereinheit führt zur Inaktivierung aller aktiven Zentren, an deren Bildung sie beteiligt ist [97].

Untersuchungen von Yim *et al.* zeigten, dass die GTP Cyclohydrolase I unter Bildung von Dimeren dissoziieren kann [98]. Die Bindung von GTP, ATP oder auch Orthophosphat führt zur Reassoziierung und Bildung eines Dekamers. Es wäre daher denkbar, dass während des Katalysezykluses Dissoziation und Assoziation der Untereinheiten stattfindet. Wird die enzymatische Reaktionen mit Mischungen nativer GTP Cyclohydrolase I und der GTP Cyclohydrolase I Mutante C110S/S135H/R65A durchgeführt, so sollte die Dissoziation und Reassoziierung der Untereinheiten der GTP Cyclohydrolase I statistisch zu einem aus aktiven

und inaktiven Untereinheiten zusammengesetzten Enzym führen. Da eine inaktive Untereinheit in einem Dekamer zur Inaktivierung von drei aktiven Zentren führt, sollte abhängig vom Verhältnis Enzym:Mutante das resultierende Dekamer inaktiv sein oder zumindest eine sehr stark verringerte Aktivität zeigen.

Es wurden 30 µg native GTP Cyclohydrolase I in unterschiedlichen Verhältnissen mit mutierter GTP Cyclohydrolase I gemischt und bei 37 °C im Photometer zusammen mit GTP inkubiert. Gemessen wurde die Bildung von Dihydroneopterintriphosphat durch Bestimmung der Extinktionszunahme bei 330 nm. Als Referenz wurde GTP mit nativer GTP Cyclohydrolase I inkubiert (Tab. 6).

Enzymmischung	Spezifische Aktivität [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]
wt	16,6
wt : Mutante 1:1	16,6
wt : Mutante 1:2	17,0
wt : Mutante 1:3	16,6

Tab. 6: Spezifische Aktivitäten unterschiedlicher Mischungen von Wildtyp GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* mit inaktivem Mutantenprotein. Die Aktivität wurde in Puffer 20 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl bei 30 °C bestimmt. wt: Wildtyp-Enzym.

Die Aktivität der GTP Cyclohydrolase I wird durch Zugabe des mutierten Enzyms nicht verringert. Auch der dreifache Überschuß an mutiertem Enzym verringert die Aktivität der GTP Cyclohydrolase I nicht.

Da die GTP Cyclohydrolase I ein relativ temperaturstabiles Enzym ist, konnte die Inkubation auch bei 55 °C durchgeführt werden. Auch bei dieser Temperatur konnte keine Verminderung der Aktivität des Enzyms festgestellt werden (Tab. 7).

Enzymmischung	Spezifische Aktivität [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]
wt	104
wt : Mutante 1:3	104

Tab. 7: Spezifische Aktivität einer Mischung von Wildtyp GTP Cyclohydrolase I aus *E.coli* mit inaktivem Mutantenprotein. Die Aktivität wurde in Puffer 20 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl bei 55 °C bestimmt.

Um eine evtl. stattfindende langsame Dissoziation und Assoziation der Untereinheiten auszuschließen, wurde natives Enzym zusammen mit mutierter Cyclohydrolase I 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die enzymatische Aktivität bei 55 °C bestimmt. Es konnte keine Verringerung der enzymatischen Aktivität festgestellt werden (Tab. 8).

Enzymmischung	Spezifische Aktivität [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]
wt	156
wt : Mutante 1:3	177

Tab. 8: Spezifische Aktivität einer 1:3 Mischungen von Wildtyp GTP Cyclohydrolase I aus *E.coli* mit inaktivem Mutantenprotein. Die Proteinmischung wurde 2 h bei 37 °C vorinkubiert. Die Aktivität wurde in Puffer 20 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl bei 55 °C bestimmt.

3.1.3 Eigenschaften der GTP Cyclohydrolase I aus *Aquifex aeolicus*

Zur näheren Untersuchung der Reaktion der GTP Cyclohydrolase I wurde ein Enzym gesucht, dessen Aktivität sich über die Reaktionstemperatur leicht in einem weiten Bereich steuern ließ. Es bot sich die von Fischer klonierte GTP Cyclohydrolase aus *Aquifex aeolicus*, einem hyperthermophilen Organismus, an. Für die folgenden kinetischen Untersuchungen wurde Rohextrakt nach Hitzefällung (65 °C, 10 min) verwendet.

3.1.3.1 Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität

Die Substratabhängigkeit der GTP Cyclohydrolase I aus *A. aeolicus* wurde photometrisch durch Messung der Extinktionszunahme bei 330 nm bestimmt. Als Puffer wurde 100 mM Tris/HCl pH 8,0 und 100 mM KCl verwendet (Abb. 14).

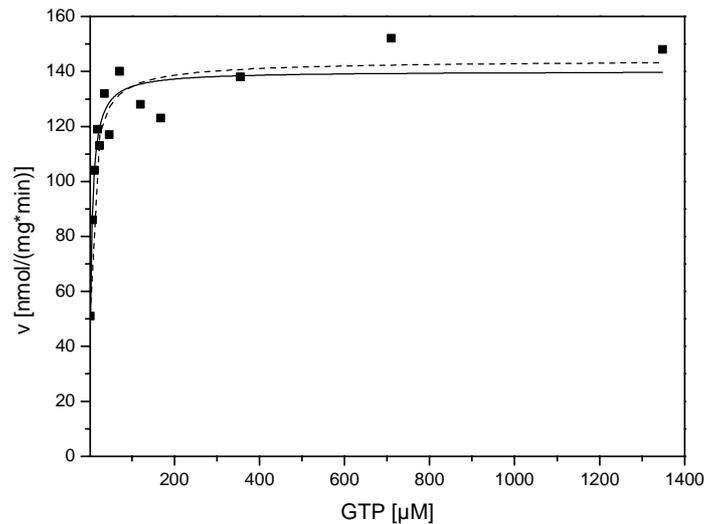


Abb. 14: Substratabhängigkeit der GTP Cyclohydrolase I aus *A. aeolicus*. Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 0,02 % Natriumazid. Reaktionstemperatur: 60 °C. ■, experimentelle Daten; —, Michaelis-Menten Anpassung; ---, Hill-Anpassung.

Die Aktivitäts-Konzentrations-Kurven wurden mittels eines Michaelis-Menten Modells gefittet (Abb. 14, —). Der K_M -Wert beträgt $4,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$, v_{max} beträgt $140 \pm 1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei 60 °C. Wird eine Hill-Funktion zur Anpassung der Daten verwendet, ergibt sich ein scheinbarer K_M -Wert von $4,1 \pm 0,8 \mu\text{M}$, v_{max} beträgt $144 \pm 6 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Abb. 14, ---). Der Hillkoeffizient ergibt sich zu $0,82 \pm 0,15$. Aufgrund der relativ schlechten Daten lässt sich nicht zwischen dem Michaelis-Menten Modell und dem kooperativen Modell nach Hill unterscheiden.

3.1.3.2 Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Aktivität

Bestimmt wurde die Temperaturabhängigkeit der GTP Cyclohydrolase I aus *A. aeolicus*. Die Bestimmung erfolgte photometrisch durch Messung der Extinktionszunahme bei 330 nm. Als Puffer wurde 100 mM Tris/HCl pH 8,0 und 100 mM KCl verwendet (Abb. 15).

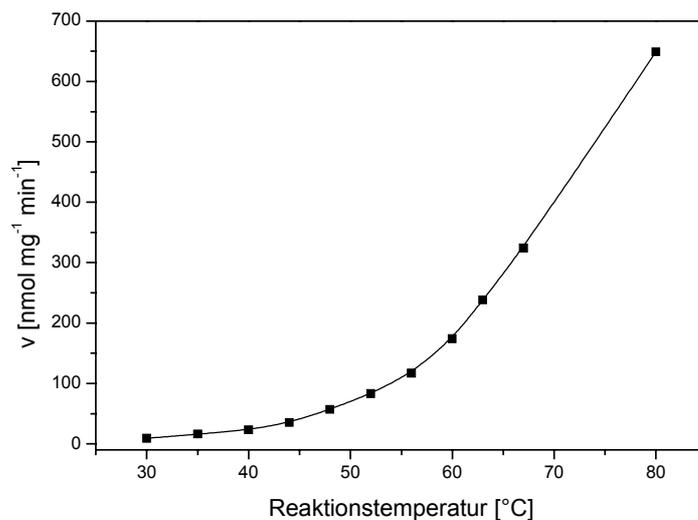


Abb. 15: Temperaturabhängigkeit der GTP Cyclohydrolase I aus *A. aeolicus*. Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 0,02 % Natriumazid. Reaktionstemperatur: 60 °C.

Bei 30 °C beträgt die spezifische Aktivität der GTP Cyclohydrolase I aus *A. aeolicus* etwa 9 nmol mg⁻¹ min⁻¹. Das Enzym aus *A. aeolicus* zeigt bis etwa 60 °C eine exponentielle Zunahme der Aktivität. Ab ca. 60 °C zeigt die GTP Cyclohydrolase I einen linearen Anstieg der Aktivität. Bei 80 °C beträgt die spezifische Aktivität ca. 660 nmol mg⁻¹ min⁻¹.

3.1.4 Enzymatische Eigenschaften der GTP Cyclohydrolase I E111Q/V182M

Von der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* sind verschiedene Mutanten bekannt, deren enzymatische Produkte Intermediate der Gesamtreaktion darstellen. So führt die Mutation H179A zu einem Enzym, das GTP zu hGTP in einer Gleichgewichtsreaktion umsetzt [63]. Die Mutationen E111Q oder R185A hingegen führen zu Enzymen, welche das

Diaminopyrimidin-Derivat (Intermediat **28**, Abb. 5) anreichern [61]. Dieses Produkt entsteht jedoch nur in sehr geringer Menge. Von S. Schiffmann wurde eine GTP-Cyclohydrolase I Mutante kloniert, welche die beiden Mutationen E111Q/V182M trägt. *In vivo* Tests im riboflavinautotrophen *E. coli* Stamm *rib7* zeigten, dass dieses doppelt mutierte Enzym in der Lage war, den Stamm zu prototrophieren.

Zur näheren Charakterisierung der GTP Cyclohydrolase I E111Q/V182M wurde das Protein analog zum Wildtyp-Enzym gereinigt und die Umsetzung von GTP mit der gereinigten Mutante E111Q/V182M photometrisch untersucht. Die Reaktion erfolgte in 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl bei 30 °C. Abb. 16A zeigt UV-Spektren einer Mischung von Enzym und GTP im molaren Verhältnis 1:1,5, aufgenommen nach 0, 20, 40 und 130 min. Im Lauf der Reaktion sinkt die Extinktion bei 254 nm ab. Bei 330 nm nimmt die Extinktion langsam zu. Besonders deutlich zeigen sich die Extinktionsänderungen im Differenzspektrum (Abb. 16B). Unter diesen Reaktionsbedingungen ist deutlich die Umwandlung von GTP zu Dihydroneopterintriphosphat zu erkennen. Die Reaktionsgeschwindigkeit beträgt etwa $0,04 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

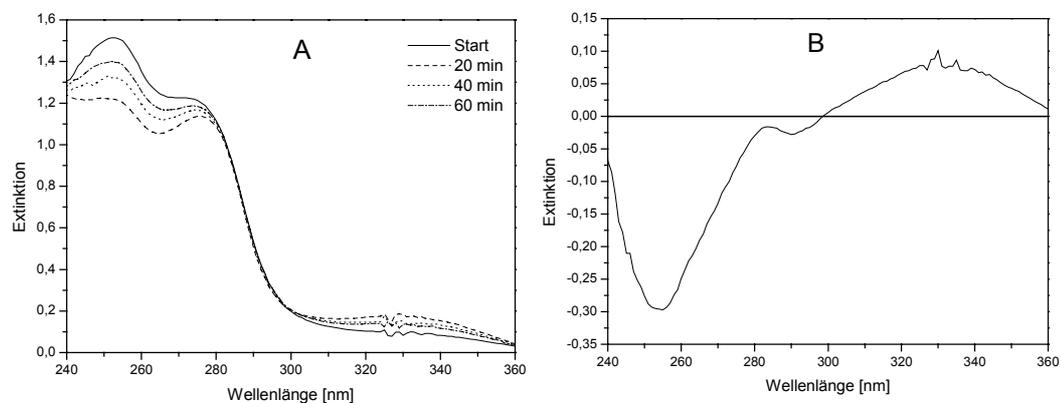


Abb. 16: A: UV-Spektren der Umsetzung von GTP mit der E111Q/V182M Mutante der GTP Cyclohydrolase I (Enzym:Substrat 1:1,5 in 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl, 30°C). B: Extinktionsdifferenz der Spektren zu Beginn der Reaktion und nach 60 min Reaktionszeit.

Abb. 17 zeigt UV-Spektren einer Mischung von GTP und GTP Cyclohydrolase I E111Q/V182M im molaren Verhältnis 0,3:1 bezogen auf die aktiven Zentren des Enzyms. Die Reaktion erfolgte in 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl bei 30 °C. Die Spektren wurden im Abstand von 20 min aufgenommen. Deutlich ist die Abnahme der Extinktion bei 254 nm zu sehen, ein pseudo-isosbestischer Punkt bei 278 nm sowie die Zunahme der

Extinktion bei 285 nm. Das UV-Spektrum zu Beginn der Reaktion zeigt das Substrat GTP. Das letzte UV-Spektrum zeigt 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinontriphosphat, das Produkthomologe der GTP Cyclohydrolase II. Die Ratenkonstante der Gesamtreaktion von GTP zum Diaminopyrimidinonderivat beträgt etwa $0,3 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

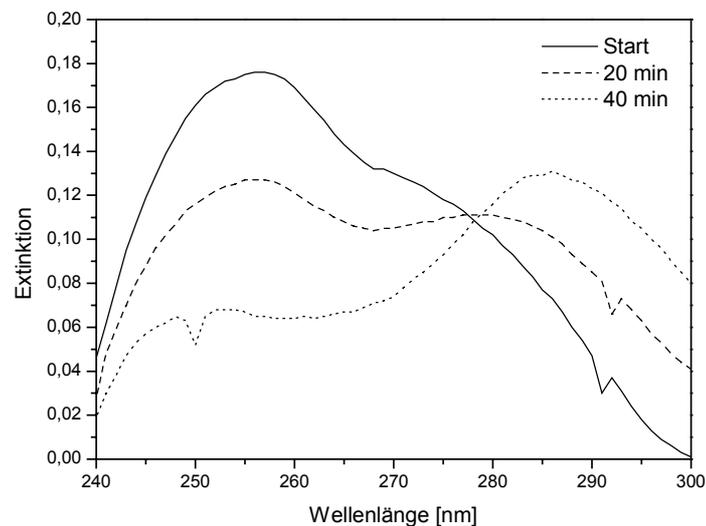


Abb. 17: UV-Spektren der Umsetzung von GTP mit der E111Q/V182M Mutante der GTP Cyclohydrolase I (Enzym:Substrat 1:0,3 in 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl, 30 °C).

3.1.5 Bestimmung des Gleichgewichtes im ersten Schritt der GTP Cyclohydrolase I Reaktion

Die enzymatische Reaktion der GTP Cyclohydrolase I beginnt mit dem Angriff eines Hydroxyl-Ions (aktiviertes Wasser) an C-8 von GTP und nachfolgender Hydrolyse der Bindung zwischen C-8 und N-9. Produkt dieser Reaktion ist 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinontriphosphat (hGTP, Intermediat **27**, Abb. 5).

Die Mutante H179A der GTP Cyclohydrolase I von *E. coli* ist nur noch in der Lage, diesen ersten Schritt der Reaktion zu katalysieren. Enzymatisches Produkt dieser Mutante ist hGTP (**27**). Untersuchungen von Bracher zeigten, dass diese Reaktion eine Gleichgewichtsreaktion ist [63]. Die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion beträgt 0,1 bei pH 7,0 und 30 °C. Für die spätere Optimierung der Parameter aus Quenched- und Stopped-

Flow Experimenten wurde der Wert der Gleichgewichtskonstanten bei pH 8,5 benötigt. Es erfolgte daher eine erneute Bestimmung des Gleichgewichtes.

Dazu wurden 1 mM GTP in 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl 10 min bei 30 °C im Photometer temperiert. Nach Zugabe von 30 µg Enzym wurden alle 20 s UV Spektren von 220 bis 400 nm aufgenommen. Nach Einstellung des Gleichgewichtes nach ca. 20 min wurde die Extinktionsdifferenz gebildet und mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten für GTP ($\epsilon_{254\text{nm}} = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{272\text{nm}} = 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und hGTP ($\epsilon_{272\text{nm}} = 14200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{254\text{nm}} = 5650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die Gleichgewichtskonstante berechnet.

Der für die Gleichgewichtsreaktion ermittelte Wert beträgt 0,15 bei pH 8,5 und 30 °C.

3.1.6 Quenched-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*

Mittels Quenched-Flow Technik lassen sich temperierte Reaktanden schnell mischen. Nach definierten Zeiten kann die Reaktion mittels einer Quenchlösung gestoppt werden. Die gequenchte Reaktionslösung kann anschließend mit verschiedenen Methoden analysiert werden.

Durch Quenched-Flow sollte die stöchiometrische Umsetzung von GTP mit GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* untersucht werden. Die Quenched-Flow Experimente wurden in 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl und 0,002 % Natriumazid als Reaktionspuffer durchgeführt. Die Spritze 1 war mit Reaktionspuffer gefüllt. Spritze 2 enthielt [8-¹⁴C]GTP in Reaktionspuffer. Spritze 3 enthielt das Enzym in Reaktionspuffer. Spritze 4 enthielt 0,2 M Trichloressigsäure (TCA) als Quenchlösung.

Aus steady-state Kinetiken war bekannt, daß die GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* negative Kooperativität mit einem Hill-Koeffizienten von 0,54 zeigt [63]. Um den Einfluß der negativen Kooperativität zu minimieren wurde ein etwa dreifacher Enzymüberschuß bezogen auf die aktiven Zentren gegenüber dem Substrat verwendet.

Die Reaktionszeit wurde zwischen 100 ms und 150 s variiert. Die minimale Reaktionszeit von 100 ms ergab sich aus der Zeit die benötigt wurde, um den Reaktionsloop mit Puffer zu spülen und anschließend mit Reaktionslösung zu füllen.

Die Auftrennung der gequenchten Reaktionslösung erfolgte mit HPLC an Hypersil RP-18. Die Detektion der Produkte erfolgte photometrisch mittels Dioden-Array-Photometer und einem Durchflußzintillationsdetektor. Die Detektion von GTP erfolgte sowohl photometrisch bei 254 nm als auch mittels Riodetektion. Die Detektion von 2-Amino-5 formylamino-6-

ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinontriphosphat (hGTP, Intermediat **27**, Abb. 5) erfolgte ausschließlich durch Radiodetektion. Aufgrund der geringen Konzentration, in der dieses Intermediat auftrat, war eine photometrische Detektion nicht möglich. Die Detektion von Formiat erfolgte mittels Radiodetektion. Die Bestimmung von Dihydroneopterin-triphosphat erfolgte durch photometrische Detektion bei 330 nm. Abb. 18 zeigt typische Chromatogramme der photometrischen Detektion, in Abb. 19 ist ein Chromatogramm der Radio-Detektion gezeigt.

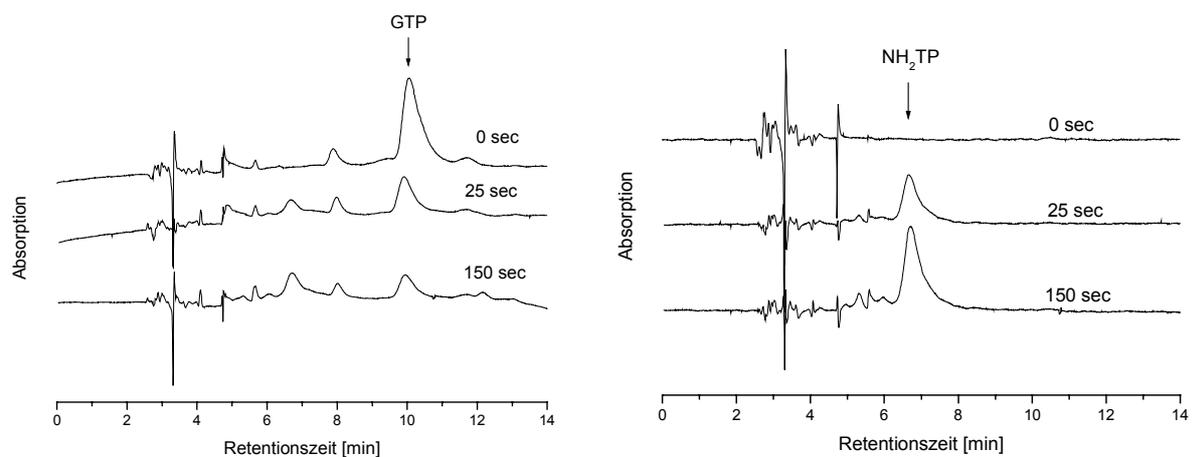


Abb. 18: Typische HPLC-Chromatogramme zur Detektion von GTP (linkes Chromatogramm, $\lambda = 254$ nm) bzw. NH₂TP (rechtes Chromatogramm, $\lambda = 330$ nm). Gezeigt sind jeweils Chromatogramme zu Reaktionsbeginn (0 s), nach 25 s und 150 s Reaktionszeit. Die Trennung erfolgte an Hypersil RP18 5 μ . Als Eluent wurde Triethylamin/Phosphorsäure 85%ig/Isopropanol/Wasser 10:5:3:982 pH 7,0 verwendet.

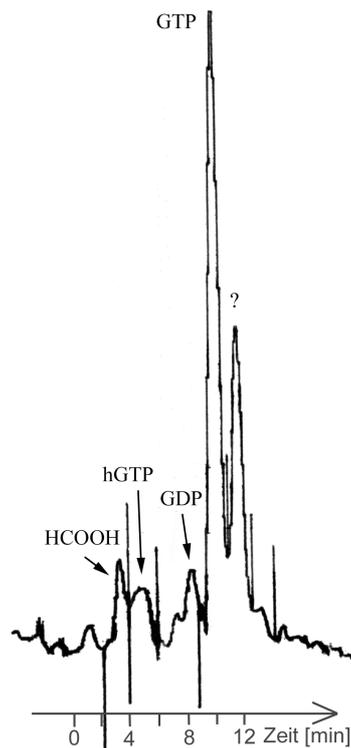


Abb. 19: Radiochromatogramm einer gequenchten GTP Cyclohydrolase I Reaktionslösung (Reaktionszeit: 1 s.). Die Trennung erfolgte an Hypersil RP18 5 μ m. Als Eluent wurde Triethylamin/Phosphorsäure 85%ig/Isopropanol/Wasser 10:5:3:982 pH 7,0 verwendet (der mit „?“ gekennzeichnete Peak stellt eine nicht charakterisierte Verunreinigung dar).

Ein weiteres Zwischenprodukt der Reaktion, vermutlich ein Triaminopyrimidindiontriphosphat, konnte zwar photometrisch detektiert werden, aufgrund der Qualität der HPLC-Chromatogramme konnte die Konzentration jedoch nicht quantitativ ausgewertet werden. Die Summe der Konzentrationen aller Spezies muß zu jedem Zeitpunkt gleich der Konzentration an Edukt sein. Daher wurde die „Molsummendifferenz“, d.h. die Konzentrations-Differenz der Summe aller detektierbaren Spezies und der GTP Konzentration zu Beginn der Reaktion, berechnet. Abb. 20 zeigt die experimentell gefundenen Konzentrations-Zeit Daten und die berechnete Molsummendifferenz.

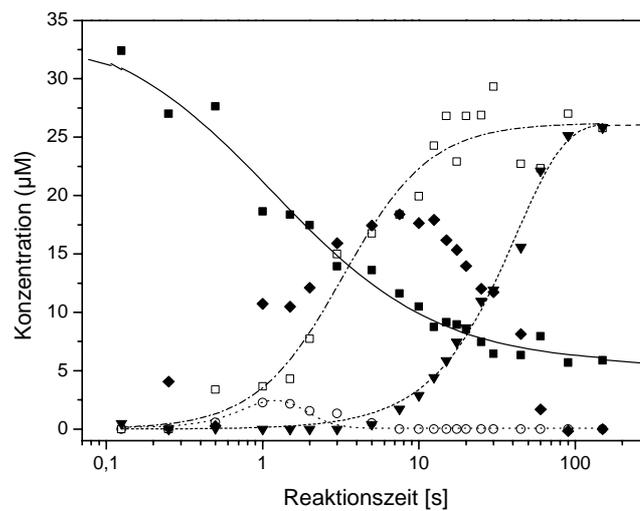


Abb. 20: Stöchiometrische Reaktion der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*. GTP (■), hGTP (○), Formiat (□), Dihydroneopterintriphosphat (▼), „Molsummendifferenz“ (◆). Die Kurven wurden exponentiell angenähert.

Trotz eines dreifachen Enzymüberschusses gegenüber der Substratkonzentration wurde GTP innerhalb von 150 s Reaktionszeit nicht vollständig umgesetzt. Etwa 15 % des eingesetzten GTPs bleibt als konstanter Offset erhalten. Diese 15 % Rest-GTP spiegeln möglicherweise den Anteil an aktiven Zentren wieder, die kein Zink besitzen. Diese Zink-freien aktiven Zentren können im Vergleich mit Zink-beladenen Zentren die gleiche Affinität zu GTP aufweisen, sie können die Reaktion jedoch nicht katalysieren.

Von verschiedenen Enzympräparationen wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) der Zink-Gehalt bestimmt. Typischerweise wurde ein Zink-Gehalt von etwa 0,8 bezogen auf die aktiven Zentren gefunden. Substöchiometrische Umsetzungen der gleichen Enzympräparationen mit GTP zeigten nach 3 min Reaktionszeit bei 30 °C einen Rest-GTP Gehalt von etwa 15 %.

Zur Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven wurden die experimentellen GTP Werte entsprechend korrigiert.

Die experimentellen Daten zeigen eine offensichtlich schnelle Abnahme der GTP Konzentration. Nach ca. 2 s sind bereits 50 % GTP umgesetzt, nach etwa 15 s ist die GTP Umsetzung vollständig. Bereits nach 500 ms lässt sich hGTP als ein sehr frühes Intermediat detektieren, das nach 1 s seine maximale Konzentration erreicht und innerhalb von 5 s unter die Detektionsgrenze fällt. Formiat steigt sehr schnell an und erreicht nach etwa 12 bis 15 s seine Endkonzentration. Das Endprodukt der enzymatischen Reaktion,

Dihydroneopterintriphosphat erreicht erst nach 30 s seine halbmaximale Konzentration. Nach etwa 120 s erreicht Dihydroneopterintriphosphat seine Endkonzentration.

Aus den oben gewonnenen experimentellen Daten wurden nun die Geschwindigkeitskonstanten berechnet. Dazu wurden kinetische Modelle der enzymatischen Reaktion aufgestellt und mit Hilfe des Programms SCIENTIST 2.02 (MicroMath, Inc.) numerische Simulationen durchgeführt.

Formiat stellt in Bezug auf die von der GTP Cyclohydrolase I katalysierten Reaktion ein Endprodukt dar. Unter single turnover Bedingungen läßt sich die enzymatische Reaktion der GTP Cyclohydrolase I daher durch die Gleichung in Abb. 21 vereinfacht darstellen.



Abb. 21 Vereinfachtes Schema der GTP Cyclohydrolase I Reaktion.

Dieses System lässt sich durch folgendes Differentialgleichungssystem beschreiben:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{GTP}]}{dt} &= -k_1 \cdot [\text{GTP}] + \frac{k_1}{K} \cdot [\text{hGTP}] \\ \frac{d[\text{hGTP}]}{dt} &= k_1 \cdot [\text{GTP}] - \frac{k_1}{K} \cdot [\text{hGTP}] - k_3 \cdot [\text{hGTP}] \\ \frac{d[\text{Formiat}]}{dt} &= k_3 \cdot [\text{hGTP}] \\ K &= \frac{k_1}{k_2} = \frac{[\text{hGTP}]_{eq}}{[\text{GTP}]_{eq}} \end{aligned}$$

Die Parameter c_0 , k_1 , k_3 und K dieses Differentialgleichungssystems wurden nun mit Hilfe des Programms SCIENTIST 2.02 berechnet. Zugrundegelegt wurden die experimentellen Konzentrations-Zeit Daten aus den Quenched-Flow Experimenten. Die GTP Konzentration wurde durch Subtraktion des nichtumgesetzten GTPs korrigiert. Es wurden folgende Startbedingungen festgelegt:

$$c_0(\text{GTP}) = 27 \mu\text{M}$$

$$c_0(\text{hGTP}) = c_0(\text{Formiat}) = 0$$

$$K = 0,15$$

$$k_1 = 0,5$$

$$k_3 = 2$$

Die numerische Simulation des Gleichungssystems erfolgte zu Beginn durch das Stiff-Integrator System, welches relativ schnell ist. Durch abwechselndes Fixieren und Freigeben einzelner Konstanten während der Simulation wurden die Konstanten angepasst. Die letzten Rechnungen erfolgten mit Hilfe des Bulirsch-Stoer Modells. Dabei wurden sämtliche Konstanten freigegeben. Dieses Modell zur numerischen Lösung von Differentialgleichungssystemen ist sehr langsam, bringt jedoch die besten Ergebnisse. Das Ergebnis der numerischen Simulation ist in Abb. 22 gezeigt, die Konstanten des Fits sind in Tab. 9 zusammengefasst.

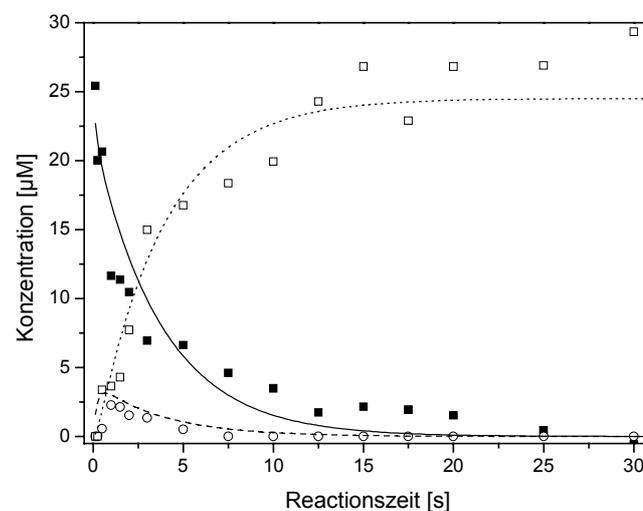


Abb. 22: Vereinfachtes Modell der GTP Cyclohydrolase I Reaktion. Experimentell gefundene Werte sind wie folgt markiert: GTP (■), hGTP (○), Formiat (□). Die Konzentrationsprofile des Modells aus Abb. 21 sind als Linien gezeichnet.

Konstante	Wert
k_1	$0,7 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$
k_2	$2,7 \text{ s}^{-1}$
k_3	$2,0 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$
K	$0,29 \pm 0,16$
$c_0 \text{ (GTP)}$	$24,4 \pm 0,5 \text{ }\mu\text{M}$

Tab. 9: Kinetische Konstanten aus single turnover Experimenten mit GTP Cyclohydrolase I von *E. coli*. Es wurde das vereinfachte Formelschema aus Abb. 21 zugrundegelegt.

Die Konzentration von hGTP erreicht nach etwa 1 s ein Maximum. Der Quotient aus hGTP und GTP ist in Abb. 23 gezeigt. Der Quotient zeigt einen Wert zwischen 0,15 bis 0,2 und liegt damit im Bereich der Gleichgewichtskonstante. Da die Bestimmung der hGTP-Konzentration durch Überlappung mit dem Formiat-Signal relativ ungenau ist (Abb. 19), ist auch die berechnete Gleichgewichtskonstante mit einem sehr hohen Fehler behaftet.

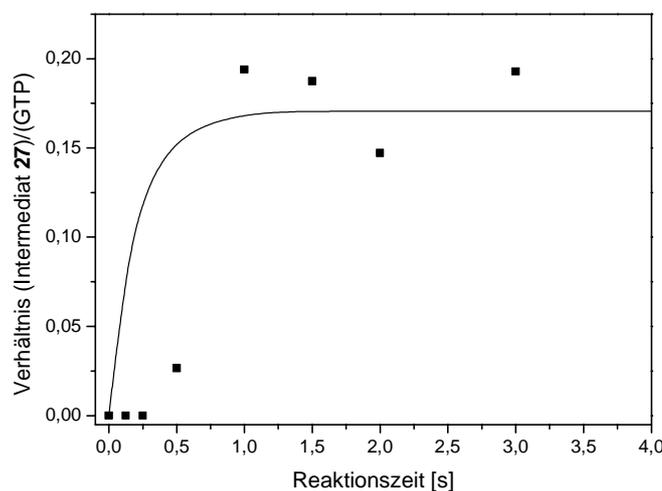


Abb. 23: Quotient aus hGTP (27) und GTP (5). ■, Quotient der experimentellen Daten; —, Quotient der Daten aus der numerischen Optimierung (Abb. 22).

Die Bildung von Intermediat 28 aus hGTP (27) erfolgt mit der gleichen Ratenkonstante wie die Bildung von Formiat aus hGTP (27). Die Bildung des enzymatischen Produktes der

Reaktion, Dihydroneopterintriphosphat (NH_2TP , **6**), erfolgt aus Intermediat **28**. Durch eine Kondensationsreaktion wird der Dihydropterinring aufgebaut. Dieser letzte Schritt erfolgt über verschiedene Zwischenstufen. Durch Erweiterung des Schemas in Abb. 21 lässt sich die Reaktion durch das kinetische Schema in Abb. 24 beschreiben:

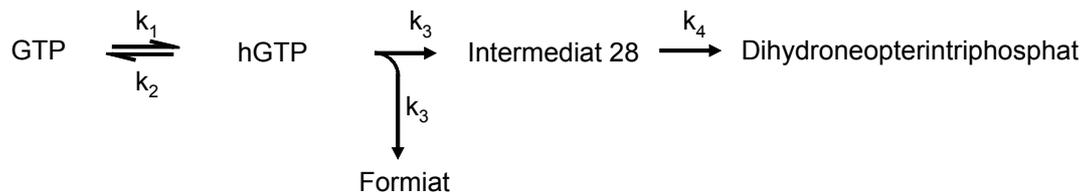


Abb. 24: Kinetisches Schema der GTP Cyclohydrolase I Reaktion.

Dieses kinetische Schema lässt sich durch folgendes Differentialgleichungssystem beschreiben:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{GTP}]}{dt} &= -k_1 \cdot [\text{GTP}] + \frac{k_1}{K} \cdot [\text{hGTP}] \\ \frac{d[\text{hGTP}]}{dt} &= k_1 \cdot [\text{GTP}] - \frac{k_1}{K} \cdot [\text{hGTP}] - k_3 \cdot [\text{hGTP}] \\ \frac{d[\text{Intermediat 28}]}{dt} &= k_3 \cdot [\text{hGTP}] - k_4 \cdot [\text{Intermediat 28}] \\ \frac{d[\text{Formiat}]}{dt} &= k_3 \cdot [\text{hGTP}] \\ \frac{d[\text{NH}_2\text{TP}]}{dt} &= k_4 \cdot [\text{Intermediat 28}] \\ K &= \frac{k_1}{k_2} = \frac{[\text{hGTP}]_{eq}}{[\text{GTP}]_{eq}} \end{aligned}$$

Die Parameter c_0 , k_1 , k_3 , k_4 und K dieses Differentialgleichungssystems wurden mit Hilfe des Programms SCIENTIST 2.02 berechnet. Zugrundegelegt wurden die experimentellen Konzentrations-Zeit Daten aus den Quenched-Flow Experimenten. Die GTP Konzentration wurde durch Subtraktion des nichtumgesetzten GTPs korrigiert. Da für das Intermediat **28** keine experimentellen Daten vorlagen, wurde die Molsummendifferenz gebildet. Dazu wurde die Summe der Konzentrationen aller detektierbaren Spezies gebildet

und die Differenz dieser Summe und der Startkonzentration an GTP gebildet. Die Molsummendifferenz entspricht der Konzentration aller Spezies, die zwischen hGTP und dem Produkt Dihydroneopterintriphosphat in der Reaktionstrajektorie auftreten können. Als Startbedingungen wurden die mit Hilfe des vereinfachten kinetischen Schemas berechneten Konstanten verwendet.

$$c_0(\text{GTP}) = 24,4 \mu\text{M}$$

$$c_0(\text{hGTP}) = c_0(\text{Formiat}) = 0$$

$$K = 0,29$$

$$k_1 = 0,7$$

$$k_3 = 2,0$$

$$k_4 = 0,01$$

Die numerische Simulation des Gleichungssystems erfolgte wie oben am Beispiel des vereinfachten Systems gezeigt. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abb. 25 gezeigt, die Parameter der numerischen Optimierung sind in Tab. 10 zusammengefasst.

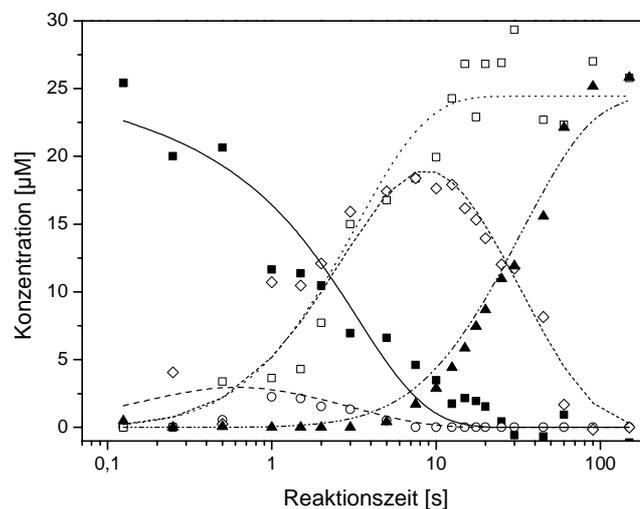


Abb. 25: Modell der GTP Cyclohydrolase I Reaktion. Experimentell gefundene Werte sind wie folgt markiert: GTP (■), hGTP (○), Formiat (□), „Molsummendifferenz“ (◇), Dihydroneopterintriphosphat (▲). Die Konzentrationsprofile des Modells aus Abb. 24 sind als Linien gezeichnet.

Konstante	Wert
k_1	$0,9 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$
k_2	$5,3 \text{ s}^{-1}$
k_3	$2,0 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$
k_4	$0,03 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$
K	$0,17 \pm 0,1$
$c_0(\text{GTP})$	$24,4 \pm 0,4 \text{ }\mu\text{M}$

Tab. 10: Kinetische Konstanten aus single turnover Experimenten mit GTP Cyclohydrolase I von *E.coli*. Es wurde das kinetische Schema aus Abb. 24 zugrundegelegt.

Die Ratenkonstante der Bildung von Dihydroneopterintriphosphat ist mit $0,03 \text{ s}^{-1}$ die kleinste Ratenkonstante der Gesamtreaktion. Die Werte der restlichen Konstanten stimmen im Rahmen des Fehlers mit den im vereinfachten Fit gefundenen Werten überein (Tab. 11). Die relativ großen Fehler bei der Gleichgewichtskonstante und damit bei k_2 ergeben sich wie oben beschrieben durch die Ungenauigkeit bei der Bestimmung der hGTP Konzentrationen.

Konstante	vereinfachtes Schema (Abb. 21)	Gesamtreaktion (Abb. 24)
k_1	$0,7 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$	$0,9 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$
k_2	$2,7 \text{ s}^{-1}$	$5,3 \text{ s}^{-1}$
k_3	$2,0 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$	$2,0 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$
k_4	---	$0,03 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$
K	$0,29 \pm 0,16$	$0,17 \pm 0,1$
$c_0(\text{GTP})$	$24,4 \pm 0,5 \text{ }\mu\text{M}$	$24,4 \pm 0,4 \text{ }\mu\text{M}$

Tab. 11: Gegenüberstellung der berechneten kinetischen Konstanten. Links die nach dem vereinfachten kinetischen Schema nach Abb. 21 berechneten Konstanten, rechts die Werte der Gesamtreaktion nach Abb. 24.

3.1.7 Stopped-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase I aus *E.coli*

Mittels Stopped-Flow Technik lassen sich temperierte Reaktanden schnell mischen. Die Reaktionslösung lässt sich nach einer minimalen Totzeit mittels UV-Spektroskopie beobachten. Alle 0,1 s wird von der Reaktionsmischung ein UV-Spektrum aufgenommen. Wird Substrat in stöchiometrischem Verhältnis eingesetzt, lässt sich die Umwandlung einer Generation von Substrat zeitaufgelöst beobachten. Unter der Voraussetzung, dass sich die katalytischen Zentren gegenseitig nicht beeinflussen, lässt sich die Reaktion analog einer Reaktion in freier Lösung behandeln. Aus den erhaltenen UV-Spektrenfolgen lassen sich die Ratenkonstanten enzymatischer Teilschritte berechnen.

Durch Stopped-Flow Experimente sollte die stöchiometrische Umsetzung von GTP mit GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* untersucht werden. Die Stopped-Flow Experimente wurden in 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM KCl und 0,002 % Natriumazid als Reaktionspuffer durchgeführt.

Aus steady-state Kinetiken war bekannt, daß die GTP Cyclohydrolase I negative Kooperativität mit einem Hill-Koeffizienten von 0,54 zeigt [63]. Um den Einfluß der negativen Kooperativität zu minimieren wurde ein 1,2 bis dreifacher Enzymüberschuß bezogen auf die aktiven Zentren gegenüber dem Substrat verwendet. Die Reaktionszeit wurde zwischen 100 ms und 360 s variiert.

Um den Hintergrund, d.h. Absorption durch Puffer, Enzym usw. eliminieren zu können, wurden alle Experimente unter gleichen Bedingungen zweimal durchgeführt. Durch Mischen von Enzym und Substrat wurde ein Datensatz erhalten, der die Extinktionsänderung des gesamten Systems enthielt. In einem zweiten Experiment wurde durch Mischen von Enzym und Puffer die Extinktionsänderung des Hintergrunds, verursacht durch Enzym und Puffer, erhalten. Die beiden so erhaltenen Datensätze wurden voneinander subtrahiert und so die Extinktionsänderung, verursacht durch die Reaktion des Substrates, erhalten.

Die Auswertung der UV-Datensätze erfolgte mit Hilfe des Programms SPECFIT/32 (Spectrum Software Associates). Dieses Programm ermöglicht die Berechnung von Ratenkonstanten einzelner Teilschritte und die Extraktion der zu den jeweiligen Intermediaten gehörigen UV-Spektren nach Vorgabe eines kinetischen Modells.

Aus den Quenched-Flow Experimenten war bekannt, dass die GTP Cyclohydrolase I GTP unter stöchiometrischen Bedingungen nicht vollständig umsetzt. Die UV-Datensätze aus entsprechenden Stopped-Flow Experimenten müssten also entsprechend um den nichtumgesetzten Anteil an GTP korrigiert werden. Aufgrund unterschiedlicher Beladung mit

Zink einzelner Enzymchargen ist dieser Anteil jedoch nicht konstant und schwankt im Bereich von ca. 5 – 20 %. Da dieses nichtumgesetzte GTP keinen Einfluß auf ein kinetisches Modell der Reaktion haben sollte, wurde auf eine Korrektur der Datensätze verzichtet.

3.1.7.1 Stopped-Flow Experimente mit H179A GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*

Erste Stopped-Flow Experimente mit Wildtyp GTP Cyclohydrolase I wurden von A. Bracher durchgeführt [61]. Es wurde ein Modell mit 4 irreversiblen unimolekularen Reaktionen gefunden. Dieses Modell berücksichtigt jedoch nicht den Gleichgewichtscharakter der Imidazol-Ringöffnung. Die Daten legten weiterhin nahe, dass das erste gefundene Intermediat des Modells eine Spezies nach hGTP darstellt. Um ein genaueres Modell der GTP Cyclohydrolase I Reaktion erstellen zu können, wurden Stopped-Flow Messungen mit der GTP Cyclohydrolase I Mutante H179A durchgeführt. Diese Mutante ist in der Lage, die Imidazol-Ringöffnung in einer Gleichgewichtsreaktion zu katalysieren [63]. Aus dem resultierenden 5-Formylamino-Intermediat (**27**) kann diese Mutante kein Formiat freisetzen (siehe auch 3.1.3).

Um beide Richtungen der Reaktion untersuchen zu können, wurden die Stopped-Flow Experimente sowohl mit GTP als auch mit hGTP (**27**) als Substrat durchgeführt. Das eingesetzte Zwischenprodukt hGTP (**27**) besteht jedoch aus einem Isomerengemisch (Abb. 26, siehe Ref. [63]), von dem nur das β -Isomer (**27a**, **27c**) der GTP Cyclohydrolase I als Substrat dient. Die erhaltenen Datensätze wurden daher um den Anteil an Isomer, der nicht in die Reaktion eingeht, korrigiert.

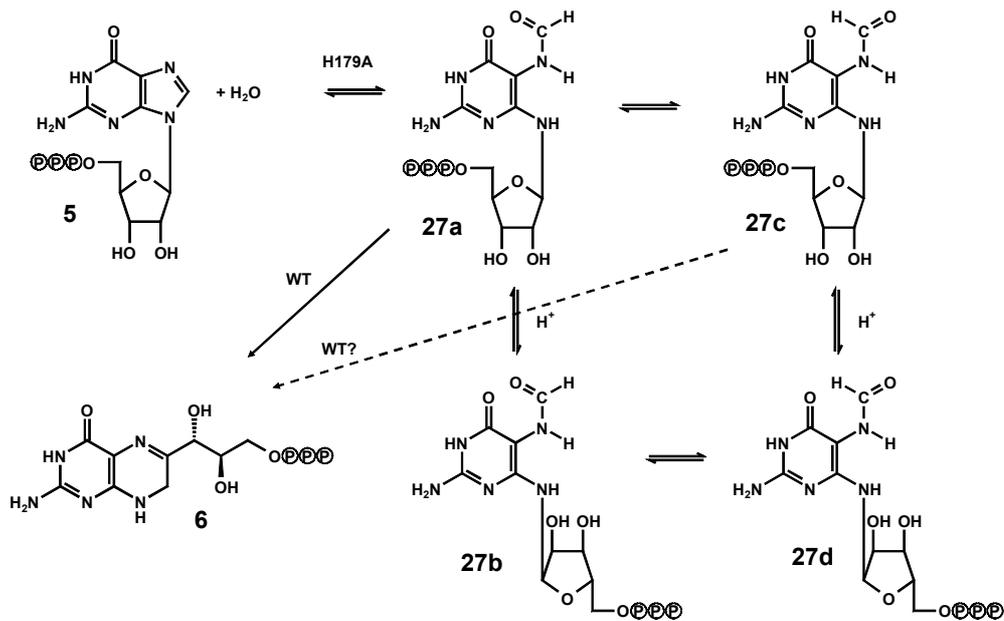


Abb. 26: Isomerenmischung von hGTP [63].

UV-Spektrenserien aus der stöchiometrischen Umsetzung von GTP bzw. hGTP mit der H179A Mutante der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* sind in Abb. 27 gezeigt. Der Datensatz aus Abb. 27 B ist um den nichtumgesetzten Anteil an α -Isomer (27b, 27d, 55 %) korrigiert.

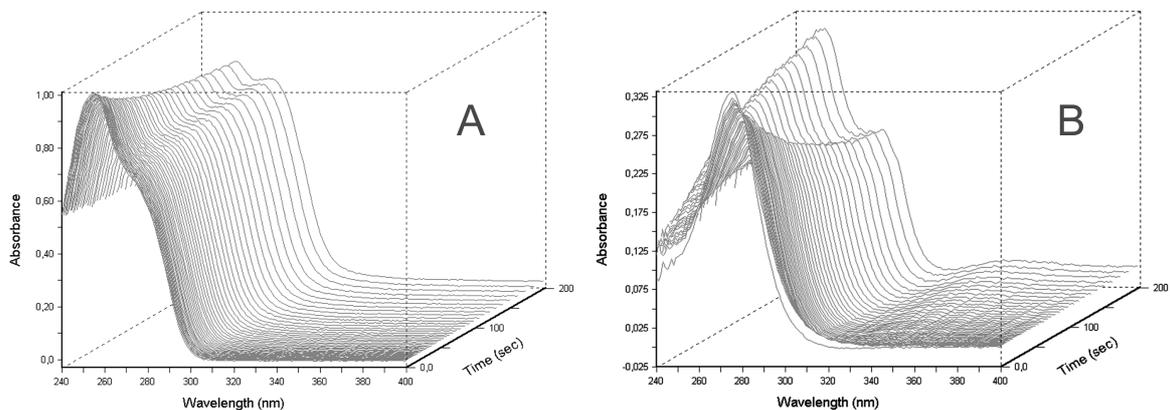


Abb. 27: UV-Spektrenserie einer stöchiometrischen Umsetzung von GTP mit H179A GTP Cyclohydrolase I bei 30°C. A: GTP als Substrat. B: hGTP (27) als Substrat. Die Daten sind um den Anteil an nicht an der Reaktion beteiligtem Isomer korrigiert.

Ausgewählte UV-Spektren aus Abb. 27 sind in Abb. 28 gezeigt. Im Experiment mit GTP als Substrat scheint bei 267 nm ein isosbestischer Punkt zu existieren (Abb. 28A). Im Experiment mit hGTP scheint bei 263 nm ein isosbestischer Punkt zu existieren (Abb. 28B).

In beiden Experimenten nimmt mit steigender Reaktionszeit die Extinktion im langwelligeren Bereich (>300 nm) zu. Besonders deutlich ist dies in Abb. 28B zu sehen. Das UV-Spektrum nach 160 s Reaktionszeit besitzt bereits eine deutliche Absorption bei 340 nm. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um photochemische Nebenreaktionen, bedingt durch die langdauernde Bestrahlung mit UV-Licht (siehe auch 3.1.7.2). Die Reaktion von GTP zu hGTP bzw. umgekehrt scheint in beiden Fällen ohne photometrisch detektierbares Intermediat abzulaufen. Es tritt kein langwelliges Intermediat auf.

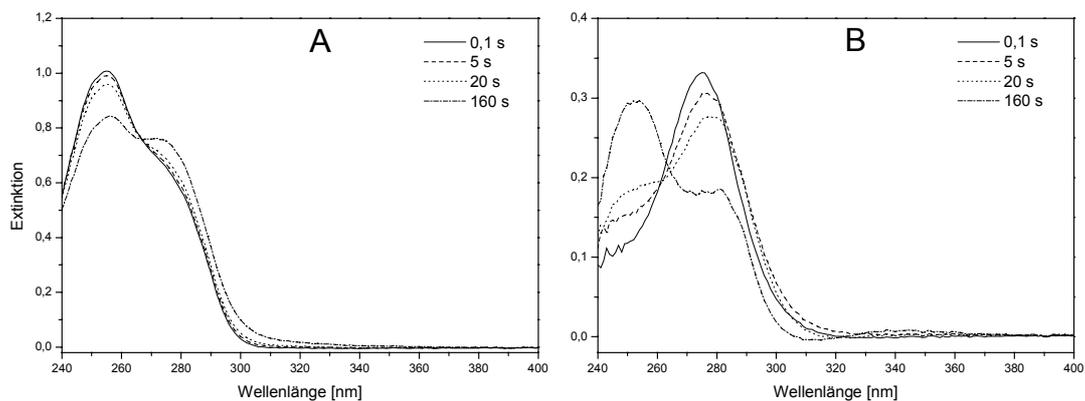


Abb. 28: Ausgewählte UV-Spektren aus Abb. 27. Stopped-Flow Experimente mit GTP sind in A, Experimente mit hGTP (27) sind in B dargestellt.

Für eine detaillierte Analyse wurden die Datensätze aus Abb. 27 mit Hilfe des Programms SPECFIT/32 einer Eigenwertanalyse unterzogen. Für das GTP Experiment wurden 3 linear unabhängige optische Prozesse gefunden. Es wurde daher ein Modell aus 3 Teilschritten verwendet, wobei der letzte Schritt einen photochemischen Prozeß darstellen soll (Abb. 29). Der erste Schritt des Modells stellt ein Gleichgewicht dar. Dem Modell wurden die bekannten UV-Spektren von GTP und hGTP vorgegeben.

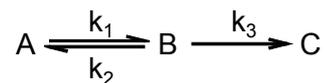


Abb. 29: Modell für die numerischen Anpassung der Daten aus den Stopped-Flow Experimenten mit GTP als Substrat.

Für das entsprechende hGTP Experiment wurden 2 linear unabhängige optische Prozesse gefunden. Im Vergleich zum GTP Modell (Abb. 29) wurde nun der letzte Teilschritt,

der die photochemische Reaktion darstellt, nicht berücksichtigt. Zur Berechnung wurde das bekannte UV-Spektrum von hGTP vorgegeben.

Die Ergebnisse der numerischen Simulation sind in Abb. 30 gezeigt. Die extrahierten UV-Spektren der optischen Spezies sind in Abb. 30 A zu sehen, Abb. 30B zeigt die nach dem Modell erhaltenen Konzentrations-Zeit-Kurven der optischen Spezies. Zum Vergleich zeigt Abb. 30C/D die Ergebnisse der numerischen Simulation für das hGTP Experiment.

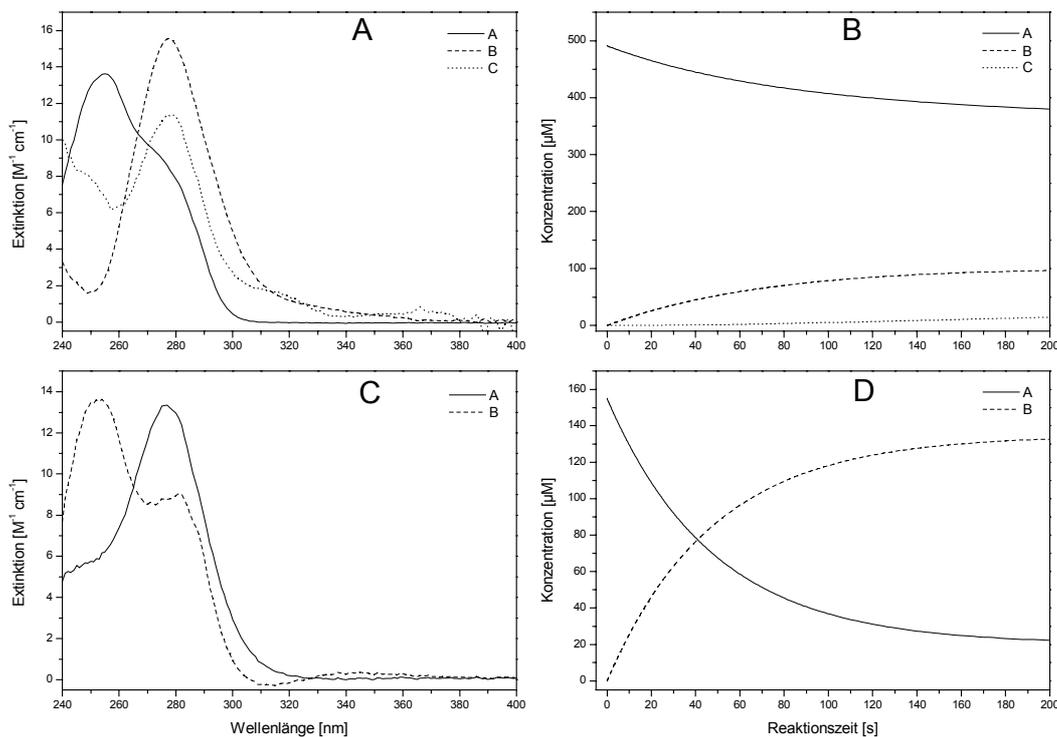


Abb. 30: Ergebnisse der numerischen Simulation der stöchiometrischen Reaktion der H179A Mutante der GTP Cyclohydrolase I von *E. coli* mit GTP (A/B) bzw. hGTP (C/D) als Substrat.

Wie erwartet zeigen beide Experimente das gleiche Bild. Mit GTP (optischer Transient A) als Substrat (Abb. 30A/B) führt die Reaktion der H179A Mutante zu einem optischen Transienten B, der im Modell als hGTP vorgegeben wurde. In einer langsamen Reaktion wird schließlich der optische Transient C gebildet, der eine langwellige Absorption besitzt. Für den Übergang von GTP zu hGTP wird kein optischer Transient als Intermediat gefunden. Die Gleichgewichtskonstante beträgt für das Modell 0,3 (Tab. 12).

Mit hGTP (optischer Transient A) als Substrat (Abb. 30B/C) führt die Reaktion der H179A Mutante zu einem optischen Transienten B, dessen extrahiertes UV-Spektrum starke

Ähnlichkeit mit dem UV-Spektrum von GTP hat. Hier zeigt sich deutlich, dass das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite des GTP liegt. Nach etwa 200 s Reaktionszeit liegen etwa 15 % hGTP und 85 % GTP vor. Die Gleichgewichtskonstante des Modells beträgt ca. 0,15 (Tab. 12).

	GTP	hGTP (27)
k_1	$0,0030 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$	$0,018 \pm 0,0004 \text{ s}^{-1}$
k_2	$0,010 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$	$0,0027 \pm 0,00006 \text{ s}^{-1}$
k_3	$0,0011 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$	---
K	0,3	0,15

Tab. 12: Kinetische Konstanten der single turnover Experimente mit H179A GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* aus Abb. 27.

3.1.7.2 Stopped-Flow Experimente mit Wildtyp GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*

Abb. 31A zeigt eine UV-Spektrenserie aus Stopped-Flow Experimenten mit GTP Cyclohydrolase I und GTP als Substrat. Abb. 31B zeigt eine UV-Spektrenserie aus Stopped-Flow Experimenten mit hGTP (27) als Substrat. Mit Ausnahme der Initialphase der Reaktion zeigen beide Experimente einen ähnlichen Verlauf.

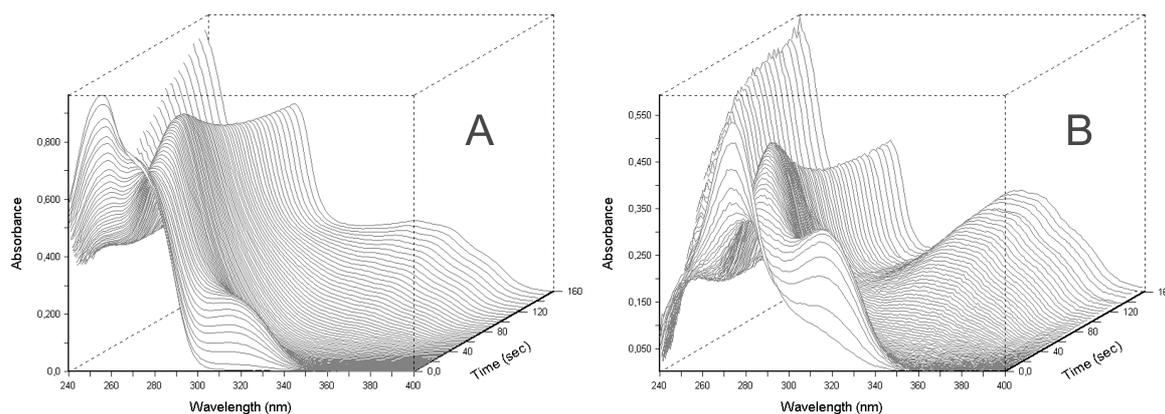


Abb. 31: UV-Spektrenserie einer stöchiometrischen Umsetzung von GTP mit GTP Cyclohydrolase I bei 30°C. A: GTP als Substrat. B: hGTP (27) als Substrat. Die Daten sind um den Anteil an nicht an der Reaktion beteiligtem Isomer korrigiert.

Die verschiedenen hypothetischen Intermediate der GTP Cyclohydrolase I Reaktion, wie sie in Abb. 5 gezeigt sind, besitzen verschiedene Chromophore. GTP als Substrat zeigt ein charakteristisches Maximum bei 254 nm ($\epsilon = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit einer Schulter bei 273 nm (Abb. 32). 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-triphosphat (hGTP, Intermediat **27**) stellt ein frühes Reaktionszwischenprodukt der GTP Cyclohydrolase I Reaktion dar und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 273 nm (Abb. 32) [63]. Das Produkt der enzymatischen Reaktion, Dihydroneopterintriphosphat, besitzt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 330 nm ($\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Abb. 32). In Abb. 32 ist zusätzlich das UV-Spektrum von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat, dem Produkt der GTP Cyclohydrolase II Reaktion, gezeigt. Das Triphosphat-Analogue dieser Verbindung könnte ein Reaktionsintermediat der GTP Cyclohydrolase I Reaktion darstellen.

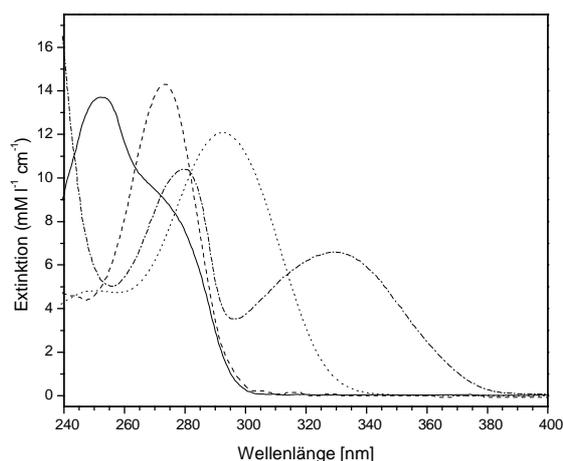


Abb. 32: UV-Spektren verschiedener im Laufe der GTP Cyclohydrolase I Reaktion auftretender Verbindungen [99]. —, GTP (**5**); ---, 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinone 5'-triphosphate (Intermediat **27**); ····, 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinone 5'-monophosphate (Intermediat **28** - monophosphate); -·-·-, Dihydroneopterin (das Triphosphat-Derivat **6**).

Ausgewählte UV-Spektren aus Abb. 31 sind in Abb. 33 gezeigt. Die ersten 3 s der Reaktion sind in Abb. 33A (GTP als Substrat) bzw. Abb. 33B (hGTP als Substrat) dargestellt. Beide Experimente sind gekennzeichnet durch die Abnahme der Extinktion bei 254 nm (GTP, Abb. 34A) bzw. 272 nm (hGTP, Abb. 34C), was der Abnahme des jeweiligen Substrates entspricht. Gleichzeitig bildet sich ein optischer Transient, der durch eine Absorptionsbande bei ca. 320 nm gekennzeichnet ist. Im Vergleich zum Experiment mit GTP (Abb. 34A)

entsteht dieser optische Transient im Experiment mit hGTP deutlich schneller. Dies zeigt sich auch deutlich bei einem Vergleich der beiden ersten aufgenommenen UV-Spektren. Das nach 100 ms Totzeit aufgenommene UV-Spektrum im GTP Experiment (Abb. 33 A) entspricht dem Spektrum des reinen GTPs (Abb. 32). Das entsprechende UV-Spektrum im hGTP Experiment (Abb. 33C) besitzt nach 100 ms Totzeit bereits einen merklichen Anteil an Absorption bei 320 nm. Ein Vergleich der Extinktions-Zeit-Kurven beider Experimente zeigt, dass die Extinktion bei 320 nm im GTP Experiment nach ca. 4 s ihr Maximum erreicht (Abb. 34A), während im hGTP Experiment die Extinktion bei 320 nm bereits nach 2,5 s maximal ist (Abb. 34C).

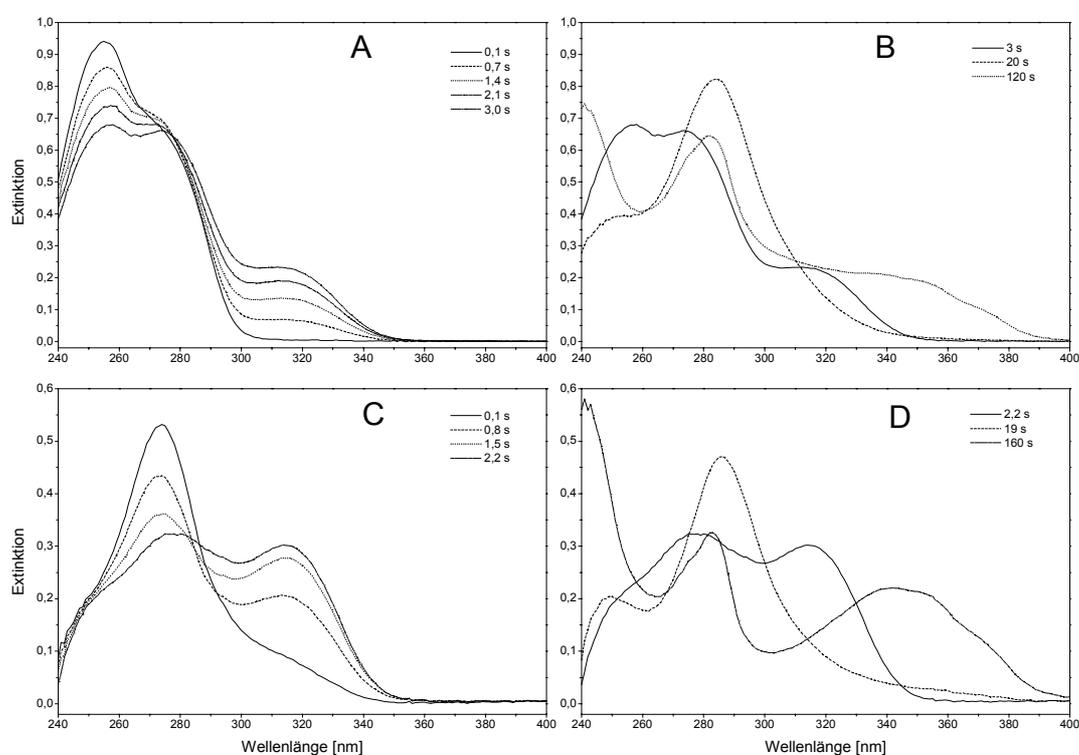


Abb. 33: Ausgewählte UV-Spektren aus Abb. 31. Stopped-Flow Experimente mit GTP sind in A und B dargestellt, Experimente mit hGTP (27) sind in C und D dargestellt.

Abb. 33A lässt einen gemeinsamen Schnittpunkt der UV-Spektren bei ca. 275 nm vermuten. Dies würde für eine einheitliche Reaktion von GTP zum optischen Transienten bei 320 nm sprechen. Die Extinktions-Zeit-Kurve der Reaktion (Abb. 34A) ist jedoch durch zwei Maxima bei 0,7 und 14,5 s sowie ein Minimum bei 4 s gekennzeichnet. Der Reaktion von GTP zum Intermediat mit einer Absorption bei 320 nm führt daher über mindestens eine Zwischenstufe.

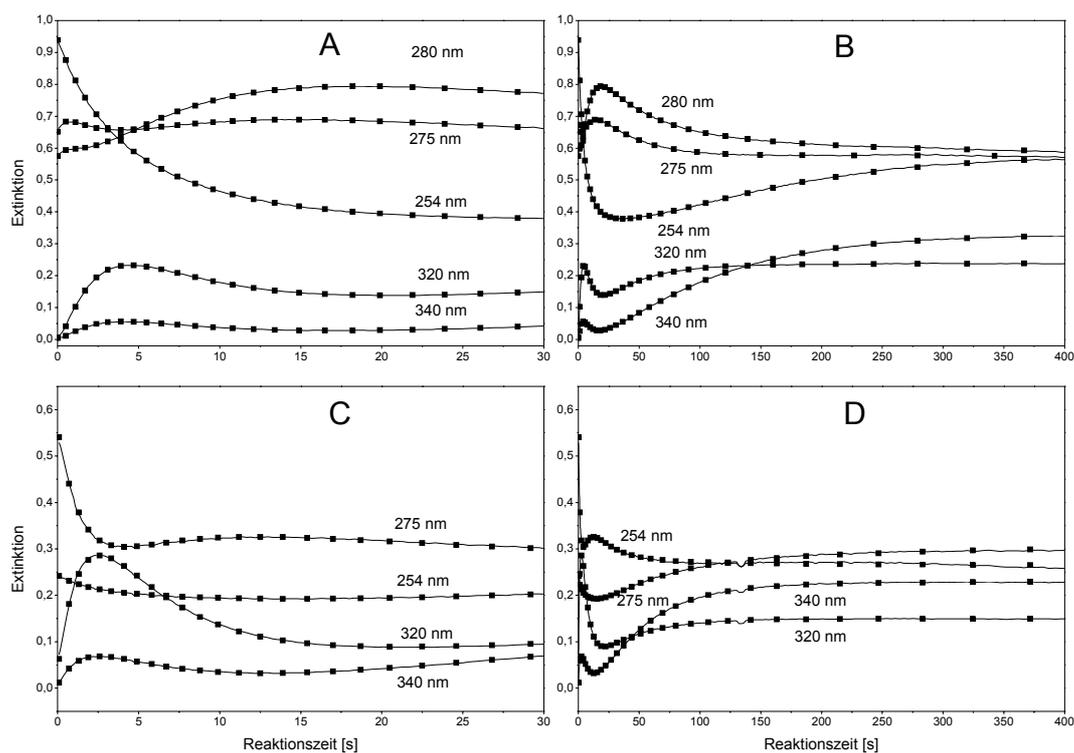


Abb. 34: Absorption-Zeit-Kurven aus Stopped-Flow Experimenten mit GTP Cyclohydrolase I. A, B: GTP als Substrat. C, D: hGTP (27) als Substrat.

Die nach 20 s Reaktionszeit in beiden Experimenten aufgenommenen Spektren (Abb. 33B/D) weisen eine sehr hohe Ähnlichkeit mit dem Spektrum von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat (Abb. 32) auf. Die Absorption bei 320 nm ist zu diesem Zeitpunkt bereits wieder abgeklungen.

Der hintere Teil der Reaktion (ca. 60 s bis 400 s) ist gekennzeichnet durch eine langsame, aber fortschreitende Zunahme der Absorption im langwelligen Bereich. Aus Quenched-Flow Experimenten (3.1.6) ist bekannt, dass die Bildung von Dihydroneopterintriphosphat nach ca. 2 min abgeschlossen ist. Da die letzte Spezies G aus den Stopped-Flow Experimenten auch nach mehr als 6 min ihr Maximum nicht erreicht hat, könnte es sich bei dem sehr langsamen kinetischen Prozeß (Bildung von Spezies G) um einen nichtenzymatischen Prozeß handeln. Da die Küvette während der Messung ständig mit UV-Licht bestrahlt wird, wären photochemische Reaktionen wie Photooxidation oder Photodismutation denkbar. In diesem Fall würde das Produkt der enzymatischen Reaktion, Dihydroneopterintriphosphat, durch die Spezies F dargestellt. Um evtl. auftretende Photoeffekte nachzuweisen, wurden die Stopped-Flow Experimente so durchgeführt, dass die

Reaktionsmischung für 3 min ohne Belichtung reagieren konnte. Die ausreagierte Mischung wurde anschließend mittels Stopped-Flow untersucht. A zeigt die Absorptions-Zeit-Kurven der beiden gefundenen Spezies. Die berechnete Ratenkonstante für diesen Prozeß beträgt $0,0076 \text{ s}^{-1}$. Zum Vergleich sind in Abb. 35B die UV-Spektren von Dihydroneopterintriphosphat und Neopterin gezeigt.

Es zeigt sich deutlich, dass durch die Belichtung von Dihydroneopterintriphosphat sich das UV-Spektrum langsam ändert. Das langwellige Maximum der Spezies F verschiebt sich von 335 nach 345 nm. Die Extinktion bei 280 nm nimmt ab, während die Extinktion bei 260 nm zunimmt. Insgesamt nähert sich das UV-Spektrum der Spezies F dem von Neopterin an. Der langsame letzte Schritt im zugrundegelegten Modell ist die vermutlich nichtenzymatische Umwandlung von Dihydroneopterintriphosphat zu einem Folgeprodukt. Bei diesem Folgeprodukt könnte es sich um Neopterin bzw. ein entsprechendes Phosphat-Analoges handeln, welches durch Photooxidation aus Dihydroneopterintriphosphat entsteht.

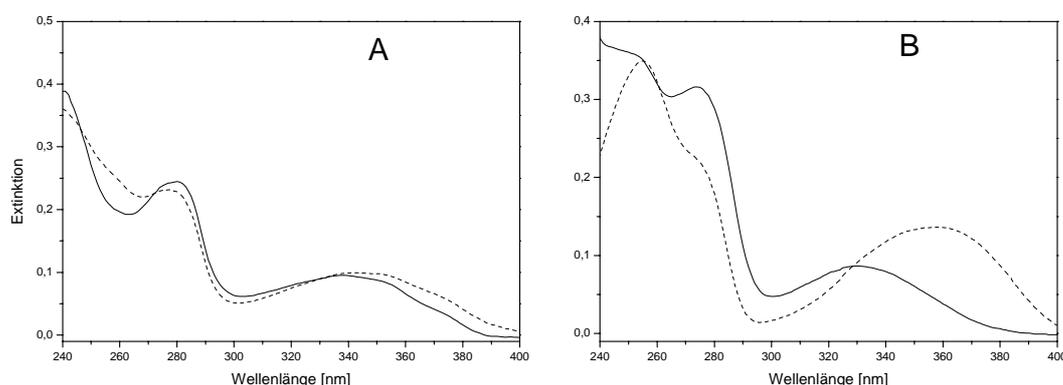


Abb. 35: A: Photoreaktion von Dihydroneopterintriphosphat unter den experimentellen Bedingungen des Stopped-Flow Experiments. —, Spektrum einer für 3 min im Dunklen inkubierten Reaktionsmischung; ---, gleiche Probe nach Belichtung im Stopped-Flow Gerät für weitere 3 min. B: —, UV-Spektrum von Dihydroneopterintriphosphat; ---, UV-Spektrum von Neopterin.

Abb. 35B zeigt zum Vergleich die UV-Spektren von Dihydroneopterintriphosphat und Neopterin. Deutlich zu sehen ist im oxidierten Neopterin die bathochrome Verschiebung des langwelligen Extinktionsmaximums verglichen mit der Dihydroverbindung. Auch die Spektren in Abb. 35A zeigen diese bathochrome Verschiebung.

Für eine detaillierte Analyse wurden die Datensätze aus Abb. 31 mit Hilfe des Programms SPECFIT/32 einer Eigenwertanalyse unterzogen. Für das GTP Experiment wurde

6 linear unabhängige optische Prozesse gefunden. Es wurde daher ein Modell aus 6 Teilschritten angenommen, wobei der letzte Schritt den photochemischen Prozeß darstellen soll (Abb. 36). Da frühere Studien zeigten, dass der erste Reaktionsschritt reversibel ist, wurde für den ersten Schritt des Modells ein Gleichgewicht angenommen. Um die daraus resultierende Überparametrisierung zu überwinden, wurden im Modell die beiden bekannten UV-Spektren von GTP und hGTP für die optischen Transienten A und B vorgegeben.



Abb. 36: Modell für den numerischen Fit der Daten aus den Stopped-Flow Experimenten mit GTP als Substrat.

Für das entsprechende hGTP Experiment wurden 5 linear unabhängige optische Prozesse gefunden. Im Vergleich zum GTP Modell (Abb. 36) wurde nun der erste Teilschritt, der das Gleichgewicht zwischen GTP und hGTP darstellen soll, nicht berücksichtigt und das erhaltene Modell aus 5 aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten verwendet (Abb. 37).

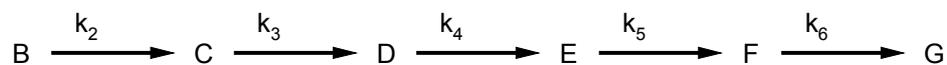


Abb. 37: Modell für den numerischen Fit der Daten aus den Stopped-Flow Experimenten mit hGTP als Substrat.

Die Ergebnisse der numerischen Optimierung für das GTP Experiment sind in Abb. 38A/B gezeigt. Die extrahierten UV-Spektren der optischen Spezies A bis G sind in Abb. 38A zu sehen, Abb. 38B zeigt die nach dem Modell erhaltenen Konzentrations-Zeit-Kurven der optischen Spezies. Zum Vergleich zeigt Abb. 38C/D die Ergebnisse der numerischen Optimierung für das hGTP Experiment. Die Qualität der numerischen Simulationen kann durch einen Vergleich der experimentellen Absorptions-Zeit Daten (Abb. 34, Symbole) mit den Absorptions-Zeit Kurven (Abb. 34, Linien) der Modelle abgeschätzt werden.

Die Abnahme des optischen Transienten A (Abb. 38B) entspricht qualitativ etwa dem Verbrauch von GTP, wie er aus Quenched-Flow Experimenten bereits bekannt ist. Der optische Transient B, der im Modell als hGTP (27) vorgegeben wurde, erreicht im GTP Experiment nach 1,2 s seine maximale Konzentration von ca. 10 % der eingesetzten GTP Konzentration (Abb. 38B). Dies entspricht etwa den Werten, wie sie aus den Quenched-Flow Experimenten bekannt sind (Abb. 25).

Die numerische Analyse ergibt für die Gleichgewichtskonstante der Reaktion von GTP zu hGTP einen Wert von 0,41. Durch Quenched-Flow Experimente wurde für die Gleichgewichtskonstante Werte zwischen 0,07 und 0,45 bestimmt (siehe 3.1.3). Frühere steady state Experimente ergaben einen Wert von 0,1 [63] bzw. 0,15 (siehe 3.1.4).

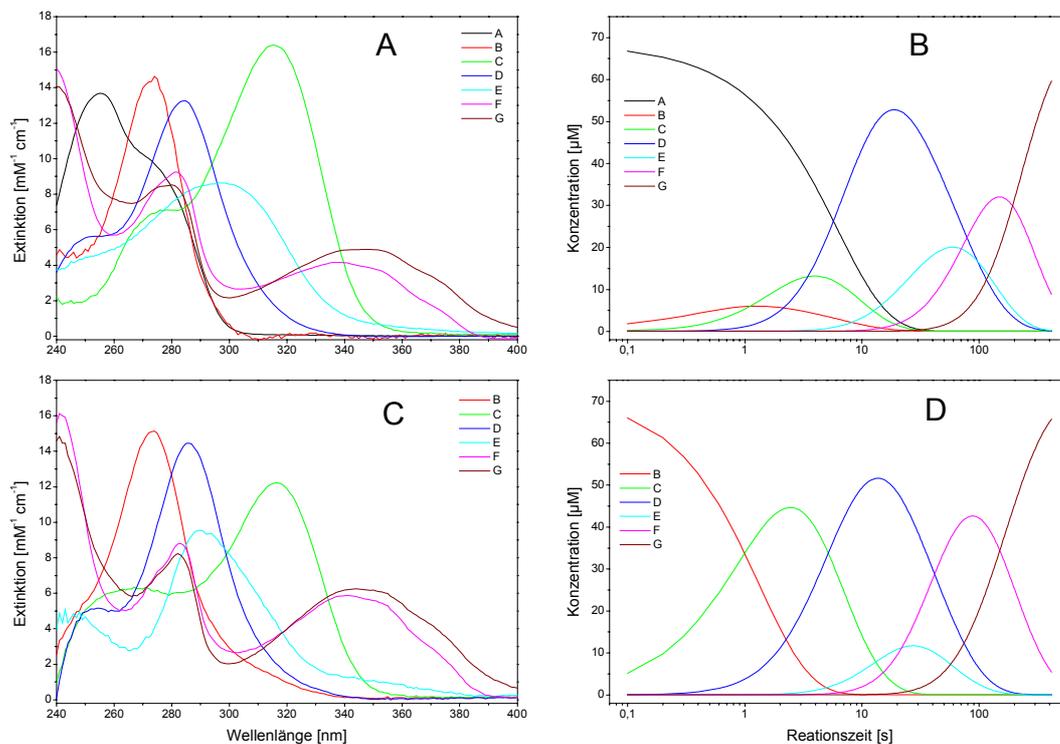


Abb. 38: Ergebnisse der numerischen Simulation der stöchiometrischen Reaktion der Wildtyp GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* mit GTP (A/B) bzw. hGTP (C/D) als Substrat.

Im Experiment mit GTP als Substrat wurden für die optischen Transienten A und B die UV-Spektren für GTP bzw. hGTP vorgegeben (Abb. 32). Der optische Transient A ist nach ca. 30 s vollständig abgeklungen. Nach etwa 1,2 s erreicht der optische Transient B sein Maximum von (ca. 10 % der eingesetzten GTP Menge). Für das Gleichgewicht zwischen den optischen Transienten A und B wurde durch numerische Simulation ein Wert von 0,41 gefunden.

Der optische Transient B geht in eine optische Spezies C, deren Extinktionsmaximum bei ca. 320 nm liegt, über. Diese Spezies erreicht nach ca. 4 s ihr Maximum. Das extrahierte UV-Spektrum des optischen Transienten C ähnelt stark dem UV-Spektrum des GTP Cyclohydrolase II Produkts (Abb. 32), ist aber um ca. 31 nm bathochrom verschoben. Unter

allen hypothetischen Intermediaten der GTP Cyclohydrolase I Reaktion (Abb. 5) scheint ein postuliertes Schiffbase-Intermediat (**29**, Abb. 5) aufgrund der konjugierten Imin-Doppelbindung mit dem Heterzyklus als Kandidat für eine langwellige Absorption in Frage zu kommen.

Der optische Transient D ist charakterisiert durch ein Absorptionsmaximum bei ca. 280 nm. Das extrahierte UV-Spektrum ähnelt dem UV-Spektrum des GTP Cyclohydrolase II Produktes (Abb. 32), ist jedoch um ca. 5 nm hypochrom verschoben. Er erreicht im Experiment mit GTP nach 18 s seine maximale Konzentration (ca. 80 % der eingesetzten GTP Menge). Der optische Transient D stellt das Hauptintermediat der GTP Cyclohydrolase I Reaktion dar (das nach 20 s aufgenommene UV-Spektrum aus Abb. 33 B entspricht dem extrahierten UV-Spektrum des optischen Transienten D aus Abb. 38). Die hypothetischen Intermediate **30**, **31** und **32** (Abb. 5) der GTP Cyclohydrolase I Reaktion stellen aufgrund der Diaminopyrimidin-Struktur ohne konjugierte Doppelbindung plausible Kandidaten für eine Absorption vom Typ des optischen Transienten D dar.

Der optische Transient E repräsentiert einen optischen Prozess mit niedriger Amplitude. Der Fehler, der bei der numerischen Simulation des optischen Transienten E erhalten wird, ist entsprechend groß. Das extrahierte UV-Spektrum dieses Transienten ändert sich stark bei geringsten Änderungen der Ratenkonstanten des Modells. Es ist daher nicht interpretierbar. Möglicherweise handelt es sich um das Produkt der Amadoriumlagerung (**31**) oder um das hydratisierte Pterin (**32**, Abb. 5).

Die extrahierten UV-Spektren der optischen Transienten F und G sind untereinander sehr ähnlich und entsprechen beide etwa dem UV-Spektrum von Dihydroneopterintriphosphat (Abb. 32). Der optische Transient G ist im Vergleich zum optischen Transienten F um ca. 15 nm bathochrom verschoben. Dieser Übergang ist einer photochemischen Nebenreaktion, wie bereits oben beschrieben (Abb. 35), zuzuordnen.

Das Experiment mit hGTP als Substrat (Abb. 31) zeigt mit Ausnahme der Startphase den gleichen Verlauf wie das GTP Experiment. Der optische Transient B (im Modell ist das UV-Spektrum von hGTP vorgegeben) wird innerhalb von 8 s vollständig verbraucht. Der optische Transient C erreicht in diesem Experiment bereits nach 2,5 s seine Maximalkonzentration (ca. 65 % der Startkonzentration von hGTP). Die extrahierten UV-Spektren in diesem Modell (Abb. 38C) entsprechen qualitativ den entsprechenden UV-Spektren des GTP Experimentes (Abb. 38A).

Die berechneten Ratenkonstanten für beide Modelle sind in Tab. 13 zusammengefasst.

	Ratenkonstanten [s ⁻¹]	
	GTP als Substrat	hGTP (27) als Substrat
GTP → Compound 4	0,229 0,004	---
Compound 4 → GTP	0,559 ± 0,02	---
k ₁	1,50 ± 0,03	0,755 ± 0,008
k ₂	0,480 ± 0,006	0,192 ± 0,002
k ₃	0,0161 ± 0,006	0,0345 ± 0,003
k ₄	0,0245 ± 0,0001	0,0425 ± 0,005
k ₅	0,0073 ± 0,0003	0,0050 ± 0,00002

Tab. 13: Ratenkonstanten aus der numerischen Simulation der Reaktion von GTP bzw. hGTP (27) mit Wildtyp GTP Cyclohydrolase I.

Wie oben schon gezeigt wurde, handelt es sich bei der Reaktion von GTP zu hGTP um ein Gleichgewicht. Das Gleichgewicht mit einer Gleichgewichtskonstante von ca. 0,15 liegt stark auf der Seite von GTP. Mit hGTP (einem nachgewiesenen Intermediat der GTP Cyclohydrolase I Reaktion, siehe Ref. [63]) als Substrat sollte ein gewisser Anteil an GTP während der Reaktion entstehen. Abb. 39 zeigt eine Simulation der Konzentrations-Zeit-Kurven eines single turnover Experimentes mit hGTP und Wildtyp GTP Cyclohydrolase I. Für die Simulation wurden die Ratenkonstante k_1 und k_2 des Experimentes mit GTP als Substrat verwendet (Tab. 13, linke Spalte), die restlichen Ratenkonstanten stammen aus dem hGTP Experiment (Tab. 13, rechte Spalte). Diese Simulation zeigt deutlich, dass bei der Umsetzung von hGTP mit Wildtyp GTP Cyclohydrolase I GTP in einer Konzentration von ca. 30 % der Startkonzentration von hGTP entstehen müsste. In der Extinktions-Zeit-Kurve (Abb. 34 C) sollte sich diese GTP Bildung als Anstieg der Extinktion bei 254 nm um ca. 0,15 bemerkbar machen. Dies ist jedoch nicht der Fall.

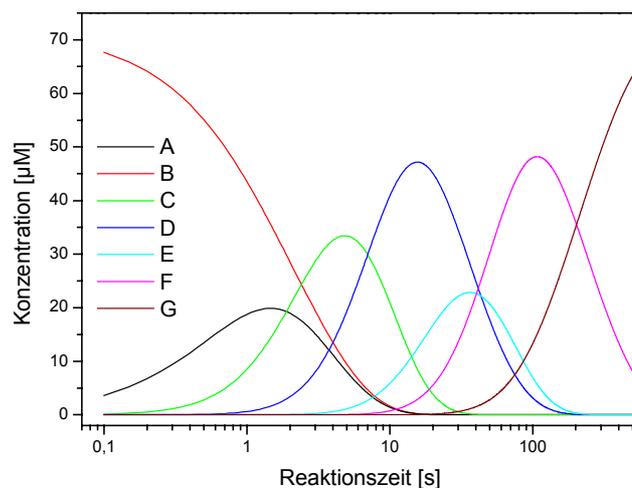


Abb. 39: Simulation einer Reaktion von hGTP (Transient B) mit wt Cyclohydrolase I. Die Ratenkonstante k_1 und k_2 zur Berechnung des Gleichgewichtes zwischen GTP und hGTP stammen aus dem Experiment mit GTP und Wildtyp GTP Cyclohydrolase I.

Abb. 40 zeigt den Vergleich der Quenched-Flow Daten (Abb. 25) der Reaktion von GTP mit GTP Cyclohydrolase I unter stöchiometrischen Bedingungen mit dem aus Stopped-Flow Daten abgeleiteten Modell (Abb. 38B). Der Verbrauch von GTP ist in beiden Experimenten etwa gleich schnell. Die Daten des Quenched-Flow Experiments zeigen jedoch zu Beginn der Reaktion einen etwas schnelleren Verbrauch an GTP. Möglicherweise ist GTP unter den sauren Quenched-Flow Bedingungen nicht genügend stabil für eine quantitative Detektion.

Die Konzentrations-Zeit-Daten für hGTP (27) stimmen in beiden Experimenten gut überein. In beiden Fällen wird das Maximum der Konzentration (ca. 10 % der eingesetzten GTP Menge) nach ca. 1 s erreicht.

Formiat lässt sich mit der Stopped-Flow Technik nicht direkt detektieren. Jedoch muß die Konzentration an Formiat der Summe der Konzentrationen aller Verbindungen entsprechen, die aus hGTP (27) hervorgehen, da alle Intermediate der Reaktion nach hGTP durch Abspaltung von Formiat aus hGTP (27) entstehen müssen. Die Summe der optischen Transienten C-G des Stopped-Flow Experimentes aus Abb. 38B entspricht der Konzentration an Formiat aus dem Quenched-Flow Experiment.

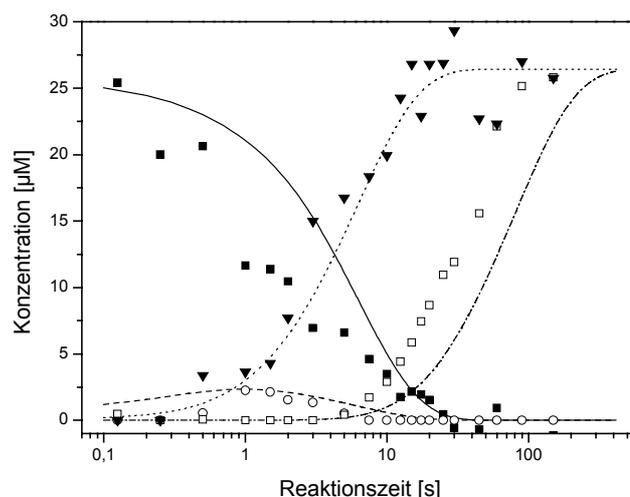


Abb. 40: Vergleich der Quenched-Flow Daten (Abb. 25) mit den Stopped-Flow Daten (Abb. 38B) einer Umsetzung von GTP mit Wildtyp GTP Cyclohydrolase I unter stöchiometrischen Bedingungen. ■: GTP (5); ○: 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinone-5'-triphosphat (27); ▼: Formiat; □: Dihydro-neopterintriphosphat (6), Optischer Transient A; ---, Optischer Transient B; ·····, Σ optische Transienten C bis G; -·-·-, Σ optische Transienten E bis G.

Quenched-Flow Experimente zeigen, dass ein weiteres Zwischenprodukt der Reaktion mittels HPLC detektierbar ist. Dieses Zwischenprodukt lässt sich jedoch nicht direkt mit HPLC quantifizieren. Arbeiten von Bracher *et al.* zeigten, dass Intermediate der GTP Cyclohydrolase I Reaktion, welche unter sauren Bedingungen durch Hydrolyse die Kohlenhydrat-Seitenkette verlieren, mit Diacetyl zu 6,7-Dimethylpterin umgesetzt werden können [99]. Diese Verbindung lässt sich fluorimetrisch durch HPLC quantifizieren. Von den hypothetischen Intermediaten der GTP Cyclohydrolase I Reaktion sollten sich die Verbindungen 26 - 29 mit dieser Methode nachweisen lassen. In Abb. 41 sind Quenched-Flow Daten des Diacetyl-Quench den Stopped-Flow Daten gegenübergestellt [99].

Qualitativ zeigen die Stopped-Flow und Quenched-Flow Daten den gleichen Verlauf. Abweichungen sind vor allem bedingt durch nicht vollständige Umsetzung der einzelnen zu detektierenden Intermediate.

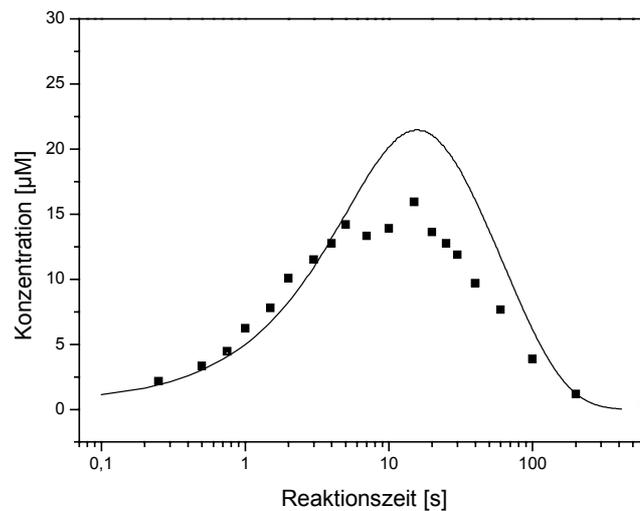


Abb. 41: Vergleich von Diacetyl-Quenched-Flow Experimenten mit Stopped-Flow Experimenten (aus Ref. [99]). ■, 6,7-Dimethylpterin aus Quenched-Flow Experimenten; —, Σ optische Transienten B bis D aus den Stopped-Flow Experimenten (Abb. 38B).

3.1.7.3 pH-Abhängigkeit der GTP Cyclohydrolase I Reaktion

Eine Vereinfachung der Zuordnung der optischen Transienten des Stopped-Flow Modells der GTP Cyclohydrolase I Reaktion zu chemischen Intermediaten der enzymatischen Reaktion könnte durch Variation des pH's der Reaktion ermöglicht werden. So sollten z.B. Protonierungsschritte bei niedrigem pH schneller ablaufen.

Es wurden Stopped-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase I und GTP als Substrat bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Abb. 42 zeigt verschiedene UV-Spektrenserien aus Stopped-Flow Experimenten mit GTP Cyclohydrolase I und GTP als Substrat. Deutliche Unterschiede zeigen sich in der Intensität der auftretenden Intermediate mit UV-Maxima bei 280 nm bzw. 320 nm.

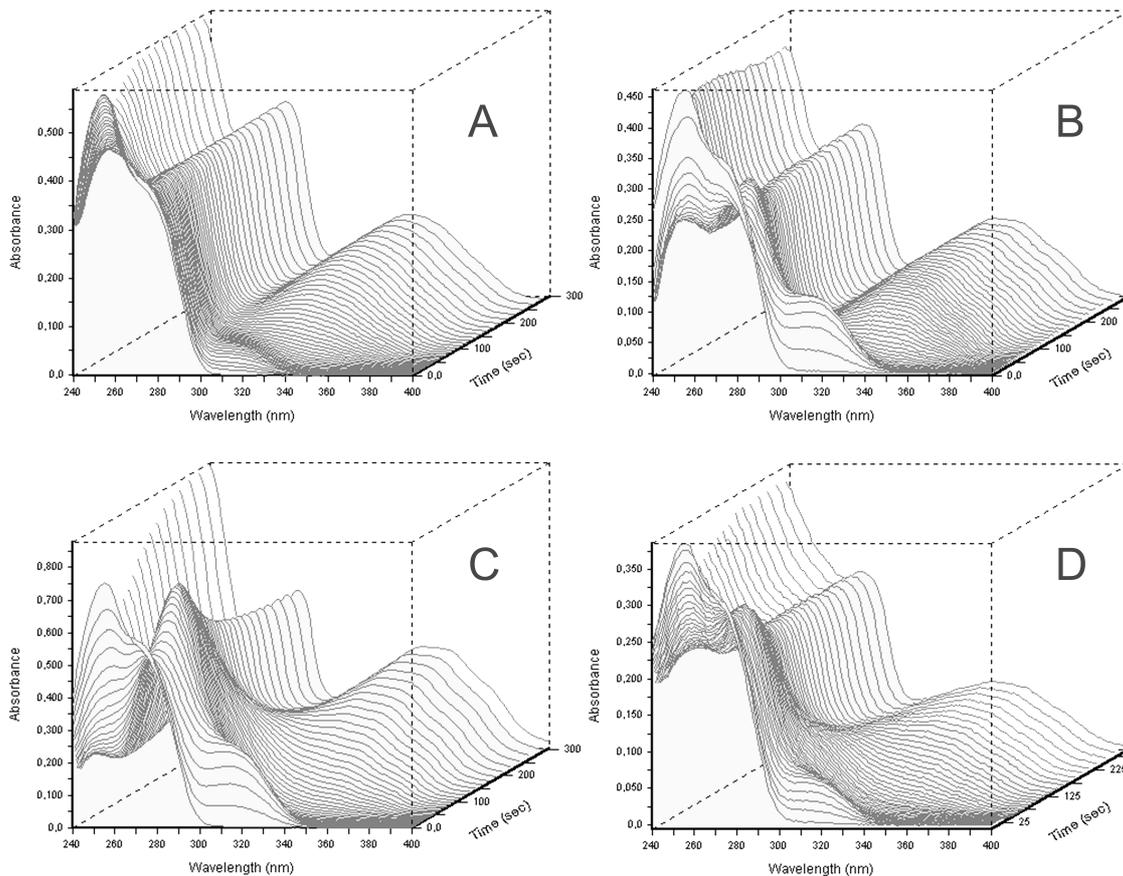


Abb. 42: UV-Spektrenserie einer stöchiometrischen Umsetzung von GTP mit GTP Cyclohydrolase I bei 30°C. A: Bis-Tris/HCl pH 6,0, 100 mM KCl; B: Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl; C: Tris/HCl, pH 8,5, 100 mM KCl; D: Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM KCl.

Wird die Reaktion der GTP Cyclohydrolase I bei pH 6,0 durchgeführt, so entsteht das frühe Intermediat mit einem Absorptionsmaximum bei 320 nm nur in sehr geringer Menge. Das nach 5 s Reaktionszeit aufgenommene UV-Spektrum (Abb. 43A) einer Reaktionsmischung bei pH 6,0 zeigt im Vergleich mit dem nach 3 s Reaktionszeit aufgenommenen UV-Spektrum einer Reaktionsmischung bei pH 8,5 (Abb. 43C) einen deutlich geringeren Anteil an Absorption bei 320 nm. Wird die Reaktion bei pH 7,0 durchgeführt (Abb. 42B, Abb. 43B), so entsteht dieses Intermediat in vergleichbarer Menge wie bei pH 8,5. Bei pH 9,5 hingegen scheint das Intermediat mit einem Absorptionsmaximum bei 320 nm in geringerer Menge zu entstehen (Abb. 42D, Abb. 43D).

Wird die GTP Cyclohydrolase I Reaktion bei pH 8,5 durchgeführt, so zeigt sich nach 20 s Reaktionszeit ein Hauptintermediat mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 285 nm (Abb. 42C, Abb. 43C). Wird die Reaktion bei pH 6,0 durchgeführt, so tritt dieses Intermediat praktisch nicht auf (Abb. 42A, Abb. 43A). Das UV-Spektrum der Reaktionsmischung scheint vielmehr fließend vom GTP-Spektrum in das UV-Spektrum des Reaktionsproduktes

Dihydroneopterintriphosphat überzugehen. Wird die Reaktion bei pH 7,0 (Abb. 42B, Abb. 43B) bzw. 9,5 (Abb. 42D, Abb. 43D) durchgeführt, so tritt dieses Intermediat zwar auf, scheint jedoch deutlich geringer populiert zu sein als bei pH 8,5.

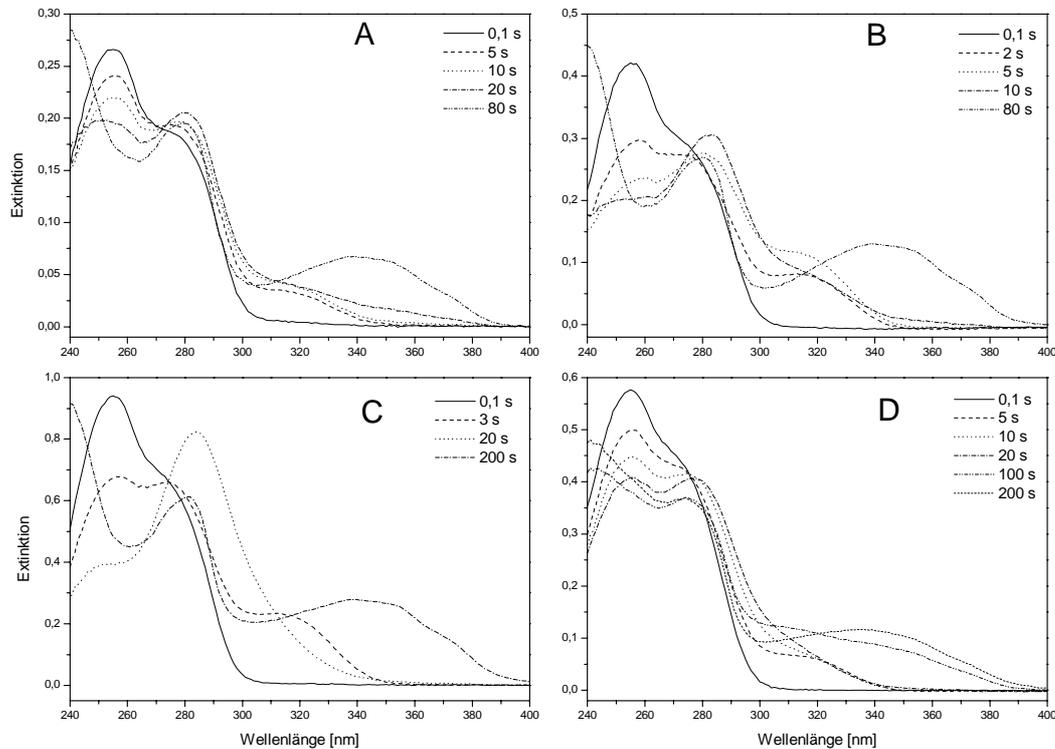


Abb. 43: Ausgewählte UV-Spektren aus Abb. 42. A: pH 6,0; B: pH 7,0; C: pH 8,5; D: pH 9,5.

In Abb. 44 sind ausgewählte Absorptions-Zeit-Kurven aus den Stopped-Flow Datensätzen (Abb. 42) gezeigt. Die Bildung des ersten Intermediates (Absorptionsmaximum bei 275 nm) der GTP Cyclohydrolase I Reaktion zeigt sich bei pH 8,5 (Abb. 44C) und pH 9,5 (Abb. 44D) deutlich durch eine Zunahme der Extinktion bei 275 nm zu Beginn der Reaktion. Wird die Reaktion bei pH 6,0 (Abb. 44A) oder pH 7,0 (Abb. 44B) durchgeführt, so zeigt sich diese Extinktionszunahme nicht. Dieses Intermediat ist im Sauren nur sehr niedrig populiert und kann im Modell nicht berücksichtigt werden.

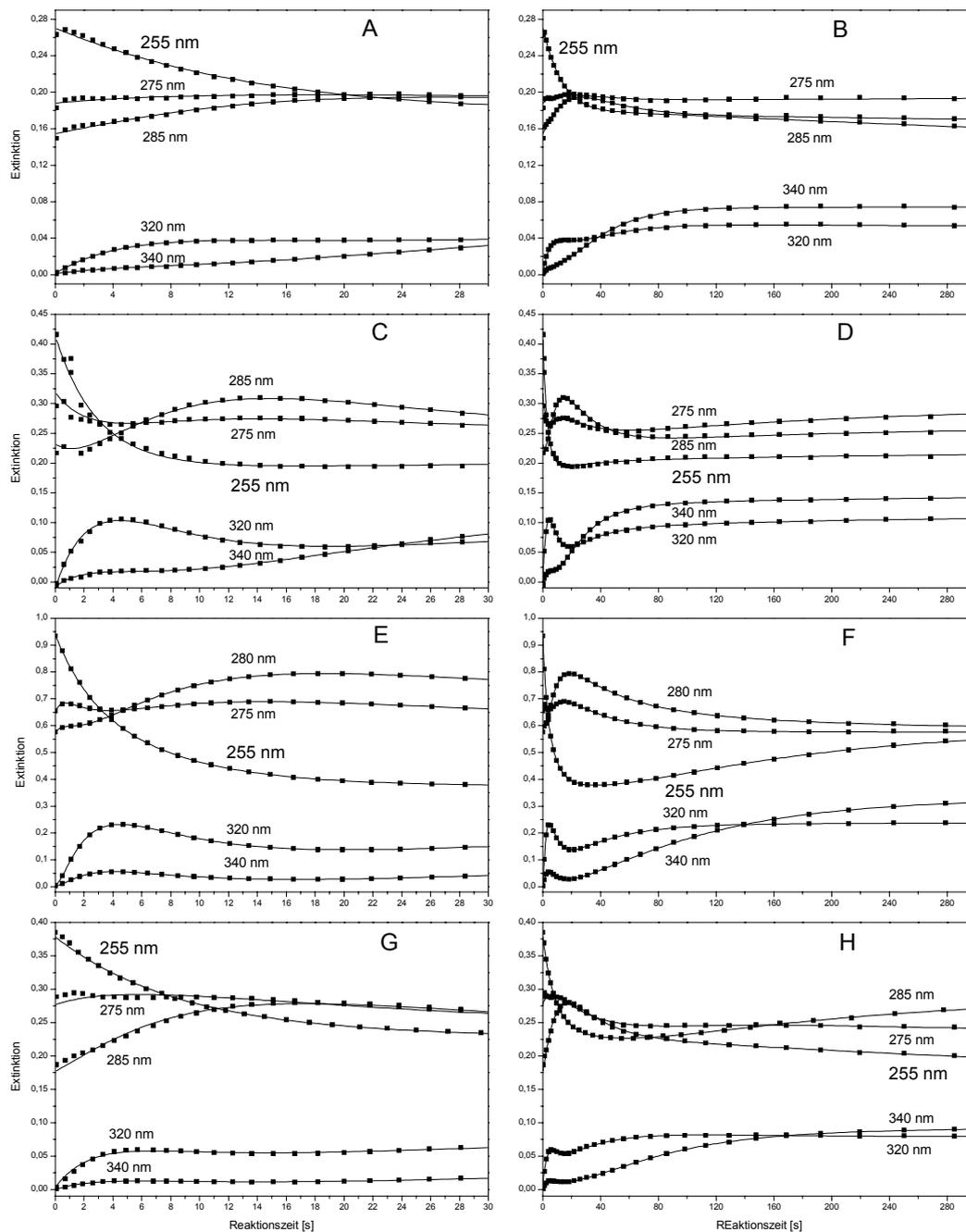


Abb. 44: Absorptions-Zeit Kurven aus Stopped-Flow Experimenten mit GTP Cyclohydrolase I und GTP als Substrat bei verschiedenen pH-Werten. A/B: 50 mM Bis-Tris/HCl pH 6,0, 100 mM KCl; C/D: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl; E/F: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 100 mM KCl; G/H: 50 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM KCl.

Für eine detaillierte Analyse wurden die Datensätze aus Abb. 42 mit dem Programm SPECFIT/32 einer Eigenwertanalyse unterworfen. Für die Experimente bei pH 6,0 und pH 7,0 wurden je 5 linear unabhängige Prozesse gefunden. Für das Experiment bei pH 9,5 ergaben

sich 6 linear unabhängige Prozesse. Entsprechend der Anzahl unabhängiger Prozesse wurden Modelle mit 4 bzw. 5 Schritten gewählt. Die Analyse des Experimentes bei pH 8,5 ist unter 3.1.7.2 beschrieben. Die Ergebnisse der numerischen Analyse sind in Abb. 45 gezeigt, die kinetischen Konstanten sind in Tab. 14 angegeben.

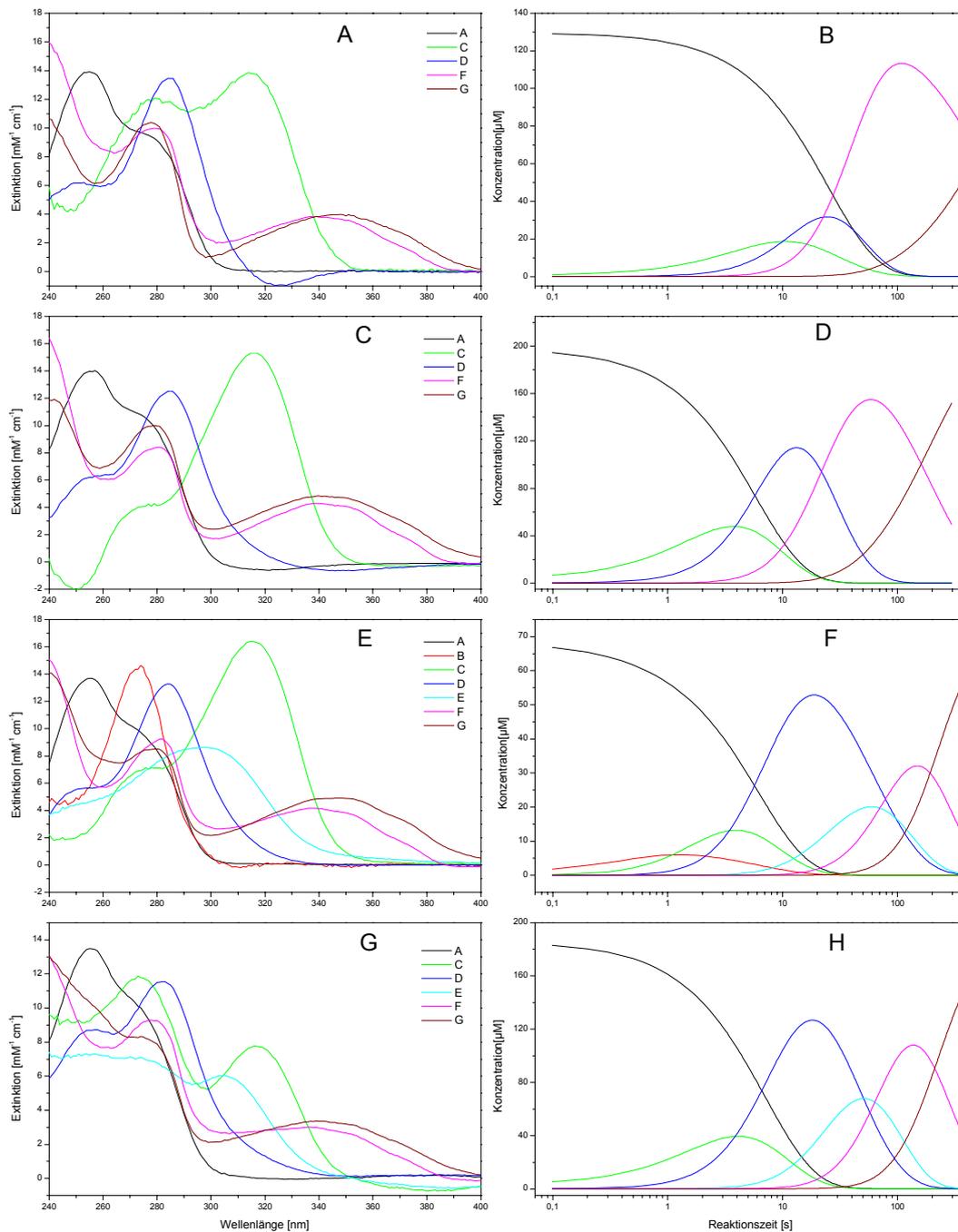


Abb. 45: Vergleich der numerischen Simulation der stöchiometrischen Reaktion der GTP Cyclohydrolase I mit GTP als Substrat bei unterschiedlichen pH Werten. A/B: 50 mM Bis-Tris/HCl pH 6,0, 100 mM KCl; C/D: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl; E/F: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 100 mM KCl; G/H: 50 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM KCl.

Konstante	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,5	pH 9,5
k_1	$0,040 \pm 0,001$	$0,171 \pm 0,009$	$0,229 \pm 0,004$	$0,140 \pm 0,005$
k_{-1}	---	---	$0,559 \pm 0,02$	---
k_2	---	---	$1,50 \pm 0,03$	----
k_3	$0,183 \pm 0,007$	$0,373 \pm 0,02$	$0,480 \pm 0,006$	$0,370 \pm 0,01$
k_4	$0,076 \pm 0,002$	$0,0526 \pm 0,001$	$0,0161 \pm 0,006$	$0,0253 \pm 0,05$
k_5	---	---	$0,0245 \pm 0,0001$	$0,0252 \pm 0,05$
k_6	$0,0015 \pm 0,0003$	$0,0052 \pm 0,0002$	$0,0073 \pm 0,0003$	$0,0056 \pm 0,0001$

Tab. 14: Kinetische Konstanten aus single turnover Experimenten mit GTP Cyclohydrolase I und GTP bei verschiedenen pH Werten.

Die in den verschiedenen numerischen Simulationen erhaltenen UV-Spektren der einzelnen optischen Transienten unterscheiden sich deutlich voneinander (Abb. 45A, C, E, G). Dies erschwert den direkten Vergleich der aus den Modellen erhaltenen Konzentrations-Zeit-Verläufe der einzelnen optischen Transienten. Grundsätzlich zeigt sich jedoch, dass die optischen Transienten C und D bei jedem pH der Reaktion auftreten. Im Sauren ist der optische Transient D jedoch nur gering populiert, während im alkalischen dieser Transient das Hauptintermediat der Reaktion darstellt.

Der optische Transient E tritt nur unter alkalischen Reaktionsbedingungen auf. Wie oben gezeigt (siehe 3.1.7.2), könnte es sich bei diesem Transienten um das Amadoriprodukt (**31**) oder das Pterinhydrat (**32**) handeln. Die Abspaltung von Wasser aus dem Pterinhydrat sollte unter sauren Bedingungen deutlich schneller ablaufen als unter alkalischen Bedingungen, da bei saurem pH die Hydroxylgruppe protoniert werden kann, so dass deren Abspaltung in Form von Wasser erleichtert wird. Umgekehrt benötigt die intramolekulare Kondensation des Amadoriproduktes (**31**), die zur Bildung des Pterinhydrats (**32**) führt, alkalische Bedingungen. Bei leicht sauren Bedingungen wird die Aminfunktion protoniert, was zu einer verringerten Nukleophilie des Stickstoffs führt. Unter alkalischen Bedingungen ist somit die Ratenkonstante k_2 für die Bildung von **32** größer als die Ratenkonstante k_3 für die Bildung von **6** (Abb. 46). Dies führt zu einer Anreicherung des Pterinhydrats (**32**) in der Reaktionsmischung, wenn die Reaktion bei alkalischen Bedingungen durchgeführt wird. Die Bildung des Amadoriproduktes (**31**) wird durch ein saures Medium begünstigt, da die Enolisierung des Intermediats **30** durch Protonen begünstigt wird. Da die folgende intramolekulare Kondensation unter sauren Bedingungen langsam ist, sollte sich Intermediat **31** unter sauren Bedingungen während der Reaktion anreichern.

Aufgrund der Beobachtung, dass sich der optische Transient E nur unter alkalischen Bedingungen in detektierbaren Mengen bildet, lässt sich annehmen, dass es sich bei dem optischen Transienten E um das Pterinhydrat (**32**) handelt.

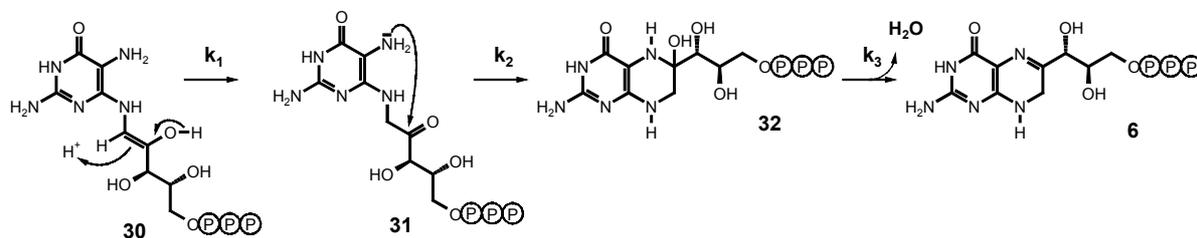


Abb. 46: Bildung von Dihydroneopterintriphosphat (**6**) aus dem Produkt der Amadoriumlagerung (**32**).

3.1.7.4 Isotopeneffekte der GTP Cyclohydrolase I Reaktion

Wird die Reaktion der GTP Cyclohydrolase I unter Stopped-Flow Bedingungen in reinem D_2O durchgeführt, so sollte sich der gleiche Reaktionsmechanismus wie bei der Reaktion in Wasser ergeben. Reaktionsschritte, die den Bruch einer X-D Bindung benötigen, sollten aufgrund des Isotopeneffektes deutlich langsamer ablaufen als der entsprechende Reaktionsschritt in Wasser.

Es wurden Stopped-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase I und GTP als Substrat in 50 mM Tris pH 8,5 und 100 mM KCl durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde reines D_2O eingesetzt. Die erhaltenen Datensätze wurden wie unter Punkt 3.1.7.2 beschrieben der numerischen Analyse unterworfen. Einen Vergleich zwischen den Experimenten mit Wasser (Abb. 47A/B, siehe 3.1.7) und D_2O als Lösungsmittel zeigt Abb. 47. Die erhaltenen Ratenkonstanten sind in Tab. 15 gegenübergestellt.

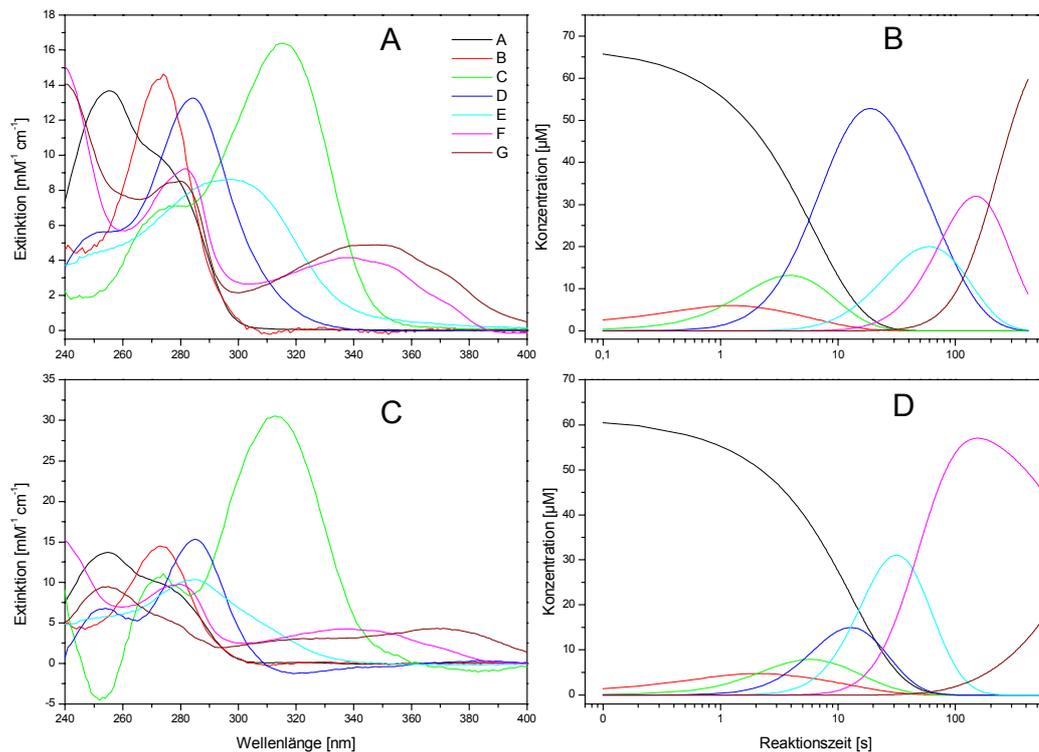


Abb. 47: Vergleich der numerischen Simulation der stöchiometrischen Reaktion der GTP Cyclohydrolase I mit GTP als Substrat in 50 mM Tris/HCl pH 8,5 und 100 mM KCl. Als Lösungsmittel wurde Wasser (A/B) bzw. D₂O (C/D) verwendet.

Für die numerische Optimierung der Experimente in D₂O (Abb. 47C/D) wurden die UV-Spektren von GTP (Transient A) und hGTP (Transient B) vorgegeben. Die in beiden Simulationen erhaltenen UV-Spektren der optischen Transienten sind durchaus ähnlich. Im D₂O Experiment (Abb. 47C) zeigt der optische Transient C deutlich negative Extinktion im kurzwelligen Bereich und eine unnatürlich hohe Extinktion im Bereich des Extinktionsmaximums. Weiterhin unterscheiden sich die optischen Transienten E und G im D₂O Experiment (Abb. 47C) deutlich von den entsprechen optischen Transienten des Experimentes mit Wasser (Abb. 47A). Dies macht einen direkten Vergleich der beiden Experimente schwierig. Die Bestimmung von Isotopeneffekten aus den berechneten Modellen heraus ist nur bei gleichen UV-Spektren der einzelnen Intermediate sinnvoll. Werden die UV-Spektren zur Berechnung des Modells vorgegeben, so sind die erhaltenen Abweichungen zwischen Modell und experimentellen Daten zu groß.

Ratenkonstanten [s⁻¹]		
	Reaktion in Wasser	Reaktion in D ₂ O
k ₁	0,23 ± 0,004	0,13 ± 0,0072
k ₋₁	0,56 ± 0,05	0,56 ± 0,03
k ₂	1,50 ± 0,03	0,85 ± 0,085
k ₃	0,48 ± 0,006	0,41 ± 0,022
k ₄	0,016 ± 0,006	0,15 ± 0,011
k ₅	0,025 ± 0,0001	0,031 ± 0,0004
k ₆	0,0073 ± 0,0003	0,0006

Tab. 15: Vergleich der Ratenkonstanten aus der numerischen Simulation der Reaktin von GTP mit GTP Cyclohydrolase I in Wasser bzw. D₂O.

3.1.8 Umsetzung von [1',2',3',4',5',8-¹³C₆,7-¹⁵N₁]GTP mit GTP Cyclohydrolase I

Um die Struktur des Hauptintermediates aufzuklären, wurde GTP Cyclohydrolase I mit [1',2',3',4',5',8-¹³C₆,7-¹⁵N₁]GTP umgesetzt. Dazu wurden 0,8 mM [1',2',3',4',5',8-¹³C₆,7-¹⁵N₁]GTP bei 30 °C in 20 mM Kaliumphosphat pH 8,5 und 0,1 M KCl mit 32 mg GTP Cyclohydrolase I (ca. 1,2 mM aktive Zentren) inkubiert. Die Reaktion wurde nach 12 s durch Zugabe von 20 µl 0,1 M TCA gestoppt. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert, der Überstand lyophilisiert und in 0,5 ml D₂O aufgenommen. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie.

Bei dem ¹³C-NMR Spektrum (Abb. 48) handelt es sich um die saure, mit TCA gequenchte Reaktionslösung in D₂O. Die Reaktionsmischung enthält noch zu etwa 40 % nichtumgesetztes GTP (Signale nicht gezeigt). Die restlichen Signale sind typisch für eine Ribose-5-phosphat. Charakteristisch sind die beiden glykosidischen Kohlenstoffatome mit einer chemischen Verschiebung von 101 ppm (β) bzw. 96 ppm (α). Das Verhältnis der beiden β/α Anomeren ergibt sich aufgrund der relativen Intensitäten der NMR-Signale zu etwa 1,5. Die restlichen Kohlenstoffatome zeigen aufgrund der ¹³C¹³C-Kopplung relativ komplexe Kopplungsmuster.

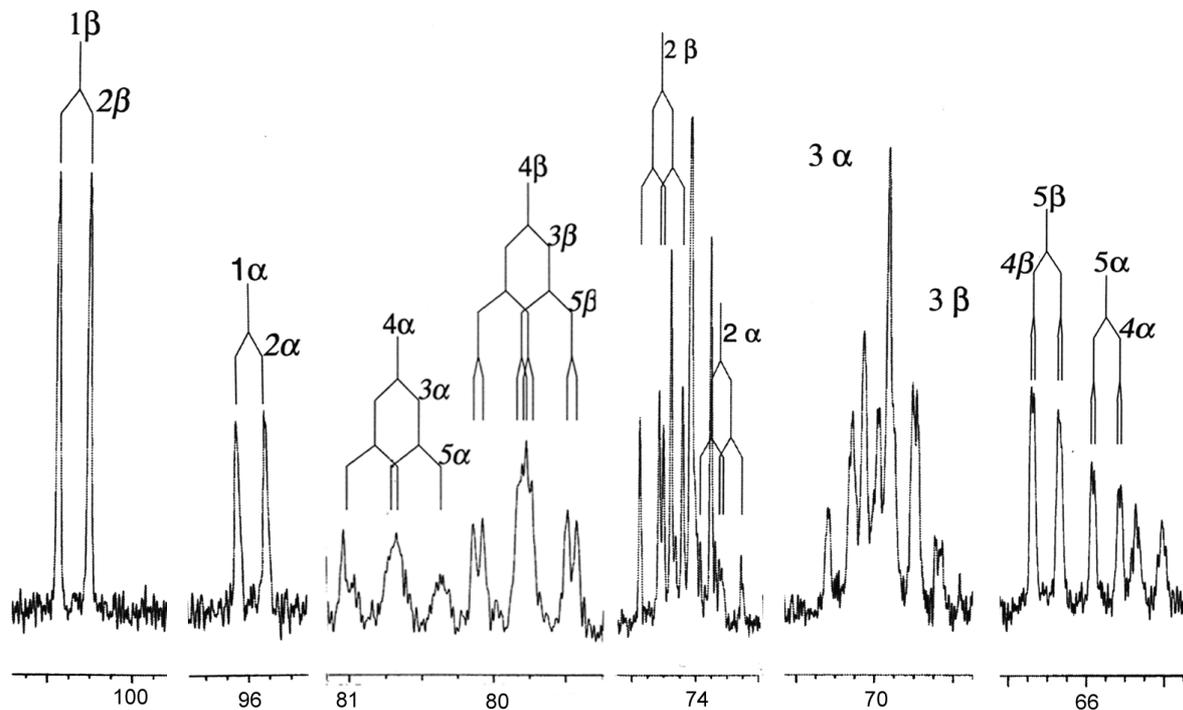


Abb. 48: ^{13}C -NMR Spektrum einer Reaktionslösung, erhalten durch Umsetzung von $[1',2',3',4',5',8\text{-}^{13}\text{C}_6,7\text{-}^{15}\text{N}_1]\text{GTP}$ mit GTP Cyclohydrolase I. Die Reaktion wurde nach 12 s Reaktionszeit in 20 mM Kaliumphosphat pH 8,5 und 100 mM KCl bei 30 °C mit TCA gequencht. Nach Abtrennen des ausgefallenen Proteins wurde die Lösung lyophilisiert, der Rückstand in D_2O aufgenommen und NMR-spektroskopisch vermessen.

Im ^{13}C -Spektrum sind keine Signale der Formamid-Struktur (Intermediat **27**) zu sehen (^{13}C -NMR-Daten siehe Ref. [63]). Dies ist zu erwarten, da aus Quenched-Flow Experimenten bekannt ist, dass die Konzentration dieser Intermediate sehr gering ist und das Konzentrationsmaximum etwa nach 1 s auftritt. Ebenso fehlt das ^{13}C -Signal des abgespaltenen Formiates. Da die Reaktionslösung sauer gequencht und auch im Sauren lyophilisiert wurde, ist abgespaltenes Formiat vermutlich als Ameisensäure im Vakuum abgezogen worden. Eine Zusammenfassung der ^{13}C -NMR-Signale findet sich in Tab. 16.

Verbindung	Position	chemische Verschiebung [ppm]
α -Ribose	1'	95,91
	2'	73,66
	3'	70,14
	4'	81,18
	5'	65,71
β -Ribose	1'	100,68
	2'	74,53
	3'	69,82
	4'	80,28
	5'	66,50

Tab. 16: ^{13}C -NMR Signale aus der Umsetzung von 0,8 mM $[1',2',3',4',5',8-^{13}\text{C}_6,7-^{15}\text{N}_1]\text{GTP}$ mit 1,2 mM GTP Cyclohydrolase I. Die Reaktionslösung in 20 mM Kaliumphosphat pH 8,5 und 100 mM KCl wurde nach 15 s bei 30 °C mit TCA gequenched, lyophilisiert, in 0,5 ml D_2O aufgenommen und NMR-spektroskopisch vermessen.

Bei den beiden ^{13}C -Signale bei 101 ppm (α -Isomer) und 96 ppm (β -Isomer) handelt es sich um die anomeren Zentren freier Ribose. Diese ist in der Reaktionsmischung zu etwa 50 – 60 % vorhanden. Freie Ribose kann in der Reaktionsmischung nur durch Hydrolyse einer N-glykosidischen Bindung vorliegen. Das Fehlen von Formamid-Signalen im ^{13}C -NMR zeigt, dass die vorhandene Ribose nicht durch Hydrolyse von hGTP (**27**), welches im sauren stabil ist, entstanden sein kann. Hätte sich in der Reaktionsmischung das Produkt der Amadori-Umlagerung angereichert, so müssten sich im ^{13}C -NMR die charakteristischen Signale einer Carbonylgruppe und einer Methylengruppe zeigen. Eine saure Hydrolyse des Amadori-Produktes unter Bildung einer Ribose ist vermutlich nicht möglich. Die in der Reaktionsmischung vorhandene Ribose kann somit nur aus einer Verbindung entstanden sein, die sich in der Reaktionsmischung anreichert und im Sauren hydrolysiert wird. Vor allem Intermediat **28** (Abb. 49) erscheint als Hauptintermediat in Frage zu kommen. Da die Reaktion der Ringöffnung der Riboseeinheit reversibel ist, kommen auch die Verbindungen **29** und **30** (Abb. 49) als Hauptintermediat in Frage.

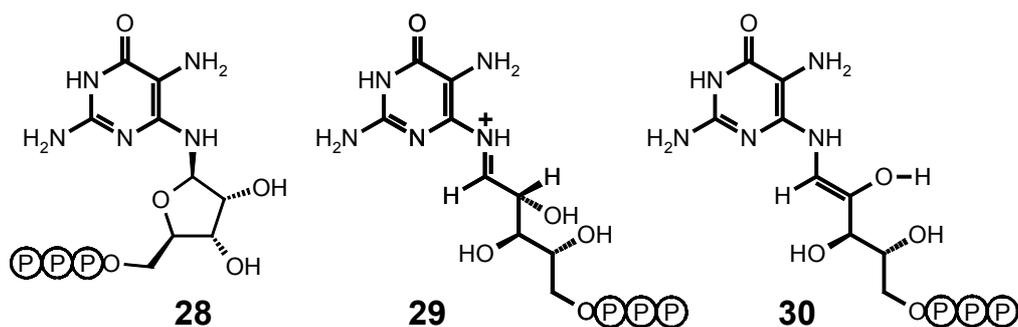


Abb. 49: Mögliche Hauptintermediate der GTP Cyclohydrolase I Reaktion (siehe auch Abb. 5).

3.1.9 Die Rolle des Zink in der GTP Cyclohydrolase I Reaktion

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass verschiedene Mutanten der GTP Cyclohydrolase I GTP nicht mehr umsetzen können [61]. Aus der Kristallstruktur des humanen Enzyms ist bekannt, dass die GTP Cyclohydrolase I ein Zink im aktiven Zentrum enthält [62]. An der Zinkbindung sollen die Aminosäuren H113, C110 und C181 (Notation des Enzyms aus *E. coli*) beteiligt sein. Zur Charakterisierung der Reaktionsschritte, für die Zink notwendig ist, wurden verschiedene Mutanten der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* gereinigt, die Aktivität mit GTP bzw. hGTP als Substrat, und der Zinkgehalt der Mutanten bezogen auf die aktiven Zentren, bestimmt (Tab. 17).

Mutation	Zinkgehalt [%]	Aktivität (GTP) [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]	Aktivität (hGTP) [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]
ohne	90	91	88
H112S	< 0,1	< 0,1	< 0,1
H113S	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C110S	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C181S	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Tab. 17: Zinkgehalt und enzymatische Aktivität verschiedener Mutanten der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*. Der Zinkgehalt ist bezogen auf die aktiven Zentren des Enzyms. Die Aktivität gibt die Umsetzung von GTP bzw. hGTP zu Dihydroneopterintriphosphat mit dem jeweiligen Enzym bei 37 °C in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5 und 100 mM KCl an.

Das Wildtyp-Enzym enthält ca. 90 % Zink, bezogen auf die aktiven Zentren der GTP Cyclohydrolase I. Die beiden Cystein-Mutanten C110S und C181S sowie die beiden Histidin-

Mutanten H112S und H113S enthalten kein Zink. Alle vier Mutanten setzen weder GTP noch hGTP (**27**) in nachweisbarer Menge um. Zink scheint somit essentiell für die Hydrolyse des Imidazolrings sowie für die nachfolgende Abspaltung von Formiat aus GTP zu sein.

3.2 Die GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli*

3.2.1 Reinigung der GTP Cyclohydrolase II

Die Reinigung der GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* erfolgte durch Anionenaustausch-Chromatographie an Q Sepharose FF bei pH 8,2 in 20 mM Tris/HCl. Die Elution erfolgte mittels KCl-Gradienten. Die abschließende Reinigung erfolgte durch Gelfiltration an Sephacryl 75 [83].

3.2.2 Quenched-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase II

Mit Hilfe der Quenched-Flow Technik (siehe 3.1.3) wurde die stöchiometrische Umsetzung von GTP mit GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* untersucht. Die Quenched-Flow Experimente wurden in 50 mM Tris/HCl pH 8,5 und 5 mM MgCl₂ als Reaktionspuffer durchgeführt. Das Enzym wurde in 1,5 bis 3-fachem Überschuß verwendet. Die Reaktion wurde durch Vermischen mit 0,2 M Trichloressigsäure (TCA) gestoppt.

Die Reaktionszeit wurde zwischen 0,1 und 200 s variiert. Die minimale Reaktionszeit von 0,1 s ergab sich aus der Zeit die benötigt wurde, um den Reaktionsloop mit Puffer zu spülen und anschließend mit Reaktionslösung zu füllen.

Die Auftrennung der gequenchten Reaktionslösung erfolgte mittels HPLC an Hypersil RP-18. Die Detektion der Produkte erfolgte photometrisch mittels Diodenarray Photometer. Abb. 50 zeigt typische HPLC-Chromatogramme der Detektion von GTP (**5**) bzw. 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphate (**17**).

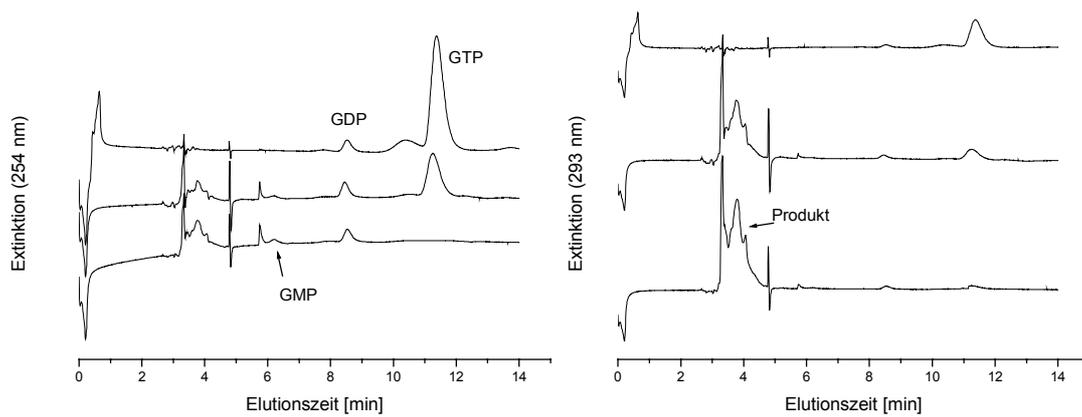


Abb. 50: Typische HPLC-Chromatogramme zur Detektion von GTP und GMP (linkes Chromatogramm, 254 nm) bzw. 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphate (rechtes Chromatogramm, 330 nm). Gezeigt sind jeweils Chromatogramme zu Reaktionsbeginn (0 s), nach 20 s und 120 s Reaktionszeit. Die Trennung erfolgte an Hypersil RP18 5 μ . Als Eluent wurde Triethylamin/Phosphorsäure 85 %ig/Isopropanol/Wasser 10:5:3:982 pH 7,0 verwendet.

Die so gewonnenen experimentellen Daten wurden zur Berechnung der Ratenkonstanten verwendet. Dazu wurde ein kinetisches Modell der enzymatischen Reaktion aufgestellt. Da neben 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat, dem eigentlichen Produkt der enzymatischen Reaktion, nur noch GMP als weiteres Produkt detektiert werden konnte, wurde das in Abb. 51 gezeigte Modell für die enzymatische Reaktion der GTP Cyclohydrolase II unter stöchiometrischen Bedingungen aufgestellt.



Abb. 51: Modell für die Reaktion der GTP Cyclohydrolase II.

Dieses System lässt sich durch folgendes Differentialgleichungssystem beschreiben:

$$\frac{d[GTP]}{dt} = -k_1 \cdot [GTP] - k_2 \cdot [GTP]$$

$$\frac{d[17]}{dt} = k_1 \cdot [GTP]$$

$$\frac{d[GMP]}{dt} = k_2 \cdot [GTP]$$

Die Parameter c_0 (GTP), k_1 und k_2 dieses Differentialgleichungssystems wurden nun mit Hilfe des Programms SCIENTIST 2.02 (MicroMath Inc.) an die experimentellen Daten angepasst. Es wurden folgende Startbedingungen festgelegt:

$$c_0(\text{GTP}) = 58 \mu\text{M}$$

$$c_0(\text{GMP}) = c_0(17) = 0$$

$$k_1 = 0,1$$

$$k_2 = 0,01$$

Das Ergebnis der numerischen Optimierung ist in Abb. 52 gezeigt. Die Parameter sind in Tab. 18 zusammengefasst.

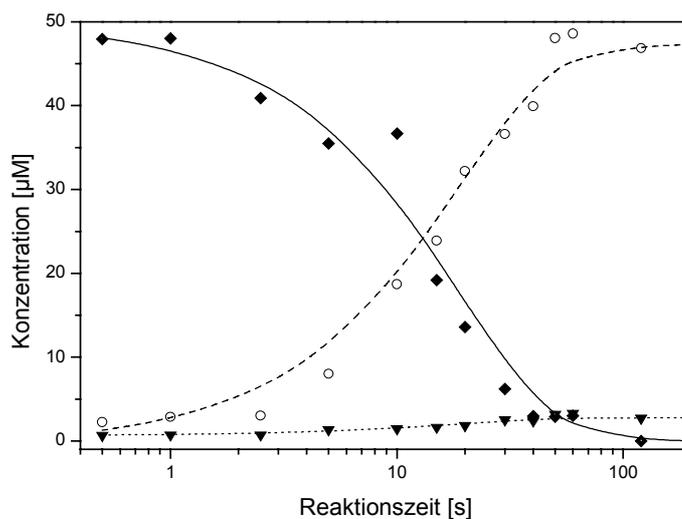


Abb. 52: Numerische Simulation eines Reaktionsmodells für die Bildung von GMP und 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat aus GTP durch die GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli*. Symbole repräsentieren die durch Quenched-Flow Experimente gefundenen Konzentrationen. ■, GTP; ○, 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; ▼, GMP. Die Konzentrationsprofile des Modells aus Abb. 51 sind als Linien gezeichnet.

	Ratenkonstante [s^{-1}]
k_1	$0,0624 \pm 0,002$
k_2	$0,0020 \pm 0,00091$

Tab. 18: Kinetische Konstanten aus single turnover Experimenten mit GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli*. Es wurde das kinetische Schema aus Abb. 51 zugrundegelegt.

Die experimentellen Daten zeigen eine gute Korrelation zwischen der GTP Abnahme und der Bildung des Substrates. Es konnte kein Intermediat der Reaktion detektiert werden. Unter stöchiometrischen Bedingungen entstehen etwa 5 % GMP bezogen auf das Hauptprodukt der Reaktion. Die Ratenkonstante für die Bildung von **17** beträgt etwa $0,06 s^{-1}$, die Ratenkonstante für die Bildung von GMP etwa $0,002 s^{-1}$. Die Halbwertszeit für GTP sowie für das Produkt (**17**) beträgt etwa 10 s. Für GMP beträgt die Halbwertszeit ca. 20 s.

3.2.3 Stopped-Flow Experimente mit GTP Cyclohydrolase II

Durch Stopped-Flow Experimente sollte die stöchiometrische Umsetzung von GTP bzw. hGTP mit GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* untersucht werden. Die Stopped-Flow Experimente wurden in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5 und 5 mM MgCl₂ als Reaktionspuffer durchgeführt. Das Enzym wurde in 1,5 bis dreifachem Überschuss bezogen auf die aktiven Zentren verwendet. Die Reaktionszeit wurde zwischen 100 ms und 200 s variiert.

Um den Hintergrund, d.h. Absorption durch Puffer, Enzym usw. eliminieren zu können, wurden alle Experimente unter gleichen Bedingungen zweimal durchgeführt. Durch Mischen von Enzym mit Substrat wurde ein Datensatz erhalten, die die Extinktionsänderung des gesamten Systems enthielt. In einem zweiten Experiment wurde durch Mischen von Enzym und Puffer die Extinktionsänderung des Hintergrunds, verursacht durch Enzym und Puffer, erhalten. Die beiden so erhaltenen Datensätze wurden voneinander subtrahiert und so die Extinktionsänderung, verursacht durch die Reaktion des Substrates, erhalten.

Die Auswertung der UV-Datensätze erfolgte mit Hilfe des Programms SPECFIT/32 (Spectrum Software Associates). Dieses Programm ermöglicht die Berechnung von Ratenkonstanten einzelner Teilschritte und die Extraktion der zu den jeweiligen Intermediaten gehörigen UV-Spektren nach Vorgabe eines kinetischen Modells.

UV-Spektrenserien aus der stöchiometrischen Umsetzung von GTP bzw. hGTP mit GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* sind in Abb. 53 gezeigt. Der Datensatz aus Abb. 53B ist um den nichtumgesetzten Anteil an α -Isomer (**2a**, **2d**, 55 %) korrigiert.

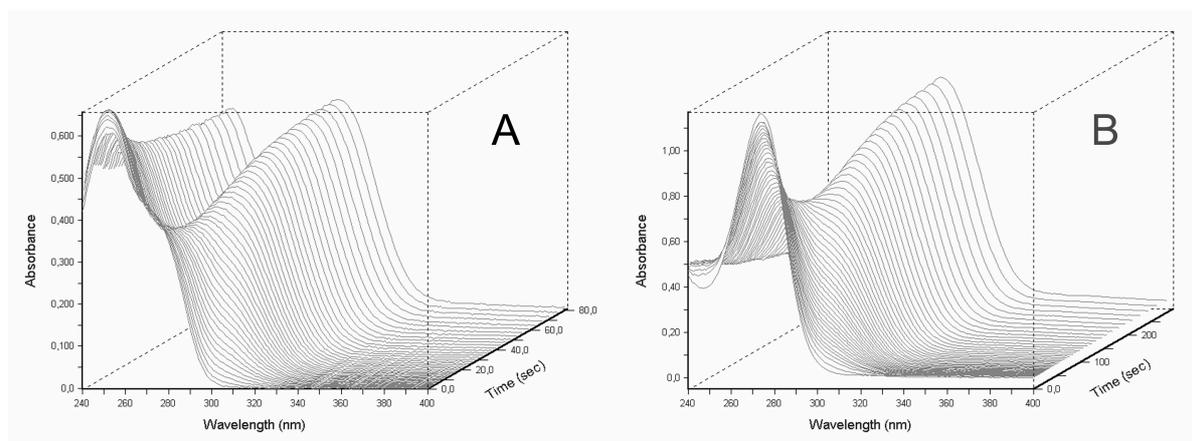


Abb. 53: UV-Spektrenserie der stöchiometrischen Reaktion der GTP Cyclohydrolase II bei 30 °C. A: GTP als Substrat, B: hGTP als Substrat.

Ausgewählte UV-Spektren aus Abb. 53 sind in Abb. 54 gezeigt. In den ersten Sekunden der Reaktion mit GTP als Substrat ändert sich das UV-Spektrum merklich. Die Extinktion im kurzwelligen Bereich nimmt zu (Abb. 54A) und das Extinktionsmaximum verschiebt sich um ca. 4 nm. Nach 6 s Reaktionszeit besitzt das UV-Spektrum der Reaktionsmischung bereits einen merklichen Anteil an langwelliger Absorption, bedingt durch die Produktbildung. Das nach 20 s aufgenommene UV-Spektrum (Abb. 54B) ähnelt stark dem UV-Spektrum von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat (Abb. 32), dem Produkt der GTP Cyclohydrolase II Reaktion. Im weiteren Verlauf nimmt die Extinktion im langwelligen Bereich kontinuierlich zu. Dieser langsame Prozeß ist vermutlich auf eine Photoreaktion (siehe auch 3.1.7.2) zurückzuführen. Im Experiment mit GTP als Substrat existiert bei 284 nm ein isosbestischer Punkt (Abb. 54A). Auch im Experiment mit hGTP ändert sich die Extinktion bei 284 nm nur wenig (Abb. 54B, Abb. 55C). In beiden Experimenten nimmt mit steigender Reaktionszeit die Extinktion im langwelligen Bereich (>300 nm) zu. Besonders deutlich ist dies in Abb. 55B zu sehen. Das UV-Spektrum nach 160 s Reaktionszeit besitzt bereits eine deutliche Absorption bei 340 nm. Wie oben bereits beschrieben handelt es sich dabei vermutlich um photochemische Reaktionen. Die Umsetzung von GTP bzw. hGTP mit GTP Cyclohydrolase II scheint in beiden Fällen ohne photometrisch detektierbares Intermediat abzulaufen. Es tritt kein langwelliges Intermediat auf.

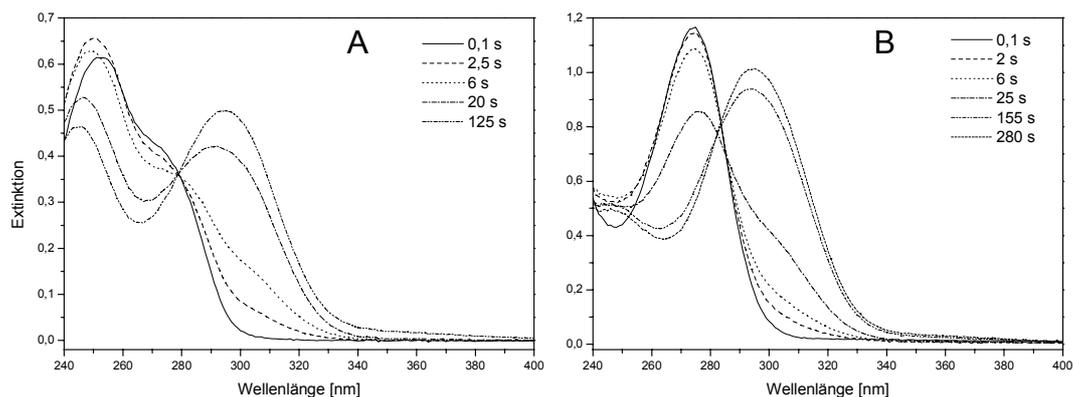


Abb. 54: Ausgewählte UV-Spektren aus Abb. 53.

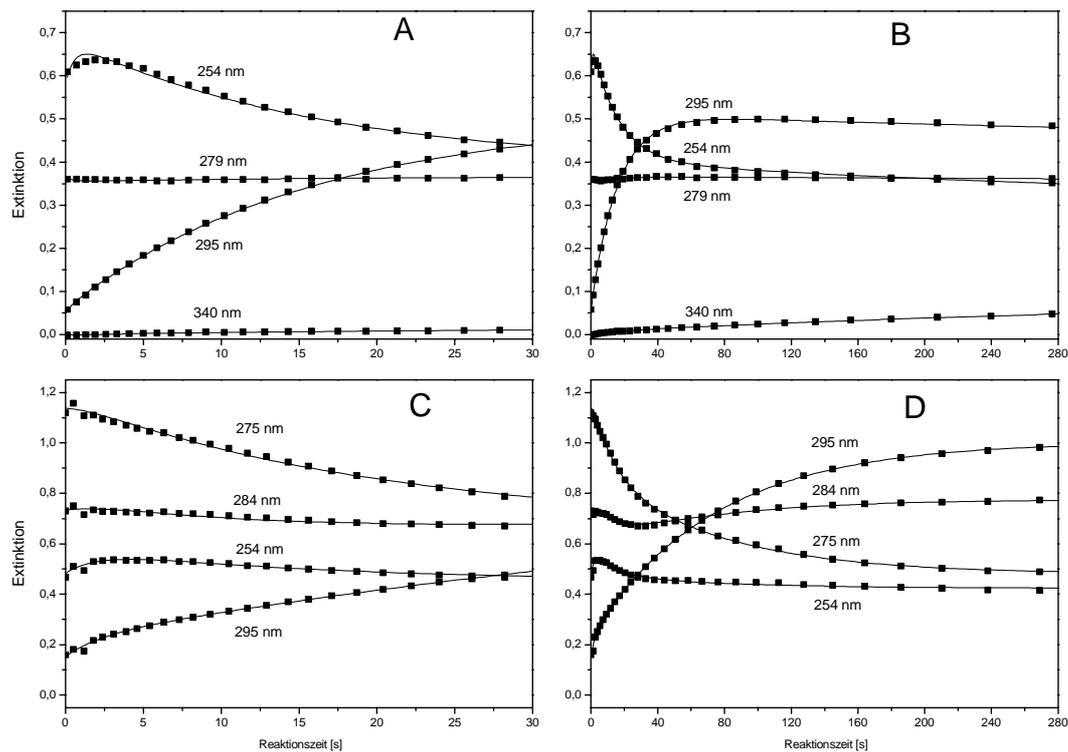


Abb. 55: Absorption-Zeit Kurven aus Stopped-Flow Experimenten mit GTP Cyclohydrolase II. A, B: GTP als Substrat. C, D: hGTP (27) als Substrat.

Für eine detaillierte Analyse wurden die Datensätze aus Abb. 53 mit Hilfe des Programms SPECFIT/32 einer Eigenwertanalyse unterzogen. Für das GTP Experiment sowie für das hGTP Experiment wurden 3 linear unabhängige optische Prozesse gefunden. Zur numerischen Optimierung der GTP Cyclohydrolase II Reaktion mit GTP als Substrat wurde daher ein Modell aus 3 Teilschritten angenommen, wobei der letzte Schritt einen photochemischen Prozeß darstellen soll (Abb. 56). Zusätzlich wurde ein weiterer Reaktionsschritt eingefügt, der die Bildung von GMP darstellt. Da aus rein optischen Daten nicht zwischen GTP und GMP unterschieden werden kann, wurde das UV-Spektrum von GMP sowie die Ratenkonstante für die GMP Bildung aus den Quenched-Flow Experimenten im Modell vorgegeben.

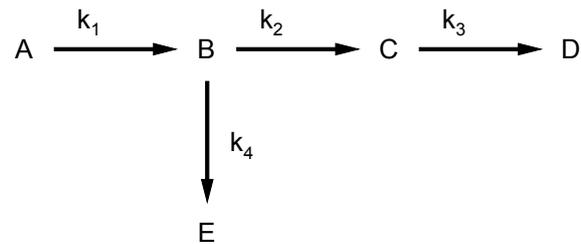


Abb. 56: Modell für die numerische Simulation der GTP Cyclohydrolase II Reaktion mit GTP als Substrat.

Mit hGTP als Substrat der GTP Cyclohydrolase II erfolgt keine GTP Bildung. Ebenso wenig erfolgt in nachweisbarer Menge Phosphathydrolyse unter Bildung von 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinone-5'-phosphat. Als Modell für die numerische Simulation wurde daher das um die GMP Bildung vereinfachte Modell aus Abb. 56 verwendet.

Das optimierte Modell für das GTP Experiment ist in Abb. 57A/B gezeigt. Die extrahierten UV-Spektren der optischen Spezies A bis D sind in Abb. 57A zu sehen, Abb. 57B zeigt die nach dem Modell erhaltenen Konzentrations-Zeit-Kurven der optischen Spezies. Zum Vergleich zeigt Abb. 57C/D die Ergebnisse der numerischen Optimierung des hGTP Experiments. Die Qualität der numerischen Optimierung kann durch einen Vergleich der experimentellen Absorptions-Zeit Daten (Abb. 55, Symbole) mit den Absorptions-Zeit Kurven (Abb. 55, Linien) der Modelle abgeschätzt werden.

Im Experiment mit GTP nimmt der optische Transient A sehr schnell ab und ist nach ca. 3 s Reaktionszeit abgeklungen (Abb. 57B). Der entstehende optische Transient B erreicht nach ca. 2 s seine maximale Konzentration von etwa 95 % der eingesetzten GTP Konzentration. Das extrahierte UV-Spektrum des optischen Transienten ähnelt stark dem UV-Spektrum von GTP (optischer Transient A, Abb. 57A), ist aber um ca. 3 nm hyperchrom verschoben. Es ist bekannt, dass die GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* kooperative Eigenschaften besitzt [65]. Der optische Transient A könnte daher freies, der optische Transient B hingegen enzymgebundenes GTP darstellen.

Der optische Transient C erreicht nach etwa 50 s seine maximale Konzentration von ca. 85 % der eingesetzten GTP Menge. Das UV-Spektrum des optischen Transienten C besitzt ein Maximum bei 295 nm und ähnelt dem UV-Spektrum von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-phosphat (17, Abb. 6), dem Produkt der GTP Cyclohydrolase II Reaktion. Aus diesem optischen Transienten wird in einer langsamen Reaktion der optische Transient D gebildet. Dieser Transient D besitzt eine ausgeprägte Absorption im langwelligeren Bereich des

UV-Spektrums und stellt vermutlich ein durch die Belichtung mit UV-Licht entstandenes Oxidations-/Zersetzungsprodukt dar (vergl. auch 3.1.7.2).

Da die UV-Spektren von GMP und GTP identisch sind, wurde für den optischen Transienten E (GMP) das UV-Spektrum für GTP (optischer Transient A) vorgegeben.

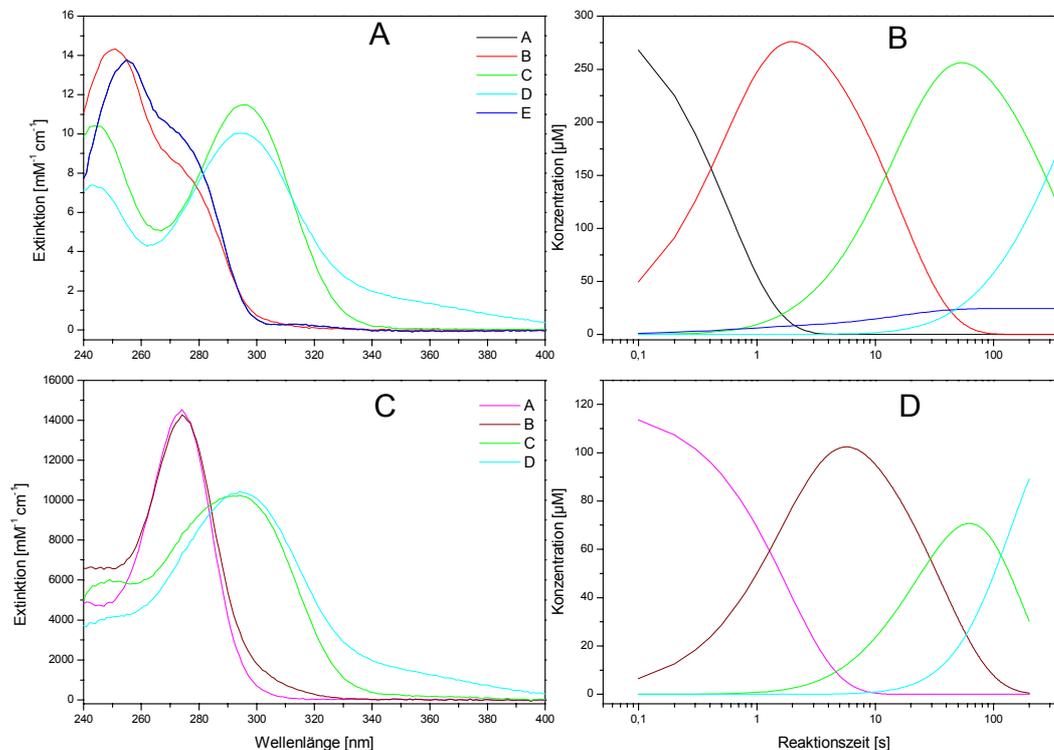


Abb. 57: Ergebnisse der numerischen Optimierung der stöchiometrischen Reaktion der Wildtyp GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* mit GTP (A/B) bzw. hGTP (C/D) als Substrat. In A sind die UV-Spektren für den optischen Transienten A (=GTP) und den optischen Transienten E (=GMP) identisch!

Im Experiment mit hGTP nimmt der optische Transient A (hGTP) deutlich langsamer ab als im Experiment mit GTP (optischer Transient A entspricht hier GTP) (Abb. 57B/D). Während GTP innerhalb von 3 s vollständig zum optischen Transienten B umgesetzt wird, benötigt die Umsetzung von hGTP unter gleichen Reaktionsbedingungen 10 s.

Das UV-Spektrum des optischen Transienten B im Experiment mit hGTP (Abb. 57C) ist beinahe identisch mit dem UV-Spektrum des optischen Transienten A (hGTP). Außerdem ist das Absorptionsmaximum um 2 nm bathochrom verschoben. Wie im Experiment mit GTP bereits beschrieben, könnten die Unterschiede im UV-Spektrum der beiden optischen Transienten bedingt sein durch die kooperativen Eigenschaften des Enzyms. Der optische Transient B erreicht nach ca. 5 s seine maximale Konzentration von ca. 90 % der eingesetzten hGTP Konzentration.

Der optische Transient C erreicht im Experiment mit hGTP nach ca. 65 s seine maximale Konzentration von etwa 60 % der eingesetzten hGTP Konzentration (Abb. 57D). Das UV-Spektrum des optischen Transienten C ähnelt dem UV-Spektrum des GTP Cyclohydrolase II Produktes (Abb. 32).

Der optische Transient C geht in einer langsamen Reaktion in den optischen Transienten D über. Dieser Transient D besitzt eine ausgeprägte Absorption im langwelligen Bereich des UV-Spektrums und stellt vermutlich ein durch die UV-Belichtung entstandenes Zersetzungsprodukt dar (vergl. auch 3.1.7.2).

Ratenkonstante	GTP als Substrat [s^{-1}]	hGTP als Substrat [s^{-1}]
k_1	$0,92 \pm 0,014$	$0,55 \pm 0,015$
k_2	$0,062 \pm 0,0002$	$0,028 \pm 0,0032$
k_3	$0,0020 \pm 0,00009$	$0,0087 \pm 0,0005$
k_4	$0,0022$	

Tab. 19: Ratenkonstanten aus der numerischen Optimierung der Reaktion von GTP bzw. hGTP mit Wildtyp GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli*.

Abb. 58 zeigt den Vergleich der Quenched-Flow Daten der Reaktion von GTP mit GTP Cyclohydrolase II unter stöchiometrischen Bedingungen (Abb. 52) mit der numerischen Optimierung der Stopped-Flow Daten (Abb. 57B). Die Summe der optischen Transienten A und B entspricht dem Konzentrationsverlauf von GTP im Quenched-Flow Experiment. Die Rate der GMP Bildung aus GTP wurde in der numerischen Optimierung der Stopped-Flow Daten vorgegeben. Die Rate der GMP Bildung im Quenched-Flow Experiment entspricht daher der Rate der GMP Bildung im Stopped-Flow Experiment. Die Summe der optischen Transienten C und D entspricht dem Konzentrationsverlauf des GTP Cyclohydrolase II Produktes (17).

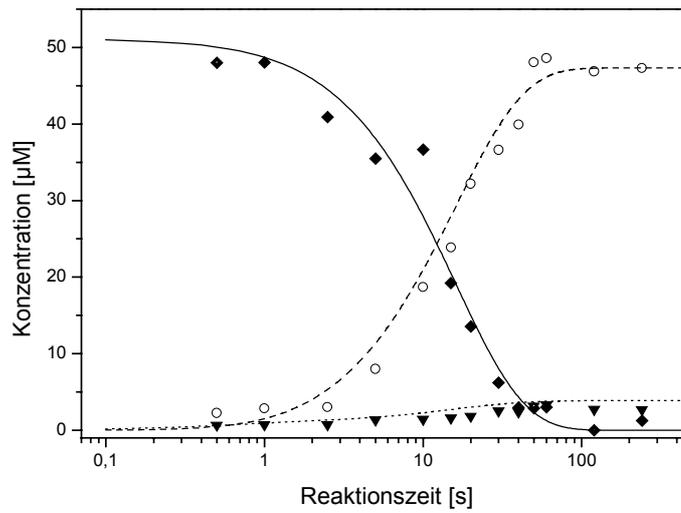


Abb. 58: Vergleich der Quenched-Flow Daten (Abb. 52) mit den Stopped-Flow Daten (Abb. 57B) einer Umsetzung von GTP mit GTP Cyclohydrolase II unter stöchiometrischen Bedingungen. ■: GTP (**5**); ○: 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat (**17**); ▼: GMP (**35**). —, Σ optische Transienten A und B; ---, Σ optische Transienten C und D; ·····, optischer Transient E.

3.3 Die Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase

Die Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase katalysiert die Reaktion von Dihydroneopterintriphosphat (**6**) zu 6-Pyruvoyltetrahydropterin (**7**, Abb. 8). Pyruvoyltetrahydropterin stellt den direkten Vorläufer von Tetrahydrobiopterin (**1**) dar.

3.3.1 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Maus

Die Reaktion der PTPS beginnt durch Abstraktion eines Protons von C-1' oder C-2'. In der Literatur werden beide alternativen Mechanismen der PTPS-Reaktion diskutiert [72, 84]. Zur näheren Untersuchung des Reaktionsmechanismus wurden zwei Wege beschrrieben. Mittels Stopped-Flow Technik wurden die stöchiometrische Umsetzung von Dihydroneopterintriphosphat mit PTPS durch zeitabhängige Aufnahme von UV-Spektren untersucht. Mittels NMR-Spektroskopie an ¹³C-markiertem Dihydroneopterintriphosphat wurde der Einbau von Deuterium in das Edukt der Reaktion untersucht. Für die Untersuchungen wurde ein Fusionsprotein aus MBP (*E. coli*) und PTPS (Maus) verwendet.

3.3.1.1 Stopped-Flow Experimente mit Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase

Die Reaktion der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase unter stöchiometrischen Bedingungen wurde mit Hilfe der Stopped-Flow Technik untersucht. Abb. 59 zeigt die UV-Spektrenserie eines Stopped-Flow Experimentes für die stöchiometrische Umsetzung von Dihydroneopterintriphosphat mit PTPS bei 37 °C.

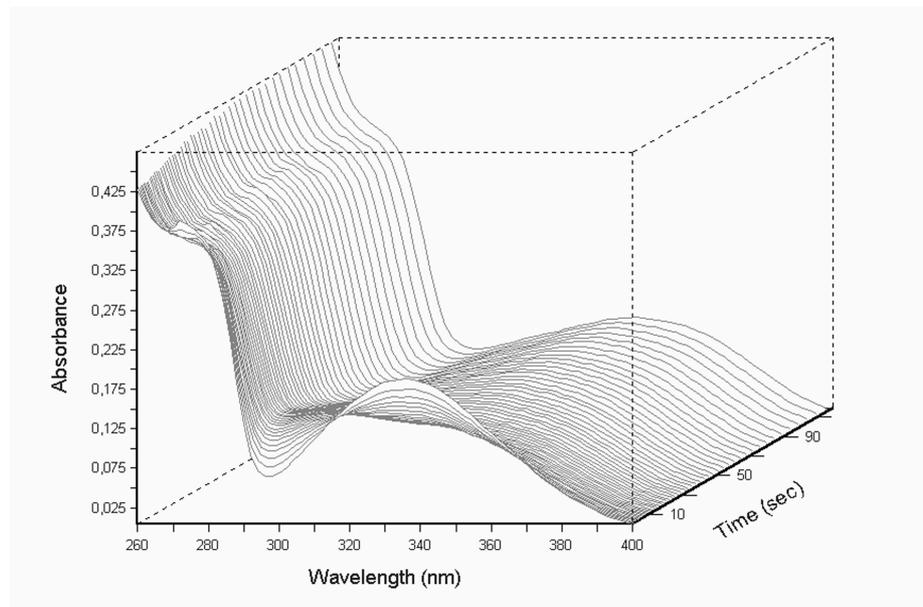


Abb. 59: UV-Datensatz eines single turnover Stopped-Flow Experimentes mit MBP-PTPS und Dihydroneopterintriphosphat in 50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 0,002 % Natriumazid bei 37 °C.

Ausgewählte UV-Spektren aus Abb. 59 sind in Abb. 60 gezeigt. Ausgesuchte Extinktionslinien sind in Abb. 61 zu sehen. Der Beginn der Reaktion ist gekennzeichnet durch eine schnelle Abnahme der Extinktion bei 336 nm. Dies entspricht der Abnahme von Substrat. Im gleichen Zeitraum nimmt die Extinktion bei 306 nm zu und erreicht nach ca. 11 Sekunden ihr Maximum. Das im Lauf der Reaktion entstehende Tetrahydropterin-System sollte aufgrund der fehlenden CN-Doppelbindung eine kürzerwellige Absorption besitzen als das Substrat. Abb. 62 zeigt das UV-Spektrum von Pyruvoyltetrahydropterin [84]. Das nach 11 Sekunden Reaktionszeit aufgenommene Spektrum (Abb. 60) besitzt Eigenschaften des in Abb. 62 gezeigten Spektrums von Pyruvoyltetrahydropterin.

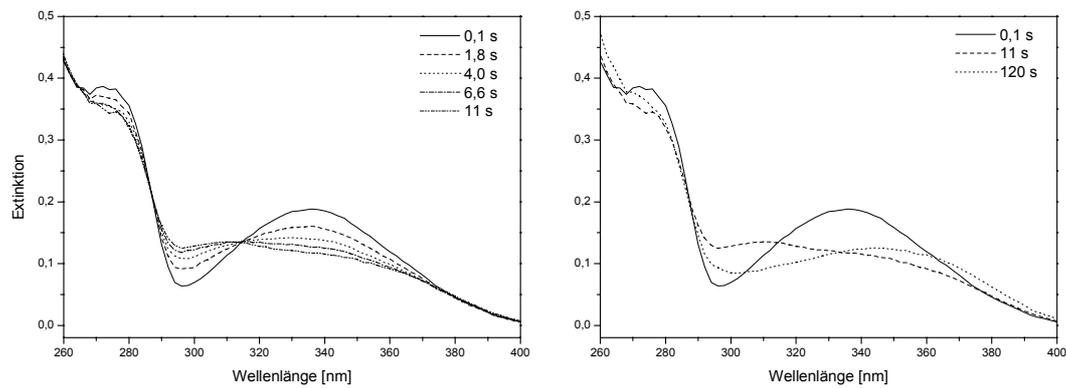


Abb. 60: UV-Spektren der stöchiometrischen Umsetzung von Dihydroneopterintriphosphat mit Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase.

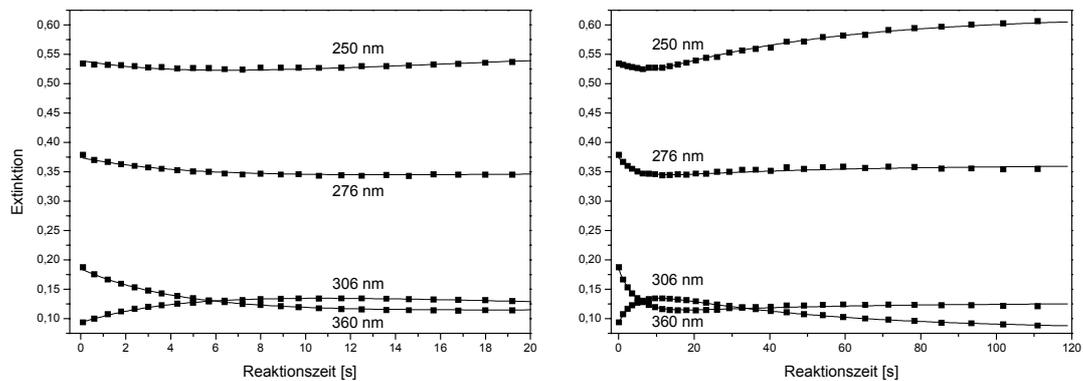


Abb. 61: Extinktions-Zeit-Kurven der stöchiometrischen Umsetzung von Dihydroneopterintriphosphat mit Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase. Symbole repräsentieren die Originaldaten, Linien repräsentieren die Daten der numerischen Simulation.

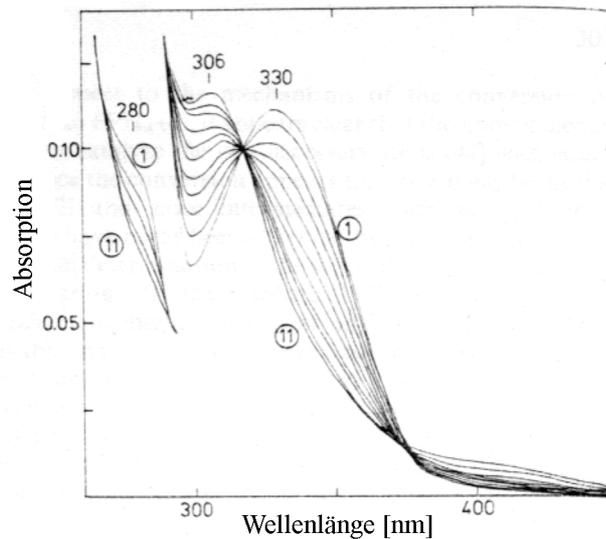


Abb. 62: UV-Spektrenserie der Reaktion von Dihydroneopterintriphosphat mit PTPS (aus Ref. [84]). 1: UV-Spektrum zu Beginn der Umsetzung (Dihydroneopterintriphosphat). 11: UV-Spektrum nach 60 min Reaktion bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen (Pyruvoyltetrahydropterin).

Im weiteren Reaktionsverlauf nimmt die Absorption bei 306 nm wieder ab. Es entsteht eine Verbindung mit einem langwelligem Absorptionsmaximum bei ca. 350 nm. Dies spricht für die Entstehung eines konjugierten Ringsystems. Da im Laufe der PTPS Reaktion kein konjugiertes System entsteht, stellt dieser langsame Prozeß vermutlich den oxidativen Abbau von Pyruvoyltetrahydropterin dar. Außerdem dürften sich hier photochemische Prozesse, verursacht durch die Bestrahlung mit energiereichem UV-Licht, bemerkbar machen (zur Diskussion von Photoprozessen bei Stopped-Flow Experimenten vergl. auch 3.1.7).

Zur genaueren Analyse der Reaktion der PTPS unter stöchiometrischen Bedingungen wurde der Datensatz mit Hilfe des Programms SPECFIT/32 (Spectrum Software Associates, Marlborough, USA) einer Eigenwertanalyse unterworfen. Dabei wurden zwei voneinander unabhängige optische Prozesse gefunden. Für die numerische Simulation wurde das kinetische Schema aus Abb. 63 verwendet.

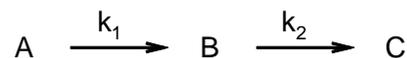


Abb. 63: Kinetisches Schema für die numerische Simulation der PTPS.

Die Ergebnisse der globalen Optimierung des Datensatzes sind in Abb. 64 gezeigt. Abb. 64A zeigt die Konzentrations-Zeit-Kurven der erhaltenen kinetischen Spezies. Abb. 64B zeigt die zugehörigen UV-Spektren der verschiedenen Spezies. Die Qualität der numerischen Simulation lässt sich aus dem Vergleich der experimentellen Extinktions-Zeit-Daten und den

Daten der Simulation abschätzen (Abb. 61). In Tab. 20 sind die Ratenkonstanten aus der Simulation zusammengefasst.

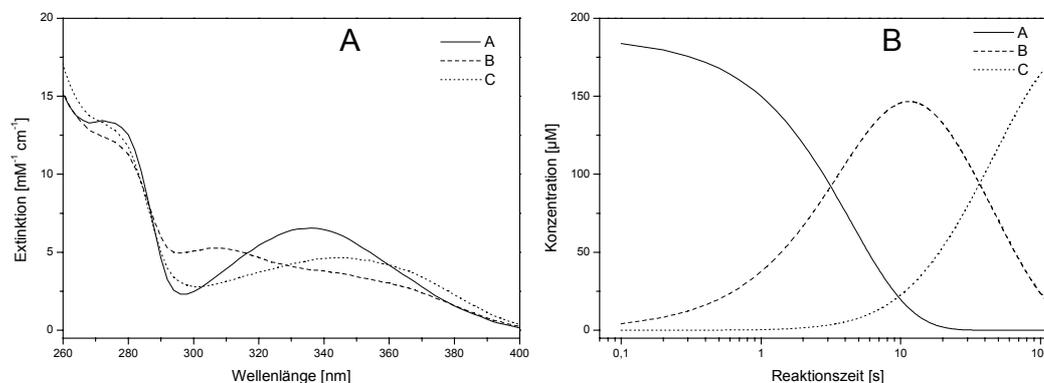


Abb. 64: Kinetisches Modell für die stöchiometrische Umsetzung von Dihydroneopterin-triphosphat mit Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase. A: Konzentrations-Zeit-Kurven der einzelnen kinetischen Spezies. B: UV-Spektren der verschiedenen kinetischen Spezies.

Geschwindigkeitskonstante [s⁻¹]	
k_1	$0,2259 \pm 0,003$
k_2	$0,0217 \pm 0,0004$

Tab. 20: Geschwindigkeitskonstanten für das Modell der stöchiometrische Umsetzung von Dihydroneopterin-triphosphat mit Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase.

Das extrahierte Spektrum von Spezies A stimmt recht gut mit dem UV-Spektrum von Dihydroneopterin-triphosphat überein. Die Konzentration des optischen Transienten A sinkt innerhalb von 20 s auf 0 ab. Die maximale Konzentration erreicht der optische Transient B nach ca. 11 s. Aus Arbeiten von Takikawa *et al.* ist das UV-Spektrum von Pyruvoyltetrahydropterin bekannt (Abb. 62) [84]. Es zeichnet sich durch ein relatives Maximum bei 306 nm aus. Im Vergleich zum Substrat ist die Extinktion von Pyruvoyltetrahydropterin bei 280 nm und bei 330 nm geringer.

Das extrahierte UV-Spektrum des optischen Transienten B besitzt diese Merkmale, so dass es sich hier um das enzymatische Produkt handeln könnte. Der nachfolgende optische Transient C besitzt demgegenüber wieder ein Extinktionsmaximum bei ca. 345 nm. Dieser Transient entsteht langsam aus B und erreicht nach 120 s ca. 95 % der Maximalkonzentration. Die gefundenen Ratenkonstanten betragen für den ersten Reaktionsschritt $0,23 \text{ s}^{-1}$ und für den zweiten Reaktionsschritt $0,022 \text{ s}^{-1}$.

Die Umsetzung der PTPS unter stöchiometrischen Bedingungen wurde bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Ein Modell mit zwei voneinander unabhängigen optischen Prozessen wurden wie oben an die dabei erhaltenen Datensätze numerisch angepasst. In Tab. 21 sind die erhaltenen Ratenkonstanten zusammengefasst.

Temperatur [°C]	k_1 [s ⁻¹]	k_2 [s ⁻¹]
20	0,0564	0,0075
24	0,0973	0,0111
29	0,133	0,0136
34	0,177	0,0154
37	0,228	0,0215

Tab. 21: Ratenkonstanten der PTPS unter stöchiometrischen Bedingungen bei verschiedenen Reaktionstemperaturen.

Um die Aktivierungsenergien der beiden Reaktionsschritte zu erhalten, wurden die Ratenkonstanten nach Arrhenius aufgetragen und die erhaltenen Werte einer linearen Regression unterworfen. Abb. 65 zeigt die Arrhenius-Auftragung mit den erhaltenen Regressionsgeraden. In Tab. 22 sind die Aktivierungsenergien der beiden Schritte zusammengefasst.

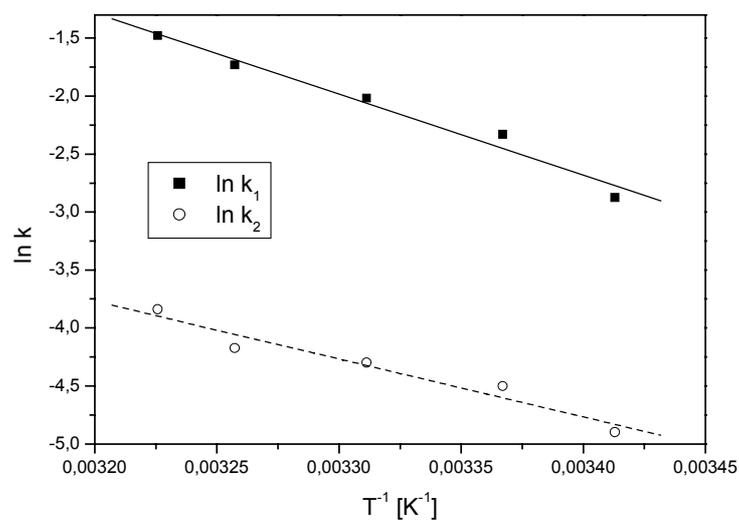


Abb. 65: Arrhenius-Auftragung der Ratenkonstanten aus Tab. 21.

Reaktion	Aktivierungsenergie [kJ mol ⁻¹]
A → B	56
B → C	40

Tab. 22: Aktivierungsenergien einzelner Schritte der PTPS Reaktion nach Arrhenius.

3.3.1.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen zum Mechanismus der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase

Die PTPS katalysiert in zwei Schritten die Reaktion von Dihydroneopterintriphosphat zu Pyruvoyltetrahydropterin. Der erste Reaktionsschritt kann sowohl die Abspaltung eines Protons von C-1' als auch von C-2' sein (Abb. 8). Intermediär lässt sich in beiden Fällen ein Carbanion postulieren. Wird die Reaktion der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase in D₂O ausgeführt, so könnte sich Deuterium aus dem Lösungsmittel am Carbanion anlagern. Bildet sich deuteriertes Substrat, so sollte sich dieses aufgrund des Isotopeneffektes in der Reaktionsmischung anreichern (Abb. 66).

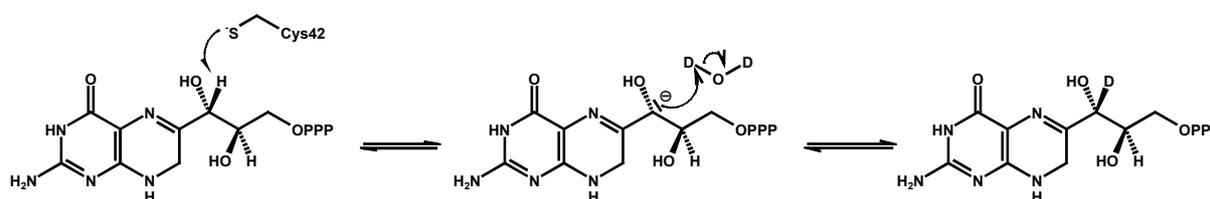


Abb. 66: Mechanismus der Deuterierung von Dihydroneopterintriphosphat an C-1'.

Je nachdem, an welcher Position die Reaktion der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase beginnt, sollte sich [1'-D] bzw. [2'-D]Dihydroneopterintriphosphat in der Reaktionsmischung anreichern. Durch Verwendung von [1'-¹³C]Dihydroneopterintriphosphat sollte sich das deuterierte Edukt NMR-spektroskopisch durch einen Isotopenshift detektieren lassen.

Um beide Fälle zu unterscheiden, wurde die Reaktion mit [1'-¹³C]Dihydroneopterintriphosphat in D₂O durchgeführt. Das benötigte [1'-¹³C]Dihydroneopterintriphosphat wurde enzymatisch aus [4'-¹³C]Glucose hergestellt.

3.3.1.2.1 Enzymatische Synthese von $[3'-^{13}\text{C}]$ Guanosintriphosphat

Die enzymatische Synthese von spezifisch markiertem $[3-^{13}\text{C}]$ Ribulose-5-phosphat geht aus von kommerziell erhältlicher $[4-^{13}\text{C}]$ Glucose. $[4-^{13}\text{C}]$ Glucose wird durch Hexokinase in 6-Position zu $[4-^{13}\text{C}]$ Glucose-6-phosphat phosphoryliert. $[4-^{13}\text{C}]$ Glucose-6-phosphat wird anschließend durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu $[4-^{13}\text{C}]$ Phosphogluconat umgesetzt. Durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wird $[4-^{13}\text{C}]$ Phosphogluconat zu $[3-^{13}\text{C}]$ Ribulose-5-Phosphat umgesetzt. Die Regeneration von NADP^+ erfolgte durch die Reaktion der Glutamat-Dehydrogenase. Durch die Pyruvat-Kinase-Reaktion wurde ATP aus Phosphoenolpyruvat ergänzt. Das durch diese Reaktionsfolge erhaltene $[3-^{13}\text{C}]$ Ribulose-5-Phosphat wurde ohne weitere Reinigung zur GTP-Synthese eingesetzt.

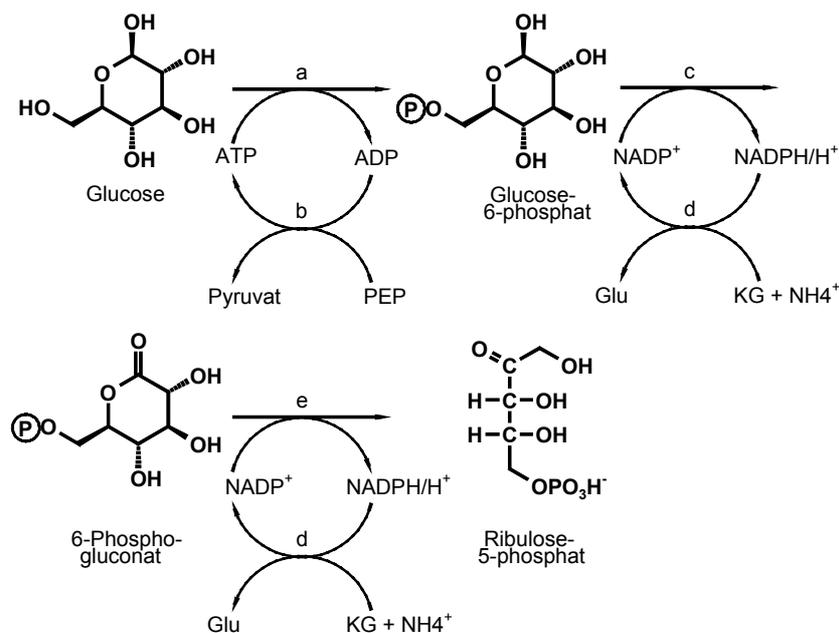


Abb. 67: Reaktionsschema der enzymatischen Synthese von Ribulose-5-phosphat aus Glucose: (a) Hexokinase, (b) Pyruvatkinase, (c) Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, (d) Glutamat-dehydrogenase, (e) 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase.

Die enzymatische Synthese von spezifisch markiertem GTP erfolgt ausgehend von spezifisch markiertem Ribulose-5-phosphat unter Verwendung von Enzymen des sogenannten „Salvage-Pathway“. $[3-^{13}\text{C}]$ Ribulose-5-phosphat wird durch die Pentosephosphat-Isomerase zu $[3-^{13}\text{C}]$ Ribose-5-phosphat isomerisiert. Anschließend erfolgt die Aktivierung von $[3-^{13}\text{C}]$ Ribose-5-phosphat zu $[3-^{13}\text{C}]$ Phosphoribosyl-pyrophosphat durch die Phosphoribosyl-

pyrophosphat-Synthetase. Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase katalysiert die Addition von Guanin an [3-¹³C]Phosphoribosyl-pyrophosphat. Zum Schluß wird mit der Guanylat-Kinase und der Pyruvat-Kinase die Phosphatseitenkette von GMP zum 5'-Triphosphat phosphoryliert.

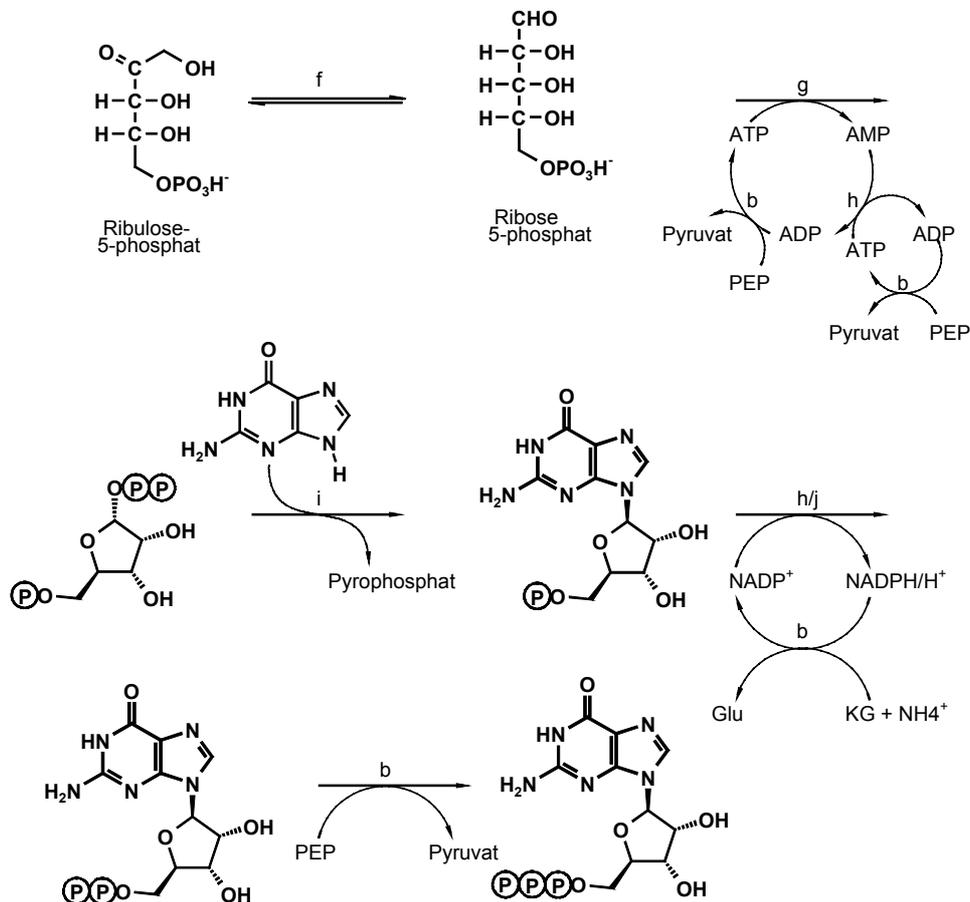


Abb. 68: Reaktionsschema der enzymatischen Synthese von GTP aus Ribulose-5-phosphat: (b) Pyruvat-Kinase, (f) Phosphoriboisomerase, (g) Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase, (h) Nucleosid-Monophosphat-Kinase, (i) Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, (j) Guanylat-Kinase.

Aufgrund der bei neutralem pH geringen Löslichkeit von Guanin wurden Guanin und Ribulose-5-phosphat während der Reaktion laufend ergänzt. Die Isolierung von [3-¹³C]Guanosintriphosphat erfolgte durch Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose bei pH 3,5 mit einem LiCl-Gradienten (Abb. 69).

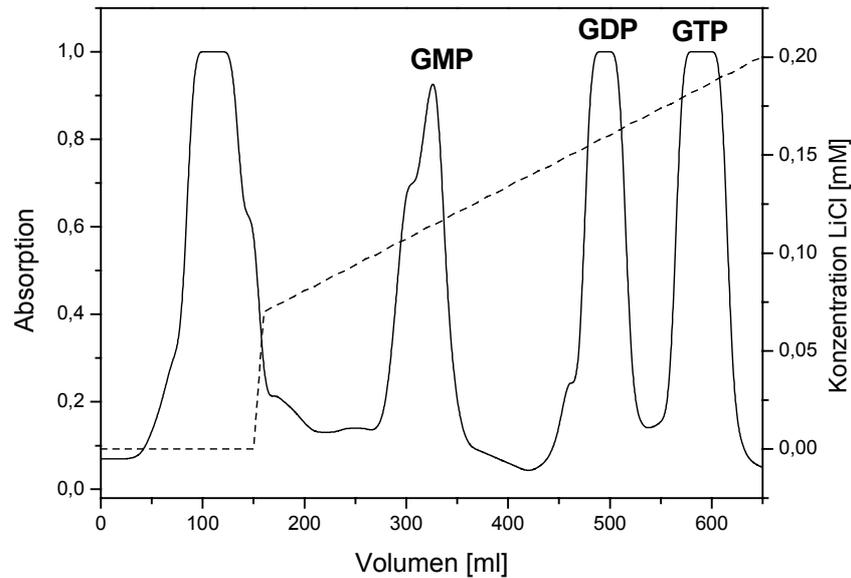


Abb. 69: Chromatographische Reinigung von $[3'\text{-}^{13}\text{C}]$ Guanosintriphosphat.

3.3.1.2.2 Umsetzung von $[1'\text{-}^{13}\text{C}]$ Dihydroneopterintriphosphat mit PTPS

Die Synthese von spezifisch markiertem Dihydroneopterintriphosphat erfolgte ausgehend von $[3'\text{-}^{13}\text{C}]$ Guanosintriphosphat mit Hilfe der GTP Cyclohydrolase I. Die Reaktion wurde unter anaeroben Bedingungen in D_2O im NMR-Röhrchen bei 37°C durchgeführt. Die Konzentration an GTP betrug 10 mM.

Nach ca. 2 h Reaktionszeit wurden 20 μg MBP-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase anaerob zur Reaktionsmischung gegeben. Die Reaktion wurde mittels ^{13}C -NMR verfolgt. Nach ca. 20 min wurde die Reaktion bei ca. 90 % Umsatz durch Zugabe von HCl gestoppt. Abb. 70 zeigt die resultierenden ^{13}C -NMR-Spektren.

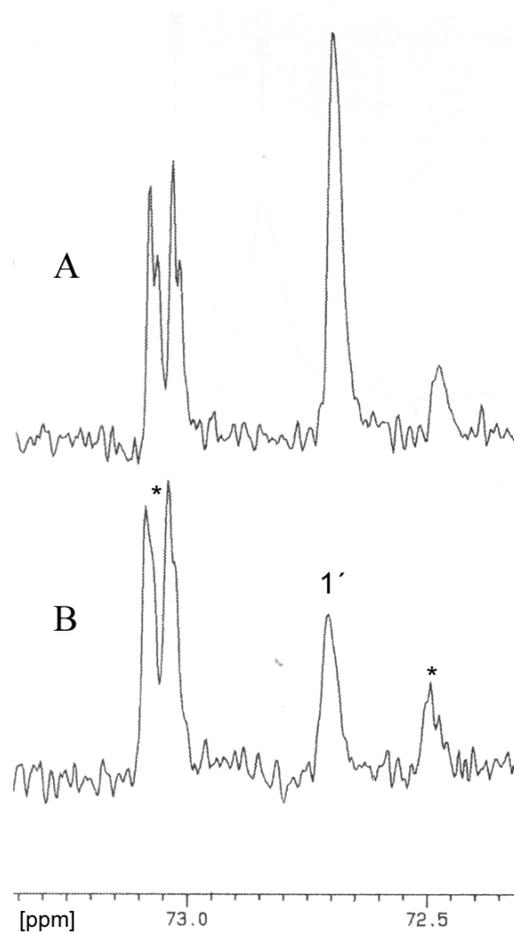


Abb. 70: ^{13}C -NMR Spektren der Umsetzung von $[1'\text{-}^{13}\text{C}]$ Dihydroneopterintriphosphat mit PTPS bei 37°C . A: NMR-Spektrum vor Zugabe von PTPS. B: NMR-Spektrum 10 min nach Zugabe von PTPS. Das Signal bei 72,7 ppm chemischer Verschiebung stellt das Signal des 1'-Kohlenstoffs von Dihydroneopterintriphosphat dar. *: nicht identifizierte Verunreinigungen.

Im Verlauf der Messung nahm die Intensität des Signals bei 72,7 ppm deutlich ab. Die Signale bei 72,45 ppm und 73,05 ppm stellen Verunreinigungen dar und bleiben während der Reaktion konstant. Der zu erwartende α -Shift durch Einbau eines Deuteriums in 1'-Position des Eduktes tritt nicht auf. Ebenso wenig tritt ein entsprechender β -Shift durch Einbau eines Deuteriums in 2'-Position des Eduktes auf.

3.3.2 Die Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Huhn

Im Rahmen einer Kooperation wurde die Entwicklung verschiedener Neurotransmittersysteme der Retina untersucht [100]. Als Organismus wurde das Huhn (*Gallus gallus*) gewählt. Dazu war die Klonierung und Expression der PTPS aus Huhn notwendig. Die DNA-Sequenz der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Huhn war nicht bekannt.

3.3.2.1 Klonierung der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase

Die Aminosäuresequenzen der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthasen aus Mensch, Maus, Ratte und Lachs sind bekannt. Durch Vergleich der Proteinsequenzen konnten konservierte Bereiche gefunden werden (Anhang B). Über die entsprechenden konservierten Bereiche der DNA-Sequenz wurden Oligonukleotide gelegt und zur Amplifikation mittels PCR benutzt (Abb. 71). Als Matritze diente cDNA (Huhn, Leber). Die erste PCR erfolgte mit den Primern „PPH4-Wobbel 1“ und „PPH4-Wobbel 3“ (Anhang C). In einer zweiten PCR wurden die Primer „PPH4-Wobbel 1“ und „PPH4-Wobbel 2“ eingesetzt (Anhang C). Als Matritze diente der erste PCR-Ansatz. Auf diese Weise wurde ein Teil der Hühner-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase von ca. 150 bp Länge erhalten. Dieses DNA-Fragment wurde direkt aus dem PCR-Ansatz in einen T-Tail-Vektor ligiert und nach Plasmidisolierung sequenziert. Ausgehend von der nun bekannten DNA-Sequenz wurden spezifische Oligonukleotide synthetisiert.

Um den 3'-Teil der DNA-Sequenz zu erhalten, wurde die RACE-Technik (Rapid Amplification of cDNA Ends) angewandt. Eukaryotische DNA-Sequenzen enthalten am 3'-Ende eine Poly-A Sequenz. Zur Gewinnung des 3'-Teils der Sequenz wurde zuerst mit den beiden Oligonukleotiden „Huhn-Pyruvoyltetrahydropterin-1“ und „3'RACE-T20“ (Anhang C) eine PCR durchgeführt. Als Matritze dienten cDNA (Huhn, Leber). In einer zweiten PCR wurde mit den beiden Oligonukleotiden „Huhn-Pyruvoyltetrahydropterin-2“ und „3'-Anchor“ das Amplifikat der ersten PCR verstärkt. Das so erhaltene DNA-Stück wurde ohne weitere Reinigung direkt in einen T-Tail Vektor ligiert und nach Plasmidisolierung sequenziert.

Um den 5'-Teil der DNA-Sequenz zu erhalten, wurde mittels terminaler dCTP Transferase ein poly-dC Ende an den 5'-Teil der cDNA angehängt. Mittels des spezifischen Ankerprimers „5'RACE-Anchor“ und des spezifischen Gen-Primers „Huhn-Pyruvoyltetrahydropterin-3“ wurde das 5'-Ende der Hühner-Pyruvoyltetrahydropterin-

Synthese amplifiziert. Zur Verstärkung des Amplifikates war eine zweite PCR mit den beiden eingerückten Primern „UAP“ und „Huhn-Pyruvoyltetrahydropterin-4“ notwendig. Das DNA-Stück wurde direkt aus dem PCR-Ansatz ohne weitere Reinigung in einen T-Tail Vektor ligiert und nach Plasmidisolierung sequenziert.

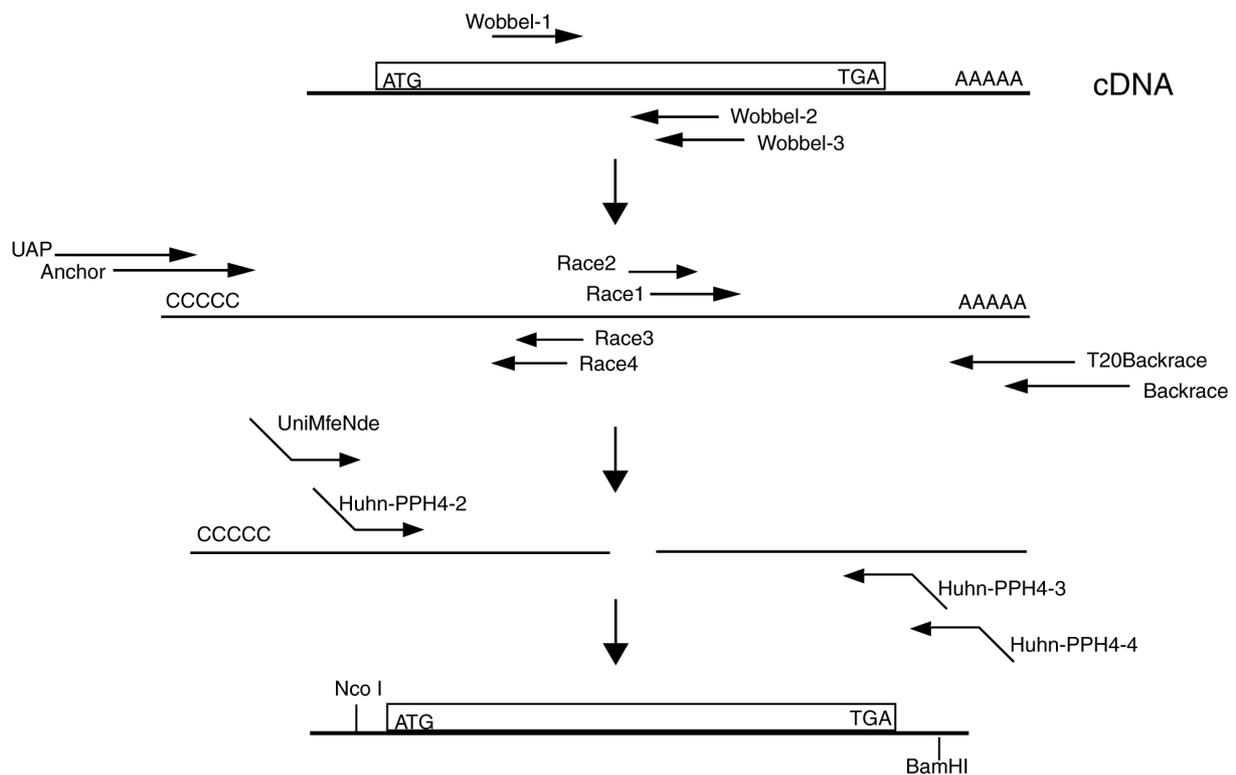


Abb. 71: Klonierungsstrategie der PTPS aus Huhn.

Nachdem nun die gesamte DNA-Sequenz der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Huhn bekannt war (Anhang A), wurden die beiden Oligonukleotide „Uni-Huhn-Pyruvoyltetrahydropterin-2“ und „Huhn-Pyruvoyltetrahydropterin-3-Bam“ synthetisiert, mit deren Hilfe der gesamte kodierende Bereich des Enzyms amplifiziert werden konnte. Die beiden Oligonukleotide lieferten die zur Klonierung des Amplifikates notwendigen Restriktionsschnittstellen *Nco* I und *Bam* HI. Das erhaltene Amplifikat wurde mit den beiden Restriktionsenzymen *Nco* I und *Bam* HI verdaut und das Fragment in den Vektor pMal c2 ligiert.

3.3.2.2 Expression und Reinigung der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase

Die Expression der rekombinanten Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase aus Huhn erfolgte als Fusionsprotein mit dem maltosebindenden Protein (MBP, *E. coli*) in *E. coli* XL1-blue bei 37 °C. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte nach Aufschluß der *E. coli* Zellen aus dem Rohextrakt durch Affinitätschromatographie an einer Amylose-Harz-Säule. Die Abspaltung des Maltosebindeproteins erfolgte durch Faktor Xa. Die Abtrennung des Maltosebindeproteins erfolgte durch Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose FF.

3.3.2.3 Hybridisierungsexperimente an Hühner-Retina

Zur Herstellung von Proben für die *in situ* Hybridisierung wurde mit Hilfe der PCR unter Verwendung der beiden Primer „Huhn-PPH4-KpnI“ und „Huhn-PPH4-SacI“ (Anhang C) ein 102 bp langer Teil der Hühner PPH4-Synthase amplifiziert und in den Vektor pBS SK-ligiert. Mit dem so erhaltenen Vektor konnten im Labor von Y. Ben Shaul (Tel Aviv, Israel) ³⁵S- bzw. Digoxigenin markierte Proben für die *in situ* Hybridisierung gewonnen werden.

Durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigter Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase konnten im Labor von Y. Ben Shaul (Tel Aviv, Israel) ein polyklonales Antikörperserum gegen die PTPS aus Huhn gewonnen werden. Mit diesem Antikörperserum wurden im Labor von Y. Ben Shaul Hybridisierungsexperimente an Retina von Hühnern in verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt.

Abb. 72 zeigt die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung mit ³⁵S-markierten Proben an Hühner-Retina am Tag 7, 11 und 18 [100]. Am Tag 7 erfolgt die Expression der mRNA der PTPS in der gesamten Retina, wobei die Expression an den Randschichten etwas stärker zu sein scheint. Am Tag 11 der Entwicklung scheint die Expression der PTPS mRNA in den Schichten des IPL (inner plexiform layer) und GCL (ganglion cell layer) etwas stärker zu sein als in den Schichten des ONL (outer nuclear layer) und OPL (outer plexiform layer). Am Tag 18 der Entwicklung findet eine starke Expression der PTPS mRNA in den Schichten der OPL und der PHR (photoreceptors) statt.

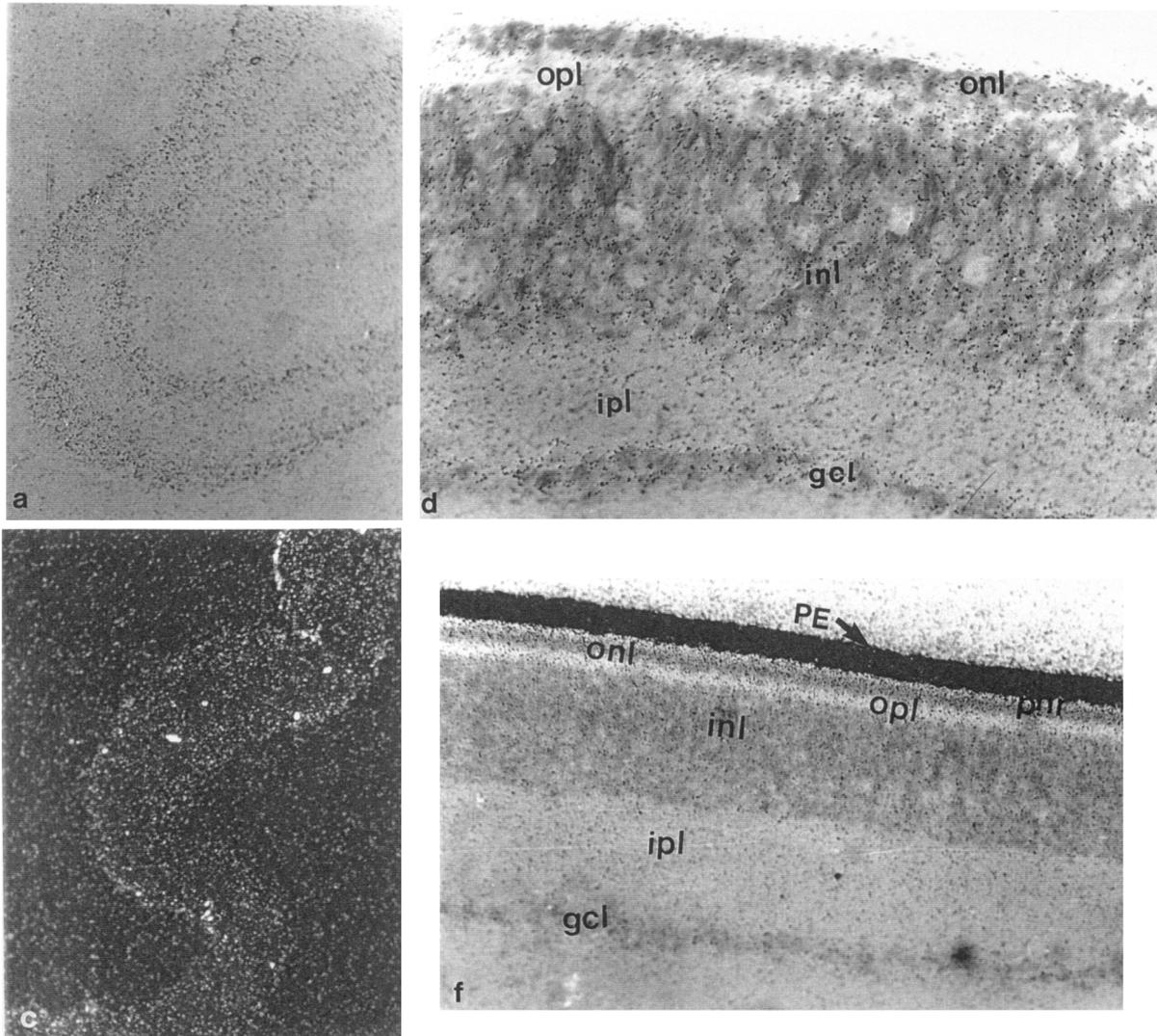


Abb. 72: *In situ* Hybridisierung embryonaler Hühner-Retina mit ^{35}S -markierten PTPS RNA Proben [100]. a: Hybridisierung mit Antisense RNA, Tag 7, x110. c: Kontrolle mit Sense RNA, x110. d: Tag 11, x450. f: Tag 18, x170. gcl: ganglion cell layer, ipl: inner olexiform layer, inl: inner nuclear layer, opl, outer nuclear layer, phr: photoreceptors, PE: pigmented epithel.

4. Diskussion

4.1 Die GTP Cyclohydrolase I

Die GTP Cyclohydrolase I ist ein homodekames Enzym mit zehn aktiven Zentren. Die aktiven Zentren werden aus jeweils drei verschiedenen Untereinheiten gebildet. Untersuchungen von Yim *et al.* deuteten darauf hin, dass die GTP Cyclohydrolase I teilweise als Dimer vorliegt [98]. Bestimmungen der spezifischen Aktivität von Mischungen aus Wildtyp GTP Cyclohydrolase I und der inaktiven Mutante H112S/S135H/R65K der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* zeigten, dass keine Verringerung der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym auftrat. Dies lässt vermuten, dass keine Dissoziation und Reassoziierung der gebildeten Dekamere auftritt.

Kürzlich wurde durch Untersuchung der humanen GTP Cyclohydrolase I mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) Zink im aktiven Zentrum des Enzyms gefunden [62]. Durch Röntgenstrukturanalyse wurden die an der Zinkbindung im humanen Enzym beteiligten Aminosäuren C141, C212 und H143 identifiziert. Zinkbestimmungen zeigten, dass auch das Enzym aus *E. coli* Zink besitzt. In der Raumstruktur des Enzyms aus *E. coli* wird Zink von den Aminosäuren C110, C181 und H113 sowie einem Wassermolekül koordiniert [62]. Zinkbestimmungen verschiedener völlig inaktiver GTP Cyclohydrolase I Mutanten zeigten, dass außer C110S, C181S und H113S auch die Mutante H112S kein Zink mehr enthielt.

Die Aminosäure H112 scheint an der Zinkbindung beteiligt zu sein. Denkbar ist eine Zink-Koordination, wie sie sich auch in der Adenosin-Deaminase (ADA) wiederfindet, in der Zink durch drei Histidine und einen Aspartat-Rest koordiniert ist [101, 102]. Die Kristallstruktur der Adenosin-Deaminase mit 1-Deazaadenosin, einem Inhibitor der ADA, zeigt Wasser als fünften Liganden [103]. Zink könnte in der GTP Cyclohydrolase I von den Aminosäuren C110, C181, H112 und H113 koordiniert sein (Abb. 73). Wasser stellt den fünften Liganden dar. Die kristallographischen Daten der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* zeigen jedoch, dass der Abstand zwischen H112 und Zink für eine direkte Koordination vermutlich zu groß ist.

Wahrscheinlicher ist die Koordination des Zinks durch die drei Aminosäuren C110, C181 und H113. H112 bindet über eine Wasserstoffbrücke Wasser, welches wiederum Zink koordiniert (Abb. 73). Nach Drehen der Imidazolseitenkette von H112 um 180° findet sich für den Abstand N-O einen Wert von 2,57 Å. Ähnliche Verhältnisse finden sich bei Cytidin-

Deaminase (His, Cys, Cys, Wasser) [104], den β -Lactamasen (His, His, His, Wasser) [105] sowie der Carboxypeptidase A (His, His, Glu, Wasser) [106] (für Rev. siehe [107-109]).

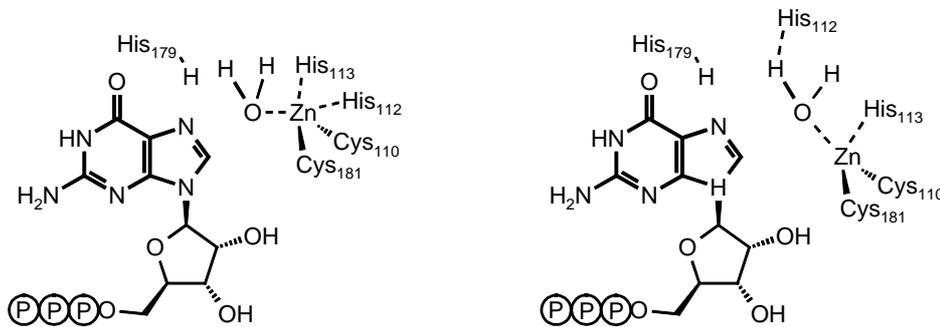


Abb. 73: Mögliche Zink-Koordinationen der GTP Cyclohydrolase I.

Um die Rolle des Zink in der GTP Cyclohydrolase I Reaktion zu untersuchen, wurden die inaktiven Mutantenproteine C110S, C181S, H112S und H113S mit GTP bzw. hGTP umgesetzt. Alle vier Mutantenproteine setzen weder GTP noch hGTP in detektierbarer Menge zu Dihydroneopterintriphosphat um. Dies zeigt, dass Zink sowohl für die Öffnung des Imidazolrings unter Spaltung der Bindung zwischen C-8 und N-9 als auch zur anschließenden Formiatabsplattung notwendig ist.

Die Reaktion der GTP Cyclohydrolase I wurde sowohl mit Quenched-Flow als auch mit Stopped-Flow Methoden untersucht. Es zeigte sich, dass GTP sehr viel schneller verbraucht wird als das Produkt Dihydroneopterintriphosphat gebildet wird. Die Abspaltung von Formiat aus GTP ist nach etwa 15 s abgeschlossen. Quenched-Flow und Stopped-Flow Untersuchungen zeigten, dass sich unter single turnover Bedingungen ein Zwischenprodukt anreichert, das seine maximale Konzentration nach ca. 12 bis 18 s (pH 8,5, 30 °C) erreicht. Da die Formiatabsplattung nach 15 s Reaktionszeit abgeschlossen ist, muß es sich bei dem Intermediat um eine Verbindung im späten Teil der Reaktionstrajektorie handeln. Das UV-Spektrum dieses Intermediates aus der Optimierungsrechnung, das sich aus Stopped-Flow Experimenten ergab, weist eine große Ähnlichkeit zum UV-Spektrum des GTP Cyclohydrolase II Produktes auf. Die Vermutung lag also nahe, dass es sich bei dem Hauptintermediat der GTP Cyclohydrolase I Reaktion um 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinontriphosphat handelt. Da das Produkt der Amadori-Umlagerung das gleiche Chromophor wie 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinontriphosphat besitzt, lässt sich allein durch das UV-Spektrum des Intermediates nicht entscheiden, um welche Spezies es sich handelt. Das Amadori-Produkt der Reaktion sollte sich im ^{13}C -NMR-Spektrum durch eine Methylen-Gruppe sowie eine Carbonylgruppe von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-

pyrimidinotriphosphat unterscheiden. Im NMR-Spektrum trat kein Signal einer Carbonylgruppe bzw. Methylengruppe auf. Die ^{13}C -Signale waren unter den sauren Bedingungen des Reaktionsabbruchs einer Ribose zuzuordnen. Das Hauptintermediat muß daher eine Verbindung darstellen, die unter sauren Bedingungen Ribose abspaltet. Dafür kommt vor allem Intermediat **28** in Frage. Aufgrund des Gleichgewichtscharakters der Reaktion könnten aber auch die Intermediate **29** bzw. **30** Ribose abspalten. Stopped-Flow Experimente lassen vermuten, dass Intermediat **28** ein sehr frühes Intermediat darstellt und nach etwa 15 s fast vollständig verbraucht ist. Aufgrund der geladenen Struktur des Intermediates **29** erscheint diese Verbindung als Hauptintermediat nicht stabil genug. Das Hauptintermediat könnte das Enol **30** darstellen.

Ein analoges Verhalten zeigt die Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerase (PRI) (Abb. 74). Dieses Enzym setzt N-(5'-phosphoribosyl)anthranilat (**46**) über das Enol **47** zum Ketoamin **48** um. Untersuchungen der PRI mittels Fluoreszenz-Quench von Hommel *et al.* zeigten, dass die Enolisierung von **47** der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist [110].

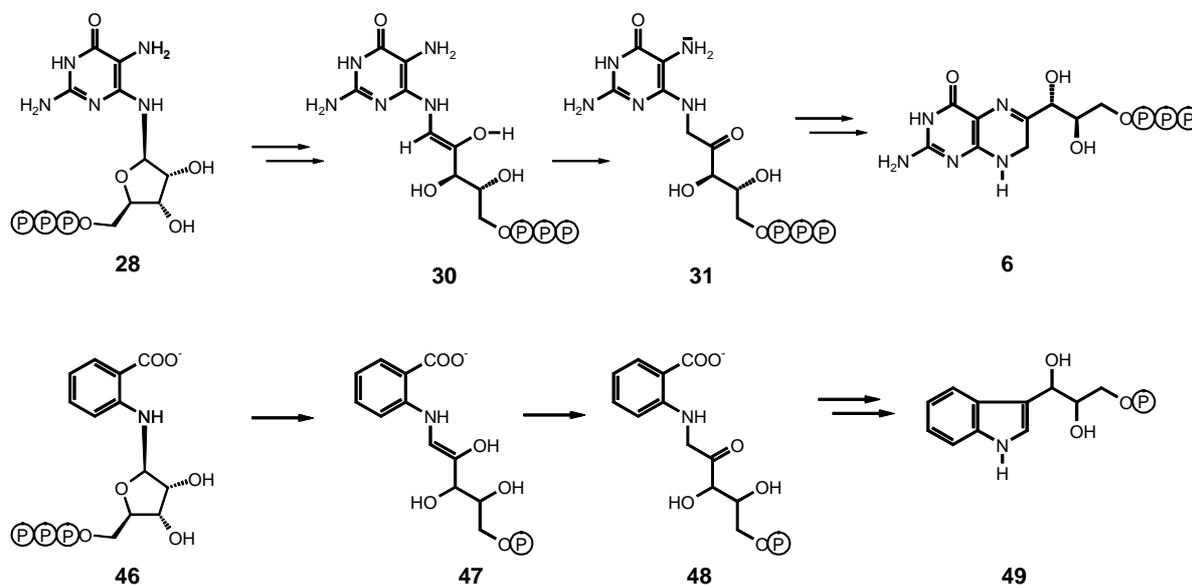


Abb. 74: Vergleich der Reaktionsmechanismen von GTP Cyclohydrolase I (oben) und Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerase (PRI) (unten). Die PRI katalysiert die Reaktion von N-(5'-phosphoribosyl)anthranilat (**46**) über das Enol **47** zu 1-[(2-carboxyphenyl)amino]-1-deoxyribulose-5-phosphat (**48**).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Stopped- und Quenched-Flow Experimente und den Untersuchungen der Zink-Mutanten lässt sich für die GTP Cyclohydrolase I der in Abb. 75 gezeigte Reaktionsmechanismus aufstellen. Die Reaktion

beginnt mit der reversiblen Hydratisierung von C-8 durch Wasser. Dieses Wasser ist durch Zink aktiviert und über eine Wasserstoffbrücke an H112 gebunden. Die Protonierung von N-7 erfolgt vermutlich nicht über H179, da die entsprechende H179 Mutation das Enzyms diesen Reaktionsschritt noch katalysieren kann. Die Protonierung an N-7 erfolgt vermutlich durch Wasser. Da die Stopped-Flow Daten keinen Anhaltspunkt für die Bildung einer Schiff'schen Base als Zwischenstufe ergaben, läuft die Ringöffnung unter Spaltung der Bindung zwischen C-8 und N-9 vermutlich ohne Bildung des Intermediates **26** (Abb. 5) ab. Möglicherweise kommt H112 auch eine Doppelrolle zu. Zum einen die Koordination von Wasser und Zink, zum anderen die Protonierung des Furanose-Sauerstoffes für die Ringöffnung des Imidazolrings. Die resultierende Schiff'sche Base müsste dann sehr niedrig populiert sein.

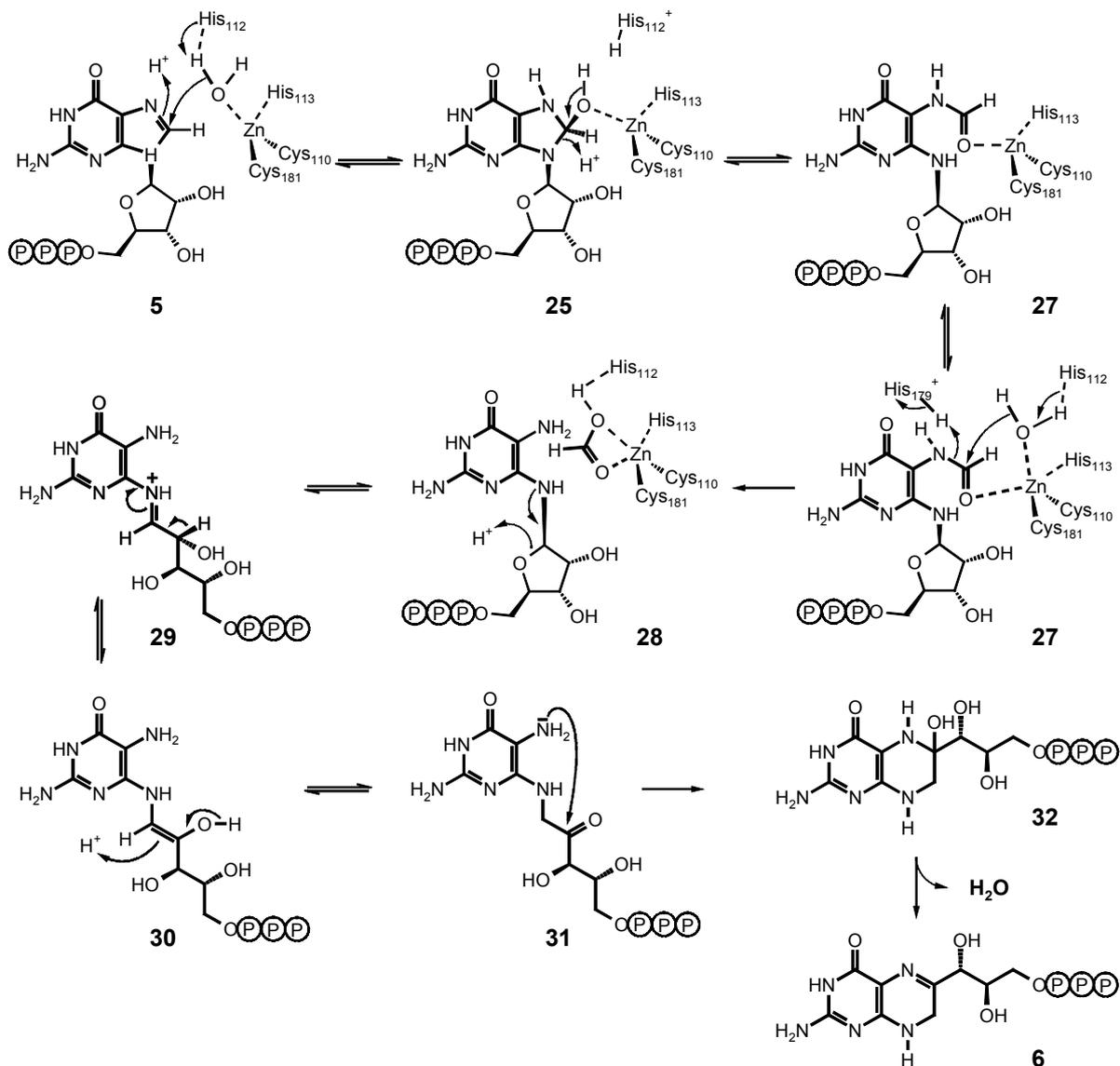


Abb. 75: Vorschlag für einen Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase I.

Die Hydrolyse von Formiat aus **27** ist ebenfalls zinkabhängig. In Analogie zum Mechanismus der Carboxypeptidase A (Abb. 76) sollte die Reaktion mit dem nukleophilen Angriff eines aktivierten Wassers an die Carbonylgruppe des Formamids beginnen. Die Protonierung von N-7 unter Spaltung der Bindung zwischen N-7 und C-8 sollte durch protoniertes H179 erfolgen.

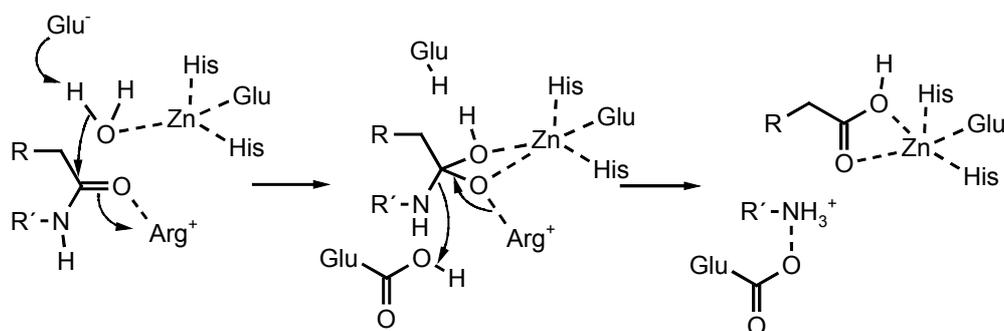


Abb. 76: Reaktionsmechanismus der Carboxypeptidase A [108].

Die nachfolgende Amadori-Umlagerung wird durch Protonierung an O-4' eingeleitet. Die Frage, ob H112 den Furanose-Sauerstoff protoniert, könnte sich möglicherweise durch die Verwendung von Intermediat **28** als Substrat der H112 Mutante klären lassen. Die Amadori-Umlagerung ist vermutlich nicht Zink-abhängig. Wenn die Protonierung des Furanose-Sauerstoffes durch H112 erfolgt, sollte die H112 Mutante Intermediat **28** nicht zu Dihydroneopterintriphosphat umsetzen können. Das Intermediat **28** ist derzeit jedoch nicht verfügbar.

Durch Protonenabstraktion an C-2' geht dieses Iminiumion in ein Enol über. Wie oben bereits gezeigt, handelt es sich bei diesem Enol vermutlich um das Hauptintermediat der GTP Cyclohydrolase I Reaktion, d.h. eine der nun folgenden Reaktionen stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GTP Cyclohydrolase I Reaktion dar.

Die Enolisierung des Intermediates **30** führt zum Produkt der Amadori-Umlagerung. Durch intramolekulare Schiff'sche Base Kondensation entsteht daraus 8-Hydroxytetrahydro-neopterintriphosphat (**32**). Es ist fraglich, ob die für die Kondensationsreaktion erforderliche Umlagerung der Seitenkette im aktiven Zentrum des Enzyms stattfinden kann. NMR-Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Bildung der Methylengruppe an C-1' durch stereospezifische Protonierung von Intermediat **30** erfolgt [64]. Die Enolisierung sollte daher enzymkatalysiert ablaufen. Es scheint wahrscheinlich, dass das Amadori-Produkt **31** das enzymatische Endprodukt der Reaktion darstellt. Die weiteren Reaktionen laufen

vermutlich im Lösungsmittel ab. Einen Hinweis darauf liefert der Vergleich der turnover Raten im steady state bzw. single turnover Experiment. Die Gesamtreaktion der GTP Cyclohydrolase I ist unter steady state Bedingungen etwa um den Faktor zwei schneller als unter single turnover Bedingungen.

Das bei der Reinigung der GTP Cyclohydrolase I gefundene, im aktiven Zentrum gebundene Dihydroneopterintriphosphat nimmt das Enzym vermutlich aufgrund der hohen Affinität zu Triphosphaten wieder aus dem Solvens auf.

4.2 Die GTP Cyclohydrolase II

Die GTP Cyclohydrolase II ist ein homodimeres Enzym mit zwei aktiven Zentren, welche Zink enthalten. Das Zink wird von drei Cysteinen einer Zinkfinger-artigen Domäne gebunden [58]. Die von der GTP Cyclohydrolase II katalysierte Reaktion stellt eine Teilreaktion der GTP Cyclohydrolase I Reaktion dar.

Untersuchungen der GTP Cyclohydrolase II mittels Quenched-Flow Technik zeigten, dass GTP ohne detektierbares Zwischenprodukt zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat (**17**) umgesetzt wird. Als Nebenprodukt der Reaktion entsteht zu etwa 10 % GMP.

Stopped-Flow Experimente mit GTP als Substrat zeigten, dass das eingesetzte Substrat in einer schnellen Reaktion in eine Spezies übergeht, deren UV-Spektrum dem UV-Spektrum von GTP sehr ähnlich ist. Aufgrund der Bildung von GMP als Produkt der GTP Cyclohydrolase II Reaktion ist die kovalente Bindung von GTP an das Enzym unter Pyrophosphatabspaltung postuliert worden [67]. Im Falle einer schnellen kovalenten Bindung von GTP an das Enzym könnte unter den sauren Quenched-Flow Bedingungen Hydrolyse des gebundenen Substrates stattfinden. Bei der nachfolgenden Analyse sollte sich enzymgebundenes Substrat als GMP zeigen. Eine unter den sauren Bedingungen des Quench stabile Bindung zwischen Enzym und Substrat sollte sich durch eine schnelle GTP-Abnahme (gebundenes Substrat wird mit dem Protein gefällt) ohne entsprechende Produkt- oder GMP Bildung zeigen. Die GTP Konzentration nimmt jedoch in dem Maße ab, wie Produkt gebildet wird. Die GMP-Bildung ist annähernd linear. Der in den Stopped-Flow Experimenten beobachtete frühe optische Transient kann daher kein kovalent gebundenes Substrat darstellen. Da bekannt ist, dass die GTP Cyclohydrolase II kooperative Eigenschaften besitzt, könnte es sich bei diesem Transienten um proteingebundenes Substrat handeln.

Aufgrund der Ähnlichkeit der von den beiden GTP Cyclohydrolasen I und II katalysierten Reaktionen sollte als Intermediat der Reaktion ein Analoges zu 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat (**27**) auftreten. Weder Quenched-Flow noch Stopped-Flow Experimente zeigten ein solches oder ähnliches Intermediat.

Mit Intermediat **27** als Substrat ist die Reaktion der GTP Cyclohydrolase II nur etwa halb so schnell wie mit GTP als Substrat. Stopped-Flow Experimente zeigten auch mit Intermediat **27** das Auftreten eines frühen optischen Transienten, dessen UV-Spektrum dem von Intermediat **27** sehr ähnlich sieht. Daß das Intermediat **27** der GTP Cyclohydrolase I Reaktion als Substrat der GTP Cyclohydrolase II dienen kann, die Reaktion jedoch deutlich langsamer ist als mit GTP, lässt den Schluß zu, dass es sich bei 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat (**27**) nicht um ein natürliches Intermediat der GTP Cyclohydrolase II Reaktion handelt. Da angenommen werden kann, dass die Reaktion der Ringöffnung von GTP unter Formiatabspaltung von beiden GTP Cyclohydrolasen I und II in gleicher Art und Weise katalysiert wird, stellt vermutlich das enzymgebundene Monophosphatanaloge zu Intermediat **27** das entsprechende Zwischenprodukt der GTP Cyclohydrolase II Reaktion dar.

Da während der GTP Cyclohydrolase II Reaktion kein detektierbares Zwischenprodukt auftritt, muß die Pyrophosphatabspaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion sein. Dies bedeutet, dass die Ringöffnung von GTP und die nachfolgende Formiathydrolyse so schnell sind, dass keine entsprechenden Zwischenprodukte detektiert werden können.

Aufgrund der Ähnlichkeit der von beiden GTP Cyclohydrolasen I und II katalysierten Reaktionen und den Ergebnissen der Stopped- und Quenched-Flow Experimente lässt sich der in Abb. 77 gezeigte Reaktionsmechanismus für die GTP Cyclohydrolase II postulieren. Die Reaktion beginnt mit der Bindung von GTP (**5**) an das Enzym. Dabei wird Pyrophosphat abgespalten. Diese Reaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. In einer Nebenreaktion kann das gebundene Substrat (**33**) vom Enzym unter Bildung von GMP (**35**) hydrolysiert werden. Die Hydrolyse des Imidazolringes von GTP unter Formiatabspaltung sollte mechanistisch analog zur GTP Cyclohydrolase I ablaufen. Zink, welches von drei Cystein-Resten gebunden ist, aktiviert Wasser (**33**). Das aktivierte Wasser greift nukleophil C-8 von GTP an. Die daran beteiligte Base B ist nicht bekannt. Das entstandene Formamid Intermediat **51** wird nochmals nukleophil von einem Zink-koordinierten Wasser angegriffen

und Formiat abgespalten. Durch abschließende Hydrolyse erfolgt die Freisetzung des Produktes **17** aus dem Enzym.

Das Reaktionsschema macht deutlich, dass das Intermediat **27** der GTP Cyclohydrolase I Reaktion zwar ein Substrat der GTP Cyclohydrolase II darstellt, aufgrund der Triphosphatgruppe jedoch kein natürliches Intermediat der GTP Cyclohydrolase II Reaktion darstellt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist auch hier die Bindung von **27** an das Enzym unter Pyrophosphatabspaltung.

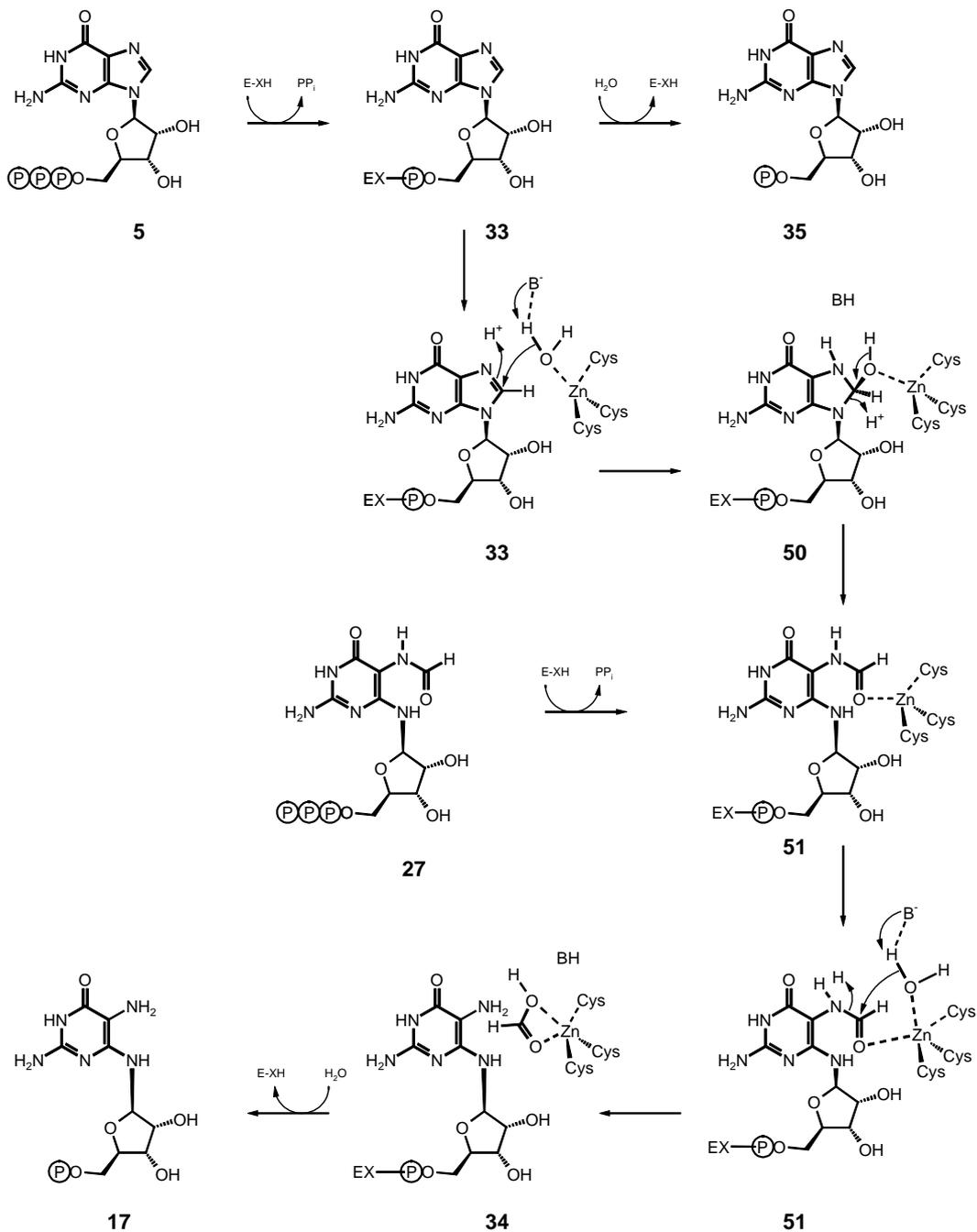


Abb. 77: Vorschlag für einen Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase II.

4.3 Die Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase

Hybridisierungsexperimente

Mit Hilfe von „Wobble“-Primern konnte aus cDNA von Huhn ein Teil der PTPS amplifiziert werden. Durch 5'- und 3'-RACE gelang es schließlich, die gesamte PTPS cDNA aus Huhn zu sequenzieren. Durch Klonierung der PTPS-cDNA in den Vektor pMAL-c2 konnte die native PTPS aus Huhn isoliert und gereinigt werden.

Der codierende Bereich der PTPS aus Huhn umfasst 444 Basen. Die DNA-Sequenz zeigt 77 % Homologie zur humanen Sequenz. Das Gen der PTPS codiert für ein Protein mit 148 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz zeigt 81 % Homologie zum humanen Protein. Die berechnete monomere Masse der PTPS aus Huhn beträgt 16749 Da.

Die weiteren Experimente zur *in situ* Hybridisierung mit Antisense RNA bzw. Anti-Huhn-PTPS-Antikörpern wurden von Y. Ben Shaul (Tel Aviv, Israel) durchgeführt.

Reaktionsmechanismus der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase

Die Reaktion der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase besteht aus zwei Schritten. Nach Abstraktion eines Protons von C-1' erfolgt die formale Oxidation zum Keton an C-1' unter gleichzeitiger Reduktion der CN-Doppelbindung im Pterin-Ringsystem. Im zweiten Schritt der Reaktion erfolgt Abstraktion eines Protons von C-2' und Oxidation zum Carbonyl unter Abspaltung der Triphosphat-Gruppe. Die Abstraktion des zweiten Protons sollte durch die benachbarte Carbonylgruppe an C-1' und die Triphosphatgruppe an C-3' stark erleichtert sein. Auch im Falle der umgekehrten Reaktionsfolge, d.h. zuerst Oxidation an C-2' unter Triphosphatabspaltung, ist die Abstraktion des Protons an C-1' im zweiten Reaktionsschritt durch die benachbarte Carbonylgruppe an C-2' und die CN-Doppelbindung im Ringsystem stark erleichtert. Die Reaktion der Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase sollte sich also in einen relativ langsamen ersten Reaktionsschritt (Bildung der ersten Carbonylgruppe) und einen nachfolgend sehr schnellen zweiten Reaktionsschritt (Bildung der zweiten Carbonylgruppe) aufteilen.

Untersuchungen der PTPS mit Hilfe der Stopped-Flow Technik unter stöchiometrischen Reaktionsbedingungen zeigten das Auftreten eines Intermediates mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 306 nm nach ca. 11 s. In einer langsamen Reaktion entsteht daraus eine Verbindung mit einem langwelligen Absorptionsmaximum bei ca. 350 nm.

Vergleiche mit dem UV-Spektrum von Pyruvoyltetrahydropterin legten die Vermutung nahe, dass es sich bei dem ersten, mit der Stopped-Flow Technik beobachtbaren Prozeß um die Bildung des enzymatischen Produktes handelt. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei dem zweiten, langsameren Prozess um eine Zerfallsreaktion des labilen Pyruvoyltetrahydropterin handelt (oxidativen/photochemischen Zerfall). Die Ratenkonstante für den ersten Schritt der Reaktion wurde zu $0,226 \text{ s}^{-1}$ bestimmt, die Ratenkonstante für den zweiten Schritt (evtl. Photoreaktion) wurde zu $0,022 \text{ s}^{-1}$ bestimmt.

Da während der Reaktion der PTPS das konjugierte Dihydropterin-Ringsystem zum Tetrahydropterin reduziert wird, sollten sich die Absorptionsmaxima in Richtung niedrigerer Wellenlänge verschieben (Produktbildung). Aufgrund der Bildung von isolierten konjugierten Systemen im Laufe der Reaktion könnten sich Intermediate der Reaktion durch Extinktionsänderung im Bereich von 240 nm bemerkbar machen. In diesem Bereich ist jedoch die Meßgenauigkeit der verwendeten Geräte zu groß, so dass sich in diesem Bereich keine Aussagen machen lassen.

Eine Aussage über evtl. auftretende Intermediate bzw. deren Reihenfolge im Reaktionszyklus ist mit der Stopped-Flow Technik nicht möglich. Untersuchungen von Le Van *et al.* mit [^3H]-markiertem Dihydroneopterintriphosphat zeigten für den Bruch der C^3H -Bindungen an C-1' und C-2' Isotopeneffekte von 2,6 bzw. 1,5 [72]. Die Reaktion könnte daher sowohl an C-1' als auch an C-2' beginnen. Dies wird von den kristallographischen Daten unterstützt [73]. Die Abstände zwischen dem Zink-Ion und den beiden Hydroxylgruppen sind annähernd gleich groß. Ebenso ist der Abstand zwischen S^γ von Cys42 zu den beiden Protonen an C-1' und C-2' etwa gleich groß. Ghisla *et al.* hingegen kamen durch ^1H -NMR Untersuchungen zu dem Schluß, daß die Reaktion der PTPS durch Abstraktion des Protons von C-2' und nachfolgender Abspaltung der Triphosphatgruppe beginnt [111].

Bisher konnten keine Experimente eindeutig eine Reihenfolge der Bildung beider Carbonylgruppen zeigen. Die Ergebnisse der Stopped-Flow Experimente lassen jedoch den Schluß zu, dass unabhängig von der Reihenfolge der erste Schritt (Bildung der ersten Carbonylgruppe) der Reaktion geschwindigkeitsbestimmend sein muß.

Durch Variation der Reaktionstemperatur konnte für stöchiometrische Umsatzbedingungen die Ratenkonstanten der beiden beobachtbaren Reaktionsschritte für verschiedene Reaktionstemperaturen erhalten werden. Die sich daraus nach Arrhenius ergebenden Aktivierungsenergien für die beiden Schritte betragen 56 kJ mol^{-1} bzw. 40 kJ mol^{-1} .

Durch Untersuchung der Reaktion der PTPS mit Hilfe der NMR-Technik sollte die Reihenfolge der Oxidation der beiden Alkohole festgestellt werden. Durch Umsetzung von [$1'-^{13}\text{C}$]Dihydroneopterintriphosphat mit PTPS in reinem D_2O wurde versucht, in die 1'- bzw. 2'-Position des Edukts eingebautes Deuterium nachzuweisen. Der Einbau eines Deuteriums aus dem Lösungsmittel in das Edukt der Reaktion macht sich durch einen Shift des entsprechenden ^{13}C -Signals bemerkbar machen.

Eine solche Verschiebung des ^{13}C -Signals war nicht zu beobachten. Dafür sind mehrere Gründe denkbar. Bei diesem Experiment wird davon ausgegangen, dass während des Reaktionszyklus der PTPS ein Carbanion entsteht. Dieses Carbanion sollte reaktiv genug sein, um Deuterium aus dem Reaktionswasser einzubauen. Die entstehende Deuterium-Kohlenstoff-Bindung sollte aufgrund des Isotopeneffektes schwerer zu spalten sein als eine entsprechende Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung. Somit sollte sich während der Reaktion deuteriertes Edukt anreichern. Tritt während der Reaktion kein reaktives Carbanion auf, so kann sich auch kein Deuterium anlagern.

Weiterhin wird vorausgesetzt, dass Wasser aus der Umgebung nahe genug an das aktive Zentrum gelangt, um ein evtl. entstehendes Carbanion abzufangen. Es wäre daher auch möglich, dass das Reaktionszentrum für Wasser aus dem Reaktionspuffer nicht zugänglich ist.

Ein weiteres Problem stellt die Empfindlichkeit des NMR-Experimentes dar. Beobachtet werden soll in diesem Fall nicht umgesetztes Edukt. Etwa 90 bis 95 % des eingesetzten Eduktes werden bis zum Stoppen der Reaktion umgesetzt. Die restlichen etwa 5 bis 10 % Edukt könnten teilweise Deuterium angelagert haben. Unterschreitet der Anteil an deuteriertem Edukt jedoch eine gewisse Grenze, so ist das geshiftete ^{13}C -Signal nicht mehr detektierbar. Es zeigte sich, dass mit dem vorgestellten Experiment eine Aussage bezüglich der Reihenfolge der Bildung der Alkohole nicht möglich ist.

5. Zusammenfassung

Die GTP Cyclohydrolasen I und II katalysieren die hydrolytische Spaltung des Imidazolrings von GTP unter Formiatabsplaltung. Die GTP Cyclohydrolase II, das erste Enzym im Flavin-Biosyntheseweg, spaltet zusätzlich Pyrophosphat ab und liefert als Produkt der Reaktion 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat. Die GTP Cyclohydrolase I, das erste Enzym der Biopterin-Biosynthese, katalysiert nach Ringhydrolyse eine Amadoriumlagerung der Ribose und liefert als Produkt Dihydroneopterin-5'-triphosphat. Die Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase (PTPS), das zweite Enzym des Biopterin-Biosynthesewegs, katalysiert die Umsetzung von Dihydroneopterintriphosphat zu Pyruvoyltetrahydropterin. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung des Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase I, der GTP Cyclohydrolase II sowie der PTPS. Dazu wurden Stopped- und Quenched-Flow Techniken angewandt. Weiterhin erfolgten Umsetzungen mit spezifisch markierten Substraten und Untersuchung der Reaktionslösungen mittels NMR. Zusätzlich wurde das Gen der PTPS aus Huhn kloniert und zur Expression gebracht.

Untersuchungen verschiedener Punktmutanten der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* zeigten, dass die Aminosäuren C110, C182, H112 und H113 für die Zink-Bindung benötigt werden. Alle vier Punktmutanten setzen weder GTP noch das enzymatische Zwischenprodukt 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat (hGTP) zum Produkt Dihydroneopterintriphosphat um. Die Reaktion von hGTP zum GTP wird durch die zinkfreien Enzyme ebenfalls nicht katalysiert.

Die stöchiometrische Umsetzung von GTP mit GTP Cyclohydrolase I wurde durch Quenched-Flow Technik untersucht. Durch Einsatz von [8-¹⁴C]GTP konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung von Formiat mehr als eine Größenordnung schneller ist als die Gesamtreaktion.

Die stöchiometrische Umsetzung von GTP bzw. hGTP mit GTP Cyclohydrolase I wurde in Stopped-Flow Experimenten durch zeitabhängige Aufzeichnung von UV-Spektren der Reaktionsmischung untersucht. Aufgrund der Daten wurde ein Modell mit fünf Folgereaktionen aufgestellt. Der erste Reaktionsschritt, die Ringöffnung des Imidazolrings von GTP, ist reversibel, wie durch Experimente mit der H179 Mutante der GTP Cyclohydrolase I gezeigt wurde.

Die Daten der Stopped- und Quenched-Flow Experimente zeigten, dass GTP zu einem Intermediat umgesetzt wird, das sich in der Reaktionsmischung anreichert und langsam zum

Produkt umgesetzt wird. Zur Aufklärung der Struktur des Hauptintermediates wurde $[8,1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_6,7-^{15}\text{N}_1]\text{GTP}$ mit GTP Cyclohydrolase I unter stöchiometrischen Bedingungen umgesetzt und die Reaktion nach 15 s gequencht. Durch ^{13}C -NMR Experimente konnte gezeigt werden, dass das Hauptintermediat im Sauren Ribose abspaltet. Zusammen mit Daten der Stopped-Flow Experimente ergab sich der Schluß, dass es sich bei dem Hauptintermediat der GTP Cyclohydrolase I Reaktion um das Enol der Amadori-Umlagerung handelt.

Aufgrund der Ergebnisse ergab sich folgender Reaktionsmechanismus für die GTP Cyclohydrolase I Reaktion: Ein durch Zink und H112 koordiniertes Wasser greift nukleophil C-8 von GTP an. Die Protonierung von N-7 erfolgt durch Wasser. Die nachfolgende Öffnung der Bindung zwischen C-8 und N-9 führt zu einem 5-Formylamino-Intermediat. Diese Reaktion wird möglicherweise durch die Protonierung des Furanose-Sauerstoffes durch H112 unter Bildung einer Imin-Zwischenstufe unterstützt. Die Hydrolyse von C-8 als Formiat erfolgt durch nukleophilen Angriff eines Zink-koordinierten Wassers. Produkt der Reaktion ist 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat, das Triphosphat-Homologe der GTP Cyclohydrolase II Reaktion. Die anschließende Amadori-Umlagerung wird eingeleitet durch die Protonierung des Furanose-Sauerstoffes (evtl. durch H112) unter Bildung eines Iminiumions. Durch Abstraktion eines Protons an C-2' bildet sich als Hauptintermediat der Reaktion ein Enol. Stereospezifische Protonierung an C-1' führt zur Bildung des Amadori-Produktes, welches durch intramolekulare Schiffbasekondensation in Dihydroneopterintriphosphat übergeht. Vergleiche zwischen steady state Kinetik und stöchiometrischen Umsetzungen sowie Vergleiche mit Enzymen, die ähnliche Reaktionen katalysieren sprechen dafür, dass die enzymatische Reaktion mit der Bildung des Amadori-Produktes beendet ist.

Die von der GTP Cyclohydrolase II katalysierte Reaktion stellt eine Teilreaktion der GTP Cyclohydrolase I Reaktion dar. Zusätzlich katalysiert die GTP Cyclohydrolase II die Hydrolyse von Pyrophosphat. Produkt der GTP Cyclohydrolase II ist 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat. Als Nebenprodukt entsteht unter stöchiometrischen Bedingungen zu etwa 10 % GMP.

Durch Quenched- und Stopped-Flow Experimente mit GTP konnte kein Intermediat der Reaktion detektiert werden. Stopped-Flow Experimente mit hGTP, einem hypothetischen Intermediat der GTP Cyclohydrolase II Reaktion zeigten, dass die Reaktion mit hGTP als Substrat nur etwa halb so schnell abläuft wie mit GTP. Die experimentellen Daten lassen den

Schluß zu, dass die Abspaltung von Pyrophosphat den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GTP Cyclohydrolase II Reaktion darstellt.

Aufgrund der Ähnlichkeit der von beiden GTP Cyclohydrolasen katalysierten Reaktionen wurde folgender Reaktionsmechanismus für die GTP Cyclohydrolase II postuliert: Die Reaktion beginnt mit der kovalenten Bindung von GTP an an das Enzym unter Abspaltung von Pyrophosphat. Diese Reaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Die Hydrolyse von Formiat verläuft analog zur GTP Cyclohydrolase I. Durch Hydrolyse des gebundenen Substrates vor der Ringöffnung entstehen geringe Mengen GMP.

Die Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase (PTPS) katalysiert die Reaktion von Dihydroneopterintriphosphat zu Pyruvoyltetrahydropterin. Die Untersuchung des Reaktionsmechanismus der PTPS erfolgte durch die Umsetzung von [1'-¹³C]Dihydroneopterintriphosphat mit PTPS in D₂O. Mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie wurde der Einbau von Deuterium in das Edukt der Reaktion untersucht. Durch das vorgestellte Experiment war es nicht möglich, den Einbau von Deuterium in das Edukt nachzuweisen. Über die Reihenfolge der Bildung beider Carbonylgruppen des enzymatischen Produktes lässt sich keine Aussage treffen. Die stöchiometrische Umsetzung von Dihydroneopterintriphosphat durch die PTPS wurde durch Stopped-Flow Experimente durch zeitabhängige Aufnahme von UV-Spektren untersucht. Es konnten keine Zwischenprodukte der Reaktion detektiert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass unabhängig von der Reihenfolge die Bildung der ersten Carbonylgruppe der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion sein muß.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, das Gen der bis dahin unbekanntes PTPS aus Huhn zu klonieren und als Fusionsprotein mit dem maltosebindenden Protein aus *E. coli* (MBP) zur Expression zu bringen. Die Aminosäuresequenz der PTPS aus Huhn zeigt etwa 81 % Homologie zum humanen Protein.

6. Literaturverzeichnis

1. Kaufman, S., and Fischer, D. B. (1962) in *Oxygenases*, pp. 285-337, Academic Press New York
2. Kaufman, S. (1967) Metabolism of the phenylalanine hydroxylation cofactor. *J. Biol. Chem.* **242**, 3934-3943
3. Hufton, S. E., Jennings, I. G., and Cotton, R. G. (1995) Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem. J.* **311**, 353-366
4. Kaufman, S. (1971) *Adv. Enzymol.* **35**, 245-319
5. Shiman, R. (1985) in *Folates and Pterins* (Blakely, R. L., and Benkovic, S. J., eds), pp. 179-249, John Wiley & Sons, New York
6. Kaufman, S., and Kaufman, E. E. (1985) in *Folates and Pterins* (Blakely, R. L., and Benkovic, S. J., eds) Vol. 2, pp. 251-352, John Wiley & Sons, New York
7. Zigmond, R. E., Schwarzschild, M. A., and Rittenhouse, A. R. (1989) Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci* **12**, 415-461
8. Joh, T. H., Hwang, O., and Abate, C. (1986). Neuromethods Series I (Boulton, A. A., Baker, G. B., and Yu, P. Y., Eds.), 2, Humana Press, Clifton, NJ
9. Boadle Biber, M. C. (1993) Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* **60**, 1-15
10. Davis, M. D., and Kaufman, S. (1989) Evidence for the formation of the 4a-carbinolamine during the tyrosine-dependent oxidation of tetrahydrobiopterin by rat liver phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **264**, 8585-8596
11. Nakanishi, N., Hasegawa, H., and Watabe, S. (1977) A new enzyme, NADPH-dihydropteridine reductase in bovine liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **81**, 681-685
12. Hasegawa, H., and Nakanishi, N. (1987) Dihydropteridine reductase from bovine liver. *Methods Enzymol.* **142**, 103-110
13. Nakanishi, N., Yoshida, A., Ozawa, K., and Yamada, S. (1986) Purification and properties of NADH-specific dihydropteridine reductase from human erythrocytes. *Enzyme* **35**, 42-52
14. Curtius, H. C., Matasovic, A., Schoedon, G., Kuster, T., Guibaud, P., Giudici, T., and Blau, N. (1990) 7-Substituted pterins. A new class of mammalian pteridines. *J. Biol. Chem.* **265**, 3923-3930

15. Davis, M. D., Ribeiro, P., Tipper, J., and Kaufman, S. (1992) "7-tetrahydrobiopterin," a naturally occurring analogue of tetrahydrobiopterin, is a cofactor for and a potential inhibitor of the aromatic amino acid hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10109-10113
16. Tayeh, M. A., and Marletta, M. A. (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* **264**, 19654-19658
17. Kwon, N. S., Nathan, C. F., and Stuehr, D. J. (1989) Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **264**, 20496-20501
18. Giovanelli, J., Campos, K. L., and Kaufman, S. (1991) Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7091-7095
19. Hemmens, B., and Mayer, B. (1997) (Totowa, N. J., ed) Vol. 100, pp. 1-32, Humana Press Inc.
20. Griffith, O. W., and Stuehr, D. J. (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* **57**, 707-736
21. Mayer, B., and Werner, E. R. (1995) Why tetrahydrobiopterin? *Adv Pharmacol* **34**, 251-261
22. Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., and Tainer, J. A. (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* **279**, 2121-2126
23. Crane, B. R., Arvai, A. S., Gachhui, R., Wu, C., Ghosh, D. K., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., and Tainer, J. A. (1997) The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes [see comments]. *Science* **278**, 425-431
24. Tietz, A., Lindberg, M., and Kennedy, E. P. (1964) A new pteridine-requiring enzyme system for the oxidation of glycerylethers. *J. Biol. Chem.* **239**, 4081-4090
25. Weygand, F., Simon, H., Dahms, G., Waldschmidt, M., Schliep, H. J., and Wacker, H. (1961) *Angew. Chem.* **73**, 402-407
26. Burg, A. W., and Brown, G. M. (1968) The biosynthesis of folic acid. 8. Purification and properties of the enzyme that catalyzes the production of formate from carbon atom 8 of guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* **243**, 2349-2358

27. Burg, A. W., and Brown, G. M. (1966) The biosynthesis of folic acid. VI. Enzymatic conversion of carbon atom 8 of guanosine triphosphate to formic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 275-278
28. Shiota, T., Palumbo, M. P., and Tsai, L. (1967) A chemically prepared formamidopyrimidine derivative of guanosine triphosphate as a possible intermediate in pteridine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **242**, 1961-1969
29. Nar, H., Huber, R., Auerbach, G., Fischer, M., Hoesl, C., Ritz, H., Bracher, A., Meining, W., Eberhardt, S., and Bacher, A. (1995) Active site topology and reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 12120-12125
30. Nar, H., Huber, R., Meining, W., Schmid, C., Weinkauf, S., and Bacher, A. (1995) Atomic structure of GTP cyclohydrolase I. *Structure* **3**, 459-466
31. Switchenko, A. C., Primus, J. P., and Brown, G. M. (1984) Intermediates in the enzymic synthesis of tetrahydrobiopterin in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 754-760
32. Switchenko, A. C., and Brown, G. M. (1985) The enzymatic conversion of dihydroneopterin triphosphate to tripolyphosphate and 6-pyruvoyl-tetrahydropterin, an intermediate in the biosynthesis of other pterins in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **260**, 2945-2951
33. Milstien, S., and Kaufman, S. (1989) The biosynthesis of tetrahydrobiopterin in rat brain. Purification and characterization of 6-pyruvoyl tetrahydropterin (2'-oxo)reductase. *J. Biol. Chem.* **264**, 8066-8073
34. Nar, H., Huber, R., Heizmann, C. W., Thony, B., and Burgisser, D. (1994) Three-dimensional structure of 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase, an enzyme involved in tetrahydrobiopterin biosynthesis. *EMBO J.* **13**, 1255-1262
35. Matsubara, M., Katoh, S., Akino, M., and Kaufman, S. (1966) Sepiapterin reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 202-212
36. Nagai, M. (1968) Studies on sepiapterin reductase: further characterization of the reaction product. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 426-435
37. Auerbach, G., Herrmann, A., Gütlich, M., Fischer, M., Jacob, U., Bacher, A., and Huber, R. (1997) The 1.25 Å crystal structure of sepiapterin reductase reveals its binding mode to pterins and brain neurotransmitters. *EMBO J.* **16**, 7219-7230
38. Brown, G. M., Williamson, J.M. (1987) in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* (Neidhardt, F. C., ed) Vol. 1, pp. 521-538, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

39. Luo, M., Piffanelli, P., Rastelli, L., and Cella, R. (1993) Molecular cloning and analysis of a cDNA coding for the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Daucus carota*. *Plant Mol. Biol.* **22**, 427-435
40. Lazar, G., Zhang, H., and Goodman, H. M. (1993) The origin of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase isogenes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **3**, 657-668
41. Wang, M., Ratnam, S., and Freisheim, J. H. (1995) Cloning, nucleotide sequence and expression of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from *Glycine max*. *Biochim. Biophys. Acta* **1261**, 325-336
42. Ivanetich, K. M., and Santi, D. V. (1990) Thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *Experimental Parasitology* **70**, 367-371
43. Ivanetich, K. M., and Santi, D. V. (1990) Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *FASEB J.* **4**, 1591-1597
44. Kuhn, R., György, P., and Wagner-Jauregg, T. (1933) Über Lactoflavin, den Farbstoff der Molke. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **66**, 1034-1038
45. Bruice, T. C. (1980) Mechanisms of flavin catalysis. *Acc. Chem. Res.* **13**, 256-262
46. Foy, H., and Mbaya, V. (1977) Riboflavin. *Prog. Food Nutr. Sci.* **2**, 357-394
47. Howells, D. J., and Plaut, G. W. E. (1965) Biosynthesis of Riboflavin by a purine-requiring mutant strain of *Ashbya gossypii*. *Biochem Biophys Res Com* **89**, 759-764
48. Bacher, A., and Mailaender, B. (1973) Biosynthesis of riboflavin. The structure of the purine precursor. *J. Biol. Chem.* **248**, 6227-6231
49. Brown, E. G., Goodwin, T. W., and Jones, O. T. G. (1958) Studies on the biosynthesis of riboflavin. IV. Purine metabolism of riboflavin biosynthesis in *Eremothecium Ashbyii*. *Biochem. J.* **68**, 40-49
50. Volk, R., and Bacher, A. (1988) Biosynthesis of riboflavin. The structure of the four-carbon precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3651-3653
51. Foor, F., and Brown, G. M. (1975) Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**, 3545-3551
52. Foor, F., and Brown, G. M. (1980) GTP cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **66**, 303-307
53. Nichol, C. A., Smith, G. K., and Duch, D. S. (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 729-764

54. Hatakeyama, K., Inoue, Y., Harada, T., and Kagamiyama, H. (1991) Cloning and sequencing of cDNA encoding rat GTP cyclohydrolase I. The first enzyme of the tetrahydrobiopterin biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 765-769
55. Katzenmeier, G., Schmid, C., Kellermann, J., Lottspeich, F., and Bacher, A. (1991) Biosynthesis of tetrahydrofolate. Sequence of GTP cyclohydrolase I from *Escherichia coli*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **372**, 991-997
56. McLean, J. R., Krishnakumar, S., and O'Donnell, J. M. (1993) Multiple mRNAs from the Punch locus of *Drosophila melanogaster* encode isoforms of GTP cyclohydrolase I with distinct N-terminal domains. *J. Biol. Chem.* **268**, 27191-27197
57. Maier, J., Witter, K., Guetlich, M., Ziegler, I., Werner, T., and Ninnemann, H. (1995) Homology cloning of GTP-cyclohydrolase I from various unrelated eukaryotes by reverse-transcription polymerase chain reaction using a general set of degenerate primers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 705-711
58. Herz, S. (2000) *Expression of Genes of the Riboflavin and Terpen biosynthesis and Characterisation of the Resulting Proteins*. Ph.D. Thesis, Technische Universität München, München, Germany
59. Howell, D. M., and White, R. H. (1997) D-erythro-neopterin biosynthesis in the methanogenic archaea *Methanococcus thermophila* and *Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH*. *J. Bacteriol.* **179**, 5165-5170
60. Ritz, H., Keller, G., Richter, G., Katzenmeier, G., and Bacher, A. (1993) Location of the gene coding for GTP cyclohydrolase I on the physical map of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 1553
61. Bracher, A. (1998) *Structure and Reaction Mechanism of GTP cyclohydrolase I*. Ph.D. Thesis, Technische Universität München, München, Germany
62. Auerbach, G., Herrmann, A., Bracher, A., Bader, G., Gütlich, M., Fischer, M., Neukamm, M., Garrido-Franco, M., Richardson, J., Nar, H., Huber, R., and Bacher, A. (2000) Zinc plays a Key Role in GTP Cyclohydrolase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13567-13572
63. Bracher, A., Fischer, M., Eisenreich, W., Ritz, H., Schramek, N., Boyle, P., Gentili, P., Huber, R., Nar, H., Auerbach, G., and Bacher, A. (1999) Histidine 179 mutants of GTP cyclohydrolase I catalyze the formation of 2-amino-5-formylamino-6-ribofuranosylamino-4(3H)-pyrimidinone triphosphate. *J. Biol. Chem.* **274**, 16727-16735

64. Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., Götze, E., Herrmann, A., Gütllich, M., and Bacher, A. (1998) Biosynthesis of pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. *J. Biol. Chem.* **273**, 28132-28141
65. Ritz, H. (1998) *Molekularbiologische und proteinchemische Untersuchungen an bakteriellen GTP-Cyclohydrolasen*. Ph.D. Thesis, Technische Universität München, München
66. Richter, G., Ritz, H., Katzenmeier, G., Volk, R., Kohnle, A., Lottspeich, F., Allendorf, D., and Bacher, A. (1993) Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping, and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 4045-4051
67. Bacher, A., Eisenreich, W., Kis, K., Ladenstein, R., Richter, G., Scheuring, J., and Weinkauff, S. (1993) in *Bioorganic Chemistry Frontiers* (Dugas, H., and Schmidtchen, F. P., eds) Vol. 3, pp. 147-192, Springer, Berlin
68. Kobayashi, M., Ohara-Nemoto, Y., Kaneko, M., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., and Yamamoto, K. (1998) Potential of *Escherichia coli* GTP cyclohydrolase II for hydrolyzing 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 26394-26399
69. Auerbach, G., and Nar, H. (1997) The pathway from GTP to tetrahydrobiopterin: three-dimensional structures of GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *Biol Chem* **378**, 185-192
70. Inoue, Y., Kawasaki, Y., Harada, T., Hatakeyama, K., and Kagamiyama, H. (1991) Purification and cDNA cloning of rat 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase. *J. Biol. Chem.* **266**, 20791-20796
71. Bürgisser, D. M., Thony, B., Redweik, U., Heß, D., Heizmann, C. W., Huber, R., and Nar, H. (1995) 6-Pyruvoyl tetrahydropterin synthase, an enzyme with a novel type of active site involving both zinc binding and an intersubunit catalytic triad motif; site-directed mutagenesis of the proposed active center, characterization of the metal binding site and modelling of substrate binding. *J. Mol. Biol.* **253**, 358-369
72. Le Van, Q., Katzenmeier, G., Schwarzkopf, B., Schmid, C., and Bacher, A. (1988) Biosynthesis of biopterin. Studies on the mechanism of 6-pyruvoyltetrahydropteridine synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 512-517

73. Ploom, T., Thoeny, B., Yim, J., Lee, S., Nar, H., Leimbacher, W., Richardson, J., Huber, R., and Auerbach, G. (1999) Crystallographic and kinetic investigations on the mechanism of 6- pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *J. Mol. Biol.* **286**, 851-860
74. Bullock, w. o., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* with beta galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**, 376-380
75. Zamenhof, P. J., and Villarejo, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting -complementation of -galactosidase fragments in vivo. *J. Bacteriol.* **110**, 171-178
76. Tartof, K. D., and Hobbs, C. A. (1987) Improved media for growing plasmid ans cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**, 12
77. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
78. Read, S. M., Northcote, D. H., Compton, S. J., and Jones, C. G. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **116**, 53-64
79. Compton, S. J., and Jones, C. G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**, 369-374
80. Pfleiderer, W. (1985) in *Folates and Pterins* (Blakely, R. L., Benkovic, S.J., ed) Vol. 2, pp. 43-114, John Wiley & Son, New York
81. Blau, N., Bosshard, R., Redweik, U., and Niederwieser, A. (1982) HPLC of neopterin phosphates. *Biochem. Clin. Aspects Pteridines* **1**, 103-116
82. Kerler, F., Hultner, L., Ziegler, I., Katzenmaier, G., and Bacher, A. (1990) Analysis of the tetrahydrobiopterin synthesizing system during maturation of murine reticulocytes. *J. Cell. Physiol.* **142**, 268-271
83. Bacher, A., Richter, G., Ritz, H., Eberhardt, S., Fischer, M., and Krieger, C. (1997) Biosynthesis of riboflavin: GTP cyclohydrolase II, deaminase, and reductase. *Methods Enzymol.* **280**, 382-389
84. Takikawa, S., Curtius, H. C., Redweik, U., Leimbacher, W., and Ghisla, S. (1986) Biosynthesis of tetrahydrobiopterin. Purification and characterization of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase from human liver. *Eur. J. Biochem.* **161**, 295-302

85. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
86. Okayama, H., and Berg, P. (1982) High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 161-170
87. Okayama, H., and Berg, P. (1992) High-efficiency cloning of full-length cDNA. 1982 [classical article]. *Biotechnology* **24**, 210-219
88. Okayama, H., and Berg, P. (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 280-289
89. Okayama, H., and Berg, P. (1992) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. 1983 [classical article]. *Biotechnology* **24**, 270-279
90. Holmes, D. S., and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197
91. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299
92. de Martynoff, G., Pays, E., and Vassart, G. (1980) Synthesis of a full length DNA complementary to thyroglobulin 33 S messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**, 645-653
93. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977 [classical article]. *Biotechnology* **24**, 104-108
94. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463-5467
95. Blau, N., and Niederwieser, A. (1983) Guanosine triphosphate cyclohydrolase I assay in human and rat liver using high-performance liquid chromatography of neopterin phosphates and guanine nucleotides. *Anal. Biochem.* **128**, 446-452
96. Dawson, R. C. M., Elliot, D. C., Elliot, W. H., and Jones, K. M. (1986), 3 Ed., pp. 109, Oxford University Press, Oxford
97. Mancini, R., Saracino, F., Buscemi, G., Fischer, M., Schramek, N., Bracher, A., Bacher, A., Guetlich, M., and Carbone, M. L. (1999) Complementation of the fol2 deletion in *Saccharomyces cerevisiae* by human and *Escherichia coli* genes encoding GTP cyclohydrolase I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 521-527
98. Yim, J. J., and Brown, G. M. (1976) Characteristics of guanosine triphosphate cyclohydrolase I purified from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **251**, 5087-5094

99. Bracher, A., Schramek, N., and Bacher, A. (2001) Biosynthesis of pteridines. Stopped flow kinetic analysis of GTP cyclohydrolase I. *Biochemistry* in press
100. Holdengreber, V., Krieger, C., Gütlich, M., Schramek, N., Bacher, A., and Ben-Shaul, Y. (2001) Localization of two enzymes of the tetrahydrobiopterin biosynthetic pathway in embryonic chicken retina. in preparation
101. Sharff, A. J., Wilson, D. K., Chang, Z., and Quioco, F. A. (1992) Refined 2.5 Å structure of murine adenosine deaminase at pH 6.0. *J. Mol. Biol.* **226**, 917-921
102. Wilson, D. K., Rudolph, F. B., and Quioco, F. A. (1991) Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* **252**, 1278-1284
103. Wilson, D. K., and Quioco, F. A. (1993) A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water. *Biochemistry* **32**, 1689-1694
104. Xiang, S., Short, S. A., Wolfenden, R., and Carter, C. W., Jr. (1997) The structure of the cytidine deaminase-product complex provides evidence for efficient proton transfer and ground-state destabilization. *Biochemistry* **36**, 4768-4774
105. Carfi, A., Pares, S., Duee, E., Galleni, M., Duez, C., Frere, J. M., and Dideberg, O. (1995) The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J.* **14**, 4914-4921
106. Christianson, D. W., and Lipscomb, W. N. (1986) Complex between carboxypeptidase A and a possible transition-state analog: mechanistic inferences from high-resolution x-ray structures of enzyme-inhibitor complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 4998-5003
107. Christianson, D. W., and Lipscomb, W. N. (1988) Structural aspects of zinc protease mechanisms. *Mol. Struct. Energ.* **9**, 1-25
108. Christianson, D. W., and Lipscomb, W. N. (1989) Carboxypeptidase A. *Acc. Chem. Res.* **22**, 62-69
109. Lipscomb, W. N., and Sträter, N. (1996) Recent Advances in Zinc Enzymology. *Chem. Rev.* **96**, 2375-2433
110. Hommel, U., Eberhard, M., and Kirschner, K. (1995) Phosphoribosyl anthranilate isomerase catalyzes a reversible amadori reaction. *Biochemistry* **34**, 5429-5439
111. Ghisla, S., Kuster, T., Steinerstauch, P., Leimbacher, W., Richter, W. J., Raschdorf, F., Dahinden, R., and Curtius, H. C. (1990) 1H-NMR and mass spectrometric studies of tetrahydropterins. Evidence for the structure of 6-pyruvoyl tetrahydropterin, an intermediate in the biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *Eur. J. Biochem.* **187**, 651-656

Anhang A

DNA Sequenz der Pyruvyltetrahydropterin-Synthase aus Huhn.

5' -

GGATGGAGCCCGCCCATGGCACCGCCCGCAGCGCCCTGGCCGGCTGTCCCGCACCCGCA GTTTCAGCCGCTGCCACCGCCTGCATA GTAATCA
CTGAGTGATGAAGAAAACCTGAAACTCTTTGGGAAGTGCAACAATCCTAATGGCCACGGGCACAAC TACAAGGTTATAGTCAC TGTGCCGTGAGAGAT T
GACCCAGTCTCAGGAATGTTATAAACCTGACACAGACCTGAAAAGAGTACATGCACGAGCGGATCATGGAGCCGCTTGACCACAAAAA CCTGGATAAGGAT
GTGCCCTACTTCGCTGAGGTGGTGAGCACCCACAGAGAACGTTGCAGTGTTCATCTGGGAAAAACCTCAAGAGGCTCC TGCCCTGCCGGGAATGCTTTATAAA
GTCAAAAGTGATGAAACGGACCAGAACATTTGTGTTATAAAAAGAGAACAATTTCTGAGAGGTGAAATGAGCCGAA GCTCAGCTGGTCAGAAAT T
GACACCTGCTCACCCTAGTGACACTGTCAGCCCCGCTTGCTGTGTCC TGAAACAAGCCCTTGGTTATGCAC TGCAAAAGAACCAACCAAGGTTAATCTTC
TGCCAGAGATCTTAGAGCAGTTGGGTGTCACAATCTTGATGCATCTGCCCTT TACCACAAGACATTCGGGTTTCATATAAA CCAACAGTGCAGTCTGCCAA
GTGTATCATGTTAAATAAAGCAGCTTCCAGAGAGAAAAA AAAAAAAAAAAAAA - 3'

Anhang B

Aminosäure-Sequenzvergleich verschiedener Pyruvoyltetrahydropterinsynthase.

		PPH4-Wobbel 1 ↓
<i>G. gallus</i>	...MAPPAARLARLSRTASFSACHRLHSKSLSD EENLKLFGKCNPNPNGHGHNYKVIVTVRGEIDPVS	
<i>H. sapiens</i>	MTEGGGRCCQAQVSRRI SFSASHRLYSKFLSDEENLKLFGKCNPNPNGHGHNYKVIVTVHGEIDPAT	
<i>R. norvegicus</i>	.MNAAVGLRRRARLSRLVSFSASHRLHS PLSAEENLKVFGKCNPNPNGHGHNYKVIVT IHGEIDPVT	
<i>D. melanogaster</i>	...MSQQPVAFLLTRRETFSACHRLHSPQLSDAENLEVF GKCNPFHGHGHNYTVEITVRGPIDRRRT	Zn ²⁺ Zn ²⁺
<i>G. gallus</i>	GMVINLTDLKEYMQAIMEPLDHNKLDKDVYFFAEVVSTTENVAVFIWENLKR.LLPAGMLYKVKVY	
<i>H. sapiens</i>	GMVMNLADLKKYMEEA IMQPLDHNKLDMDVPYFADVYSTTENVAVYIWDNLQK.VLPVGVLYKVKVY	
<i>R. norvegicus</i>	GMVMNLTDLKEYMEEAIMKPLDHNKLDLDVYFADVYSTTENVAVYIWENLQR.LLPVGALYKVKVY	
<i>D. melanogaster</i>	GMVLNITELKEAIEITVIMKRLDHNKLDKDVYEFANTPSTTENLAVYIWDNIRLQLKKPELLLYEVKIH	PPH4-Wobbel 2 PPH4-Wobbel 3
<i>G. gallus</i>	ETDQNI VVYKGEETISER.....	
<i>H. sapiens</i>	ETDNNI VVYKGE.....	
<i>R. norvegicus</i>	ETDNNI VVYKGE.....	
<i>D. melanogaster</i>	ETPKNI ISYRGPYPLNGIYNPINKRIAHDSC TINISSDSD	

