

Institut für Organische Chemie und Biochemie der
Technischen Universität München

Untersuchung von Struktur-funktionsbeziehungen bei Enzymen der Tetrahydrobiopterin- und Riboflavinbiosynthese

Susanne Schiffmann

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Th. Bach
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 30.04.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 24.06.2002 angenommen.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von November 1998 bis März 2002 am Lehrstuhl III für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher danke ich für die engagierte Betreuung und das stete Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. M. Gütlich, der mir bei Fragen stets hilfsbereit und ausführlichst zur Seite stand, alle auftretenden Probleme lösen half, mich an seinem umfassenden Wissen gerne teilhaben ließ, Ergebnisse interessiert und detailliert mit mir diskutierte und wirklich immer Zeit für mich hatte.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. A. Eiblmaier, Herrn Dr. N. Schramek und Herrn J. Kaiser für die zahlreichen Diskussionen und die immerwährende Unterstützung.

Meiner arabian fly und Reni danke ich für die Lachtherapien ☺.

Herrn Dr. M. Fischer danke ich für die Überlassung eines „Super“-Projektes. Frau Dr. C. Krieger, Herrn W. Römisch, Herrn Dr. T. Lemm, Herrn Dr. S. Steinbacher und Herrn Dr. G. Bader danke ich für die hervorragende Kooperation bei der Bearbeitung der gemeinsamen Projekte.

Weiter möchte ich mich bei meinen Kollegen K. Kemter, I. Haase, K. Schott, A. Schott und S. Echt für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Organische Chemie und Biochemie danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Kollegialität.

Meinen Freunden Manu, Verena und Heili danke ich für die Durchsicht der Arbeit und die zahlreichen Anregungen. Margit danke ich für die Lösung meiner sämtlichen Computerprobleme ☺.

Meiner Familie,
Manu und Heili

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die Biosynthese von Tetrahydrobiopterin.....	1
1.2	Die GTP Cyclohydrolase I.....	3
1.3	Das GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein.....	6
1.4	Die Biosynthese von Riboflavin.....	8
1.5	Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.....	11
1.6	Aufgabenstellung.....	12
2.	Materialien und Methoden.....	13
2.1	Geräte.....	13
2.2	Chemikalien und Enzyme.....	15
2.3	Bakterienstämme.....	17
2.4	Expressionsvektor.....	17
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	18
2.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	18
2.5.1.1	Schnellisolierung mit Hitzeschock.....	18
2.5.1.2	Plasmidisolierung mittels modifizierter Alkali/SDS-Methode.....	19
2.5.1.3	Plasmidisolierung mittels peqlab-Kit.....	20
2.5.2	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	21
2.5.2.1	Direkte Reinigung von PCR-Fragmenten.....	21
2.5.2.2	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	21
2.5.3	Agarosegelelektrophorese.....	22
2.5.4	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	23
2.5.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Transformation.....	23
2.5.5.1	Kompetente Zellen nach Hanahan.....	23
2.5.5.2	Transformation mit kompetenten Zellen nach Hanahan.....	24
2.5.5.3	Herstellung von elektrokompenten Zellen.....	25
2.5.5.4	Elektroporation elektrokompenten Zellen.....	25

2.5.5.5	Transformation in XL1-Red Zellen.....	26
2.5.6	Polymerase-Kettenreaktion.....	26
2.5.7	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	28
2.5.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	28
2.5.9	DNA-Sequenzierung.....	29
2.5.10	Konstruktion von Mutantenplasmide	30
2.5.11	Fragmentmuster des mutierten DS-Gens.....	35
2.6	Stammhaltung und proteinchemische Methoden.....	36
2.6.1	Kulturmedien	36
2.6.2	Stammhaltung.....	37
2.6.3	Kulturbedingungen	37
2.6.4	Zellaufschluss mit Ultraschall zur Proteingewinnung.....	38
2.6.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	39
2.6.6	Bestimmung der enzymatischen Aktivität.....	40
2.6.6.1	Enzymtest auf GTP Cyclohydrolase I	40
2.6.6.2	Enzymtest auf GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein	41
2.6.6.3	Enzymtest auf 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.....	41
2.6.6.4	In <i>vivo</i> -Nachweis der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase auf Agarplatte	42
2.6.6.5	In <i>vivo</i> -Nachweis der GTP Cyclohydrolase II auf Agarplatte.....	42
2.6.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	43
2.6.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford	43
2.6.7.2	Proteinbestimmung mittels UV	44
2.6.8	Aufkonzentration von Proteinlösungen	44
2.6.9	Aminosäuresequenzanalyse.....	44
2.6.10	Ultrazentrifugation.....	45
2.6.11	CD-Spektrum	45
2.7	Proteinreinigung	46
2.7.1	Reinigung von humanen GTP Cyclohydrolase I Mutanten.....	46
2.7.1.1	Ni-NTA-Säule.....	46
2.7.1.2	Dialyse	46
2.7.2	Reinigung des GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorproteins.....	47
2.7.2.1	Reinigung des humanen GFRP.....	47
2.7.2.1.1	Präparative Hitzefällung	47

2.7.2.1.2	Anionenaustauschchromatographie.....	47
2.7.2.2	Reinigung des CBP-GFRP	48
2.7.2.3	Reinigung des Hisactophilin-GFRP	48
2.7.3	Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus <i>M. jannaschii</i>	49
2.7.3.1	Ammoniumsulfatfällung.....	49
2.7.3.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie	49
2.7.3.3	Hydroxylapatit Säule	50
2.7.3.4	Gelfiltration zur Bestimmung der Quartärstruktur	50
2.7.4	Reinigung der Lumazinsynthase aus <i>E. coli</i>	51
2.8	Synthese von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-pyrimidindion	51
3.	Ergebnisse und Diskussion	52
3.1	Humane GTP Cyclohydrolase I.....	52
3.1.1	Klonierung von Δ 42His GTP Cyclohydrolase I.....	52
3.1.2	Reinigung der Δ 42His GTP Cyclohydrolase I	53
3.1.3	Erkennung der humanen GTP Cyclohydrolase I durch das GFRP aus Ratte.....	53
3.1.3.1	Test auf Komplexbildung mittels Gelfiltration.....	53
3.1.3.2	Aktivitätstest des Komplexes	55
3.1.4	Klonierung der Δ 42His GTP Cyclohydrolase I Mutanten.....	55
3.1.4.1	Einführung der Mutation E236X.....	56
3.1.4.2	Reinigung der Δ 42His GTP Cyclohydrolase I Mutanten	57
3.1.4.3	Aktivitätstests der Δ 42His GTP Cyclohydrolase I Mutanten.....	57
3.2	Die GTP Cyclohydrolase I aus <i>E. coli</i>	58
3.2.1	Zufallsmutagenese mit dem Mutatorstamm XL1-Red	58
3.2.2	Zufallsmutagenese mit PCR	59
3.3	Das GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein	62
3.3.1	Das GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein aus Ratte	62
3.3.1.1	Kristallisation von GFRP aus Ratte.....	62
3.3.1.2	Kristallstruktur von GFRP.....	62
3.3.1.3	Charakterisierung des Metallions mit Totalreflexions-Röntgen- fluoreszenzanalyse.....	65

3.3.1.4	Punktmutagenese von GFRP aus Ratte	66
3.3.1.4.1	Mutagenisierungsstrategien für den Austausch T8V.....	66
3.3.1.4.2	Mutagenisierungsstrategien für die Austausch K36E, R37E und K36E/R37E.....	67
3.3.2	Das humane GFRP	68
3.3.2.1	Klonierung des humanen GFRP	68
3.3.2.2	Reinigungsstrategie für das humane GFRP	69
3.3.2.3	Erkennung der humanen $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I durch das humane GFRP	70
3.3.2.4	Untersuchungen zur Bestimmung der Ausrichtung des GFRP	70
3.3.2.4.1	Klonierung des CBP-GFRP-HS	71
3.3.2.4.1.1	Reinigungsstrategie des humanen CBP-GFRP.....	72
3.3.2.4.1.2	Erkennung der humanen GTP Cyclohydrolase I durch das CBP-GFRP-HS	73
3.3.2.4.2	Klonierung des Hisactophilin-GFRP-HS	73
3.3.2.4.2.1	Reinigungsstrategie für Hisactophilin-GFRP-HS	73
3.3.2.4.2.2	Erkennung der humanen GTP Cyclohydrolase I durch das Hisactophilin GFRP-HS	74
3.3.3	Das GFRP aus <i>G. gallus</i>	75
3.4	Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.....	77
3.4.1	Identifizierung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.....	77
3.4.2	Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.....	77
3.4.3	Molekulargewicht der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase	79
3.4.4	Bestimmung der Konfiguration von 3,4-Dihydroxy-2-butanon	79
3.4.5	Struktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase	80
3.4.5.1	Kristallisation der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.....	80
3.4.5.2	Kristallstruktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase	80
3.4.6	Auswahl der katalytisch essentiellen Aminosäuren.....	82
3.4.7	Mutationsstrategien zur Generierung der Punktmutanten	86
3.4.7.1	Punktmutanten R161S, H164N, H164S, T165S, T165A, E166S.....	86
3.4.7.2	Punktmutante H147S	86
3.4.7.3	Punktmutante E185D, E185Q und E185S.....	87
3.4.7.4	Punktmutanten D21E, D21N, D21S, S22A, R25E und R25K	88
3.4.7.5	Punktmutante E26D, E26Q und E26S.....	89

3.4.7.6	Punktmutanten E28D, E28Q, E28S, D30E, D30N und D30S.....	89
3.4.7.7	Punktmutanten C55S und C55G.....	90
3.4.7.8	Punktmutanten T112A, T115A, D118S, R119S und T122A	91
3.4.7.9	Doppelmutante D30N/H147S.....	92
3.4.7.10	Identifizierung der einzelnen Punktmutanten.....	92
3.4.8	Enzymatische Eigenschaften der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.....	94
3.4.8.1	Kinetik des Wildtyps und der Mutanten.....	94
3.4.8.2	Bestimmung der Aktivierungsenergie	97
3.4.8.3	Einfluss von EDTA auf die enzymatische Aktivität.....	98
3.4.8.4	Einfluss von Metallionen auf die enzymatische Aktivität.....	98
3.4.8.4.1	Abhängigkeit der Aktivität von der Mg^{2+} -Konzentration.....	98
3.4.8.4.2	Abhängigkeit der Aktivität von der Mn^{2+} -Konzentration.....	99
3.4.8.4.3	Abhängigkeit der Aktivität von der Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Konzentration.....	100
3.4.8.4.4	Atomabsorptionsspektroskopie.....	101
3.4.9	Das aktive Zentrum der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase...	102
3.4.10	Der hypothetische Reaktionsmechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.....	107
4.	Zusammenfassung	111
5.	Literaturverzeichnis	114
6.	Anhang.....	128

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AF	Anreicherungsfaktor
AK	Antikörper
AP	5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-pyrimidindion
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Bp	Basenpaar
CBP	Calmodulin-Binding-Peptide
CD	Cirkularer Dichroismus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHII	GTP Cyclohydrolase II
CHI	GTP Cyclohydrolase I
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DHBP	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DS	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase
DTE	Dithioerithrol
DTT	Dithiothreitol
DXR	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase
EDTA	Ethylendiamin-N',N',N',N'-tetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GFRP	GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid

kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
kV	Kilovolt
LB	Luria Bertani
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NADPH	β -Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NH ₂ TP	Dihydroneopterintriphosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NTA	Nitrilotriaceticacid
MCS	multiple cloning site
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
6PPH ₄	6-Pyruvoyltetrahydropterin
PTPS	6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase
RBS	ribosomale Bindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Rubisco	D-Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
TB	Terrific Broth
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
TIM	Triosephosphatisomerase
TRFA	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	Volt
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die Biosynthese von Tetrahydrobiopterin

In tierischen Zellen ist Tetrahydrobiopterin (BH₄) ein Kofaktor bei bestimmten oxidativen enzymatischen Umsetzungen. Die am Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan beteiligten Monooxygenasen sind BH₄-abhängig (Kaufman *et al.*, 1962, 1967; Hufton *et al.*, 1995). Durch diese Reaktionen wird nicht nur der oxidative Aminosäureabbau in der Leber eingeleitet, sondern sie stellen auch den Beginn der Biosynthese von Neurotransmittern wie Serotonin sowie der Catecholamine dar. Als Kofaktor der Alkylglycerinmonooxygenase, welche die Spaltung von Glycerinethern in Glycerin und Fetaldehyd katalysiert, ist BH₄ auch in den Fettstoffwechsel des Menschen involviert (Kaufman *et al.*, 1990). Darüber hinaus wird BH₄ auch eine Rolle bei der Zellproliferation (Tanaka *et al.*, 1989) sowie bei der Melanogenese (Schallreuter *et al.*, 1994) zugesprochen. BH₄ aktiviert die NO Synthase (Giovanelli *et al.*, 1991) und beeinflusst somit die NO-Produktion. NO ist für die Erweiterung von Blutgefäßen mitverantwortlich, verhindert die Blutplättchenaggregation und unterstützt u. a. die Aktivität von Makrophagen gegen Tumorzellen und Pathogene (Kwon *et al.*, 1989, Radomski *et al.*, 1990). NO ist zudem an der Regulierung der Neurotransmission, der Immunabwehr und an Autoimmunkrankheiten beteiligt.

Verschiedene Krankheitsbilder wie DOPA-responsive Dystonie (Niederwieser *et al.*, 1984) und atypische Phenylketonurie entstehen durch den Mangel an BH₄ und die damit verbundene Störung der Neurotransmitterbiosynthese (Nichol *et al.*, 1985, Blau *et al.*, 1996). Weiterhin stehen einige neurologische Erkrankungen, wie Alzheimer, Parkinson, Autismus und Depression im Verdacht, die Konsequenz eines zu niedrigen BH₄-Spiegels zu sein (Thöny *et al.*, 2000).

Die Biosynthese von BH₄ (4) (Abb. 1) beginnt mit der Umsetzung von GTP (1) zu Dihydroneopterintriphosphat (2) (NH₂TP). Diese komplexe Reaktion wird durch die GTP Cyclohydrolase I katalysiert und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Die intrazelluläre BH₄-Konzentration wird hauptsächlich durch die Aktivität der GTP Cyclohydrolase I reguliert. Abgesehen von einer Produkthemmung durch BH₄ erfolgt in der Leber von Vertebraten eine Regulation durch das GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein (GFRP). In Zellkulturen wurde bei Zugabe von Phytohemagglutinin (Blau *et al.*, 1985, Ziegler *et al.*, 1990), Interferon- γ (Schoedon *et al.*, 1987) und

Tumornekrosefaktor- α (Werner *et al.*, 1991) eine Aktivierung der GTP Cyclohydrolase I beobachtet.

Die 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase (PTPS) katalysiert den zweiten Schritt der BH₄-Biosynthese durch eine intramolekulare stereospezifische Redoxreaktion von NH₂TP zu 6-Pyruvoyltetrahydropterin (3) (6PPH₄). Nar *et al.* konnte 1994 die Struktur der Mg²⁺- und Zn²⁺- abhängigen PTPS aus Ratte aufklären.

Im letzten Schritt der BH₄-Biosynthese werden die beiden Carbonylgruppen der Seitenkette von 6PPH₄ stereospezifisch durch die NADPH-abhängige Sepiapterin Reduktase reduziert (Masako *et al.*, 1966). Die Struktur der murinen Sepiapterin Reduktase wurde erstmals 1997 von Auerbach *et al.* beschrieben.

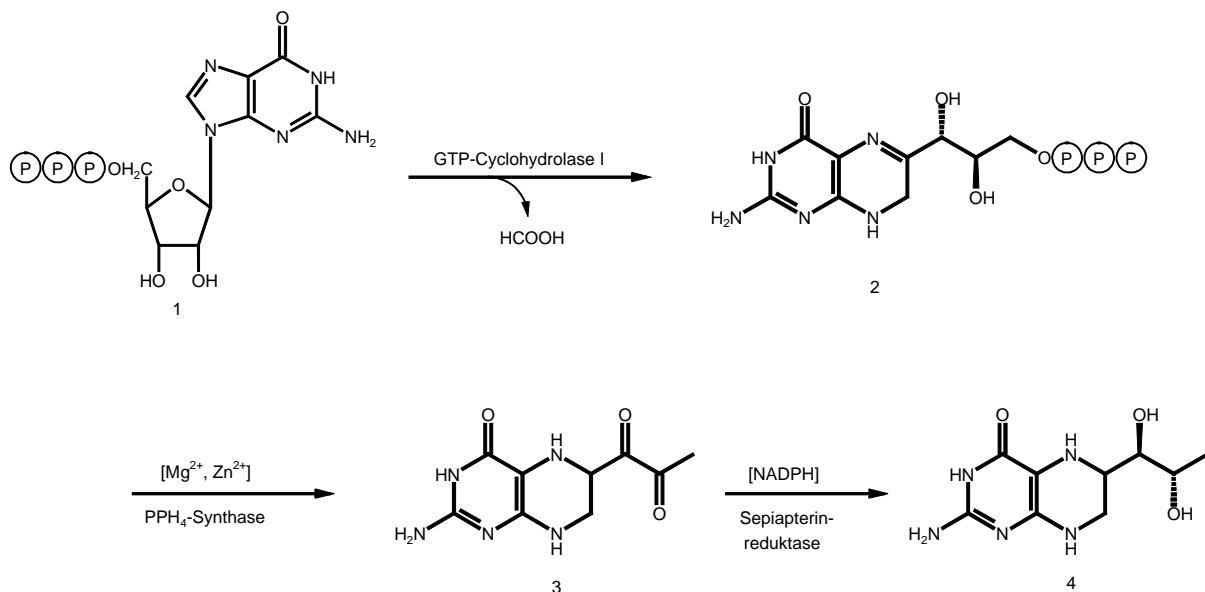


Abb. 1: Biosyntheseweg von Tetrahydrobiopterin. 1) Guanosintri-phosphat, 2) Dihydro-neopterintriphosphat, 3) 6-Pyruvoyltetrahydrobiopterin, 4) Tetrahydrobiopterin.

1.2 Die GTP Cyclohydrolase I

Die GTP Cyclohydrolase I katalysiert die Umsetzung von GTP zu Dihydroneopterintriphosphat. Diese Reaktion stellt den ersten Schritt in der Biosynthese von Tetrahydrobiopterin und Tetrahydrofolat dar.

Weygand und Simon (1961) konnten mit Hilfe von Markierungsexperimenten nachweisen, dass sich das Pteringerüst von GTP ableiten lässt. GTP (1) wird zuerst reversibel an C-8 hydratisiert (Shiman *et al.*, 1985) (Abb. 2). Die darauffolgende Öffnung des Imidazolrings erfolgt über eine Imin-Zwischenstufe. Dabei wird 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat (5) gebildet, welches durch NMR-spektroskopische Messungen nachgewiesen werden konnte (Bracher *et al.*, 1999). Im weiteren Reaktionsverlauf entsteht durch die Abspaltung des Kohlenstoffatoms 8 als Formiat 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat (6). Schramek (2001) konnte zeigen, dass Zink sowohl für die Öffnung des Imidazolrings als auch zur anschließenden Formiatabspaltung notwendig ist. Durch die Amadori-Umlagerung, die bereits von Weygand und Simon postuliert und von Wolf und Brown (1969) indirekt bestätigt werden konnte, bildet sich Zwischenprodukt 7. Bracher (1998) konnte nachweisen, dass bei der Amadori-Umlagerung eine kurzlebige Enolzwischenstufe gebildet wird, die durch stereospezifische Protonierung auf der *re*-Seite in das Zwischenprodukt 7 übergeht. Eine intermolekulare Schiffbasekondensation der 2'-Carbonylgruppe mit der 5-Aminofunktion führt zu NH₂TP (2).

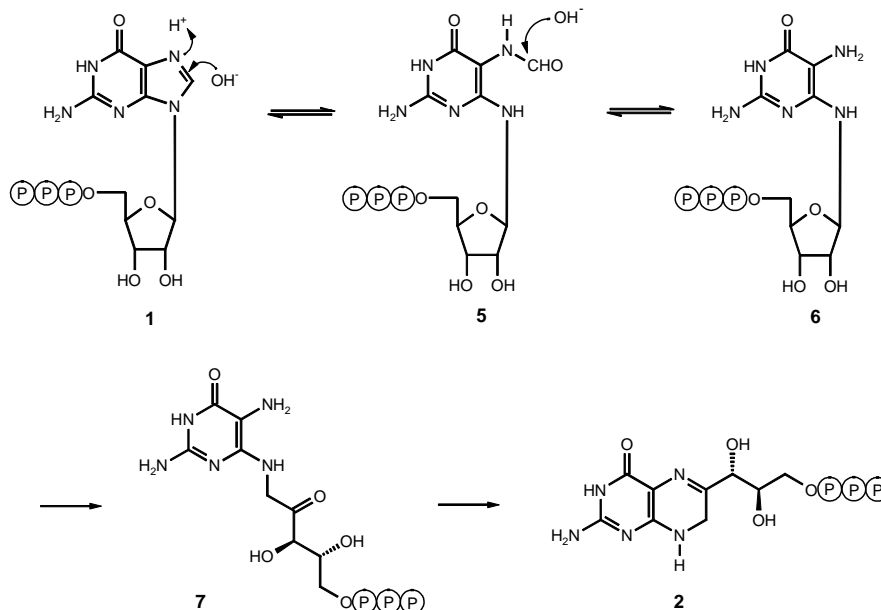


Abb. 2: Postulierter Mechanismus der GTP Cyclohydrolase I.

Die Kristallstruktur der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* wurde 1995 von Nar *et al.* gelöst, während die Struktur der humanen GTP Cyclohydrolase I von Auerbach *et al.* 2000 aufgeklärt werden konnte. Nachdem bei der humanen GTP Cyclohydrolase I im aktiven Zentrum ein Zink gefunden wurde, konnte dies auch für das *E. coli* Enzym bestätigt werden (Auerbach *et al.*, 2000). Zehn 24,7 kDa große Monomere bilden torusförmige Dekamere mit D₅-Symmetrie. Zwei GTP Cyclohydrolase I Monomere assoziieren zu einem Dimer, das durch Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken stabilisiert wird. Das Dekamer entsteht durch symmetrische Zusammenlagerung von fünf Dimeren. Die Lage des aktiven Zentrums konnte durch die Bestimmung der Struktur der GTP Cyclohydrolase I in Gegenwart des substratanalogen dGTP identifiziert werden (Nar *et al.*, 1995). Die zehn aktiven Zentren liegen jeweils in einer 1 nm tiefen Tasche, die die Kontaktstelle von drei Untereinheiten(^{*},⁺,[§]), zwei von Pentamer A und eins von Pentamer B, darstellt. Sie bestehen aus den Aminosäureresten 110-113, 150-153 und 179-185 von A^{*}, 57-89 und 131-139 von A⁺ und R65 und K68 von B[§].

Um die Funktionen der Aminosäurereste im aktiven Zentrum zu untersuchen, wurden von M. Fischer (1997) zahlreiche gezielte Punktmutanten in das Gen der GTP Cyclohydrolase I von *E. coli* eingeführt. Die Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften der mutierten Enzyme wurde von A. Bracher (1998) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass einzelne Mutanten in der Lage sind, das Intermediat 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat (6) anzureichern. Zu diesen Mutanten zählen E111A, E111D, E111Q, R185A, V182M und S135A.

In der Komplexstruktur der GTP Cyclohydrolase I mit dem Substratanalogen dGTP (Abb. 3) bildet Serin 135 Wasserstoffbrücken zum γ -Phosphat und zur 3'-OH-Funktion von dGTP. Die Guanidiniumfunktion von Arginin 185 bildet eine Salzbrücke mit dem γ -Phosphat. Den Hauptteil des aktiven Zentrums bilden drei Loop-Segmente einer Untereinheit. Diese Schleifen werden von einer Salzbrücke zwischen Glutamat 111 und Arginin 153 stabilisiert. Valin 182 ist ebenfalls Teil der Tasche, die das aktive Zentrum darstellt.

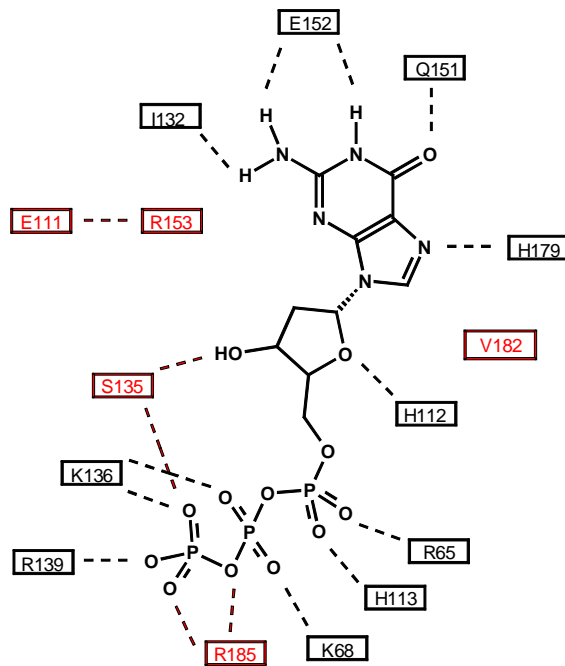


Abb. 3: Schematische Darstellung der Komplexstruktur von GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* mit dem Inhibitor dGTP (Nar, 1995). Rot unterlegt sind diejenigen Aminosäuren, die beim Austausch 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-triphosphat anreichern.

Das postulierte Zwischenprodukt 6 (Abb. 2) ist das Triphosphathomologe des Produktes der GTP Cyclohydrolase II (8) (Abb. 6). Die GTP Cyclohydrolase II katalysiert den ersten Schritt in der Biosynthese von Riboflavin. Dabei wird GTP zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-monophosphat unter Freisetzung von Formiat und Pyrophosphat umgesetzt (Foor und Brown, 1975, 1980). Eine von Richter (1993) chemisch erzeugte *E.coli*-Mutante *Rib7* hat einen Defekt im Gen für die GTP Cyclohydrolase II, damit ist der erste Schritt der Biosynthese von Riboflavin gestoppt. Die *E.coli*-Mutante wächst deshalb nicht ohne externe Zufuhr von Riboflavin. Das postulierte Zwischenprodukt 6 der GTP Cyclohydrolase I unterscheidet sich vom Produkt der GTP Cyclohydrolase II nur durch die Phosphatseitenkette. Dieser Umstand kann zum *in vivo* Nachweis des Intermediats 6 ausgenutzt werden, da eine mutierte GTP Cyclohydrolase I, die dieses Zwischenprodukt 6 anreichert, den Defekt des *Rib7*-Stammes prototrophieren kann. Ein Wachstum des *Rib7*-Stammes, der mit einer mutierten GTP Cyclohydrolase I transformiert wurde – auf Medium ohne Zusatz von Riboflavin –, würde dann auf die Anreicherung des Zwischenproduktes deuten.

Die einzelnen Mutanten wurden kombiniert, um eine erhöhte Anreicherung des Zwischenproduktes 6 zu erzielen. Die Doppelmutante E111Q/V182M zeigt im *in vivo* Test das beste Ergebnis (Schiffmann 1998).

1.3 Das GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein

Das GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein (GFRP) aus Ratte wurde 1993 von Harada *et al.* entdeckt. Sie stellte fest, dass die Aktivität der GTP Cyclohydrolase I, die den ersten Schritt in der Biosynthese von BH_4 katalysiert, durch GFRP reguliert wird. GFRP vermittelt eine Feedbackinhibierung der GTP Cyclohydrolase I Aktivität durch BH_4 . Der inhibierende Komplex zwischen GTP Cyclohydrolase I / GFRP / BH_4 bildet sich nur in Anwesenheit von GTP, dem Substrat der GTP Cyclohydrolase I. Die Inhibierung der Enzymaktivität durch BH_4 und GFRP wird durch Phenylalanin aufgehoben (Abb. 4). Phenylalanin wird von der Phenylalaninhydroxylase, deren Kofaktor BH_4 ist, zu Tyrosin hydroxyliert. Diese Kontrollmechanismen gewährleisten, dass BH_4 nicht unnötig gebildet wird, wenn der Phenylalaninspiegel niedrig ist, während gleichzeitig der BH_4 -Level angehoben wird, wenn die Phenylalaninkonzentration hoch ist (Abb. 5).

Yoneyama schlug 1998 eine Sandwichstruktur für den Komplex aus GFRP und GTP Cyclohydrolase I vor (Yoneyama *et al.*, 1998). Maita konnte die Sandwichstruktur des aktivierenden Komplexes bestehend aus Phenylalanin, GFRP und GTP Cyclohydrolase I aus Ratte durch Röntgenstrukturanalyse bestätigen (Maita *et al.*, 2002).

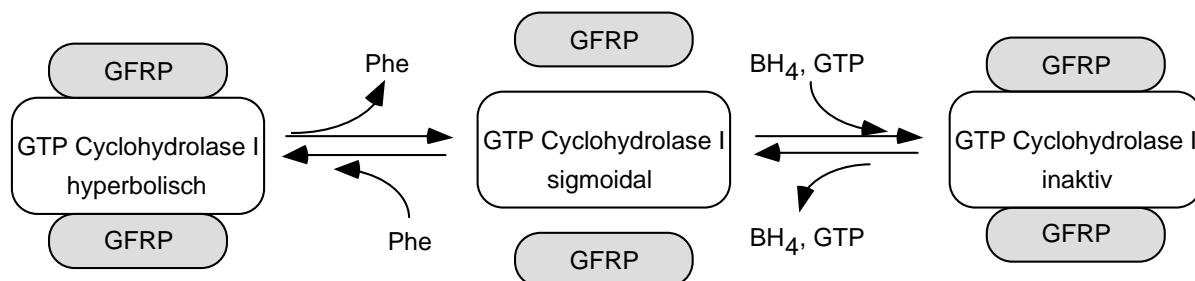


Abb. 4: Modell für die GFRP vermittelte Regulation der GTP Cyclohydrolase I (Yoneyama *et al.*, 1997).

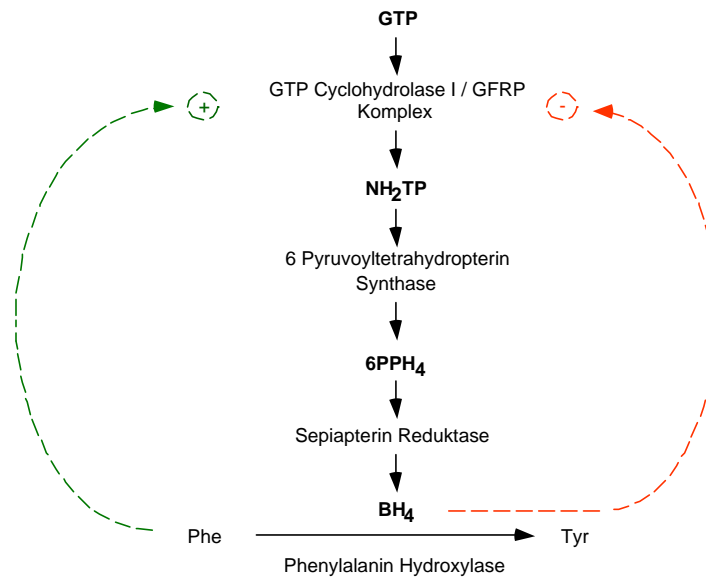


Abb. 5: Regulierung des Phenylalaninspiegels mittels GFRP und GTP Cyclohydrolase I.

Das GFRP wurde in Leber und Hirn von Mensch und Ratte gefunden, kloniert, exprimiert und charakterisiert (Milstien *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 1993). Durch *in situ* Hybridisierungstests konnte gezeigt werden, dass GFRP zwar in Serotoninneuronen des dorsalen Raphs Kerns vorkommt, aber nicht in den Dopaminneuronen des Mittelhirns oder der Norepinephrinneuronen des locus Ceruleus. Die Zirbeldrüse und das Nebennierenmark produzieren zwar GTP Cyclohydrolase I, eine GFRP mRNA war jedoch nicht detektierbar (Kapatos *et al.*, 1999).

Mittels Gelfiltration, analytischer Ultrazentrifugation und Crosslink-Experimenten mit Dimethylsuperimidat fanden Mitarbeiter von Yoneyama (Yoneyama *et al.*, 1997, 1998) eine pentamere Struktur für das GFRP aus Ratte. Eine Untereinheit besteht aus 84 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 9,5 kDa. Bislang sind die Sequenzen des GFRP's aus Ratte, Maus und Mensch bekannt. Sie sind zu 84 % homolog.

1.4 Die Biosynthese von Riboflavin

Riboflavin ist durch seine Koenzymformen FMN (Flavinmononukleotid) und FAD (Flavinadeninindinukleotid) an vielen elektronenübertragenden Prozessen beteiligt (Müller 1992). Eine große Anzahl von Redoxenzymen wie z. B. die Acyl-CoA-Dehydrogenase der β -Oxidation, die NADH-Dehydrogenase der Atmungskette, die Succinat-Dehydrogenase des Citratzykluses oder die Monoaminoxidasen der Flavoproteine sind auf die Koenzymformen des Riboflavins angewiesen. Die DNA-Photoreparatur (Sancar 1994), die Biolumineszenz (Lee *et al.*, 1985, 1991; Meighen 1991, 1993; O’Kane *et al.*, 1992) und Blaulichtrezeptoren (Briggs *et al.*, 1999) sind ebenfalls flavinabhängig.

Zur Riboflavinbiosynthese sind nur Pflanzen und Mikroorganismen fähig. Vertebraten sind auf die Zufuhr von Riboflavin (Vitamin B₂) über die Nahrung angewiesen (Müller *et al.*, 1988), weshalb der Biosyntheseweg des Riboflavins ein geeigneter Ansatzpunkt zur Entwicklung von neuen Antibiotika ist. Ein Mangel an Riboflavin führt bei Menschen unter anderem zu Stomatitis, Dermatitis und hypochromer Anämie (Foy *et al.*, 1977).

Die Biosynthese von Riboflavin wurde detailliert in Bakterien und Pilzen untersucht (Bacher *et al.*, 1996, 2000, 2001). Die GTP Cyclohydrolase II katalysiert einen der beiden Eingangsschritte der Riboflavinbiosynthese (Abb. 6). Sie setzt GTP (1) zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-monophosphat (8) um (Bacher *et al.*, 1973, 1976; Baugh *et al.*, 1969; Foor *et al.*, 1975, 1980; LeVan *et al.*, 1985; Plaut, 1971). Das Produkt der GTP Cyclohydrolase II wird durch die Desaminase/Reduktase zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (11) umgesetzt. Die Reihenfolge der beiden Reaktionen hängt vom jeweiligen Organismus ab. Während Prokaryoten zuerst den Pyrimidinring desaminieren und dann die Ribosylseitenkette (Burrows *et al.*, 1978) reduzieren, findet in Pilzen die Reduktion des Zuckers vor der Desaminierung statt (Bacher *et al.*, 1970; Nielsen *et al.*, 1981). Die Reihenfolge in Pflanzen und in Archaea ist derzeit noch nicht bekannt.

Das Produkt der Desaminase/Reduktase-Reaktion wird vermutlich von einer unspezifischen Phosphatase hydrolysiert (Harzer *et al.*, 1978), bevor es von der Lumazin Synthase mit einer C₄-Einheit zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (15) kondensiert wird (Neuberger *et al.*, 1986; Volk *et al.*, 1988; Kis *et al.*, 1995).

Lange Zeit bestand Unklarheit über diese C₄-Einheit. Durch den Einbau ¹³C-markierter Vorstufen in wachsende Kulturen von *Ashbya gossypii* konnte gezeigt werden, dass die C₄-Einheit regiospezifisch in Lumazin eingebaut wird (Bacher *et al.*, 1982, 1983, 1983a und

1985; Floss *et al.*, 1983; Keller *et al.*, 1983 und 1983a). Symmetrische Moleküle konnten so ausgeschlossen werden. Aus dem ähnlichen Markierungsmuster der C₄-Einheit im Lumazin und der Ribitylseitenkette wurde gefolgert, dass der C₄-Körper ein Metabolit des Pentosephosphatweges ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass Ribulose-5-phosphat ein direkter Vorläufer der C₄-Einheit ist (Volk *et al.*, 1988, 1990). Volk und Bacher konnten 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (14) (DHBP) als den C₄-Körper identifizieren. Das Enzym, das die Umsetzung von Ribulose-5-phosphat zu DHBP katalysiert, ist die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (DS).

Die DS und die GTP Cyclohydrolase II katalysieren die beiden Eingangsschritte in der Biosynthese von Riboflavin. Im *B. subtilis* werden die beiden Enzyme in einem bifunktionellen Polypeptid zusammengefasst, während im *E. coli* zwei monofunktionelle Enzyme exprimiert werden. (Richter *et al.*, 1992).

Im letzten Schritt der Riboflavinbiosynthese erfolgt die Bildung von 7,8-Dimethyl-10(D-1-ribityl)-isoalloxazin (16) (Riboflavin) aus zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Diese Dismutasereaktion wird von der Riboflavin Synthase katalysiert. Das zusätzlich entstehende 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(*1H,3H*)-pyrimidindion wird in den Biosyntheseweg zurückgeführt (Harvey *et al.*, 1966; Plaut 1960, 1963, 1970; Plaut *et al.*, 1971; Wacker *et al.* 1964). Die Flavokinase katalysiert die Reaktion von Riboflavin zu FMN, welches die FAD-Synthetase zu FAD umsetzt (Bacher *et al.*, 1991).

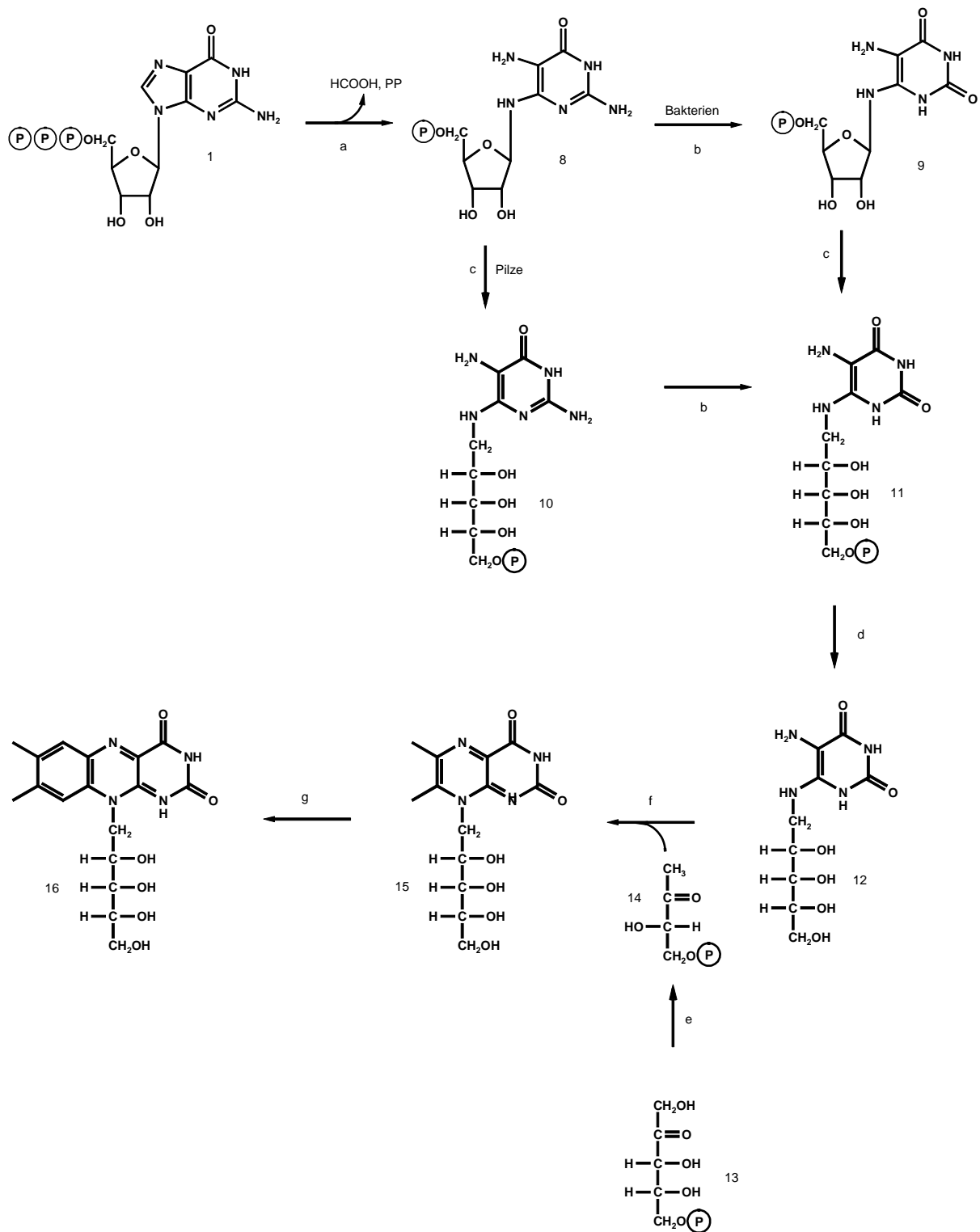


Abb. 6: Biosynthese von Riboflavin. 1) Guanosintriphosphat, 8) 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat, 11) 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat, 12) 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion, 14) 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat, 15) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, 16) Riboflavin; a) GTP Cyclohydrolase II, b) Pyrimidindesaminase, c) Pyrimidinreduktase, d) Phosphatase, e) 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase, f) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase, g) Riboflavin Synthase.

1.5 Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (DS) katalysiert die Umsetzung von Ribulose-5-phosphat zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat. Das Gen für die DS aus *E. coli* wurde von Richter *et al.* (1992) kloniert und exprimiert. Die DS benötigt wie die GTP Cyclohydrolase II Mg^{2+} als Kofaktor und liegt in ihrer nativen Form als Dimer mit einer Masse von 46 kDa vor (Richter 1995). Die spezifische Aktivität beträgt $47 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Richter *et al.*, 1997). Die Struktur der DS aus *E. coli* und *M. grisea* konnte von Liao *et al.* 2001 bzw. 2002 aufgeklärt werden.

Der erste Schritt des hypothetischen Reaktionsmechanismus (Abb. 7) stellt die Bildung des Endiolintermediates (17) dar. Durch die Eliminierung von Wasser entsteht das Enol (18), das durch Tautomerisierung in das Methyldiketon (19) umgewandelt wird. Das verzweigte Intermediat (20) wird durch eine sigmatrope Umlagerung der Phosphormethylengruppe gebildet. Die Eliminierung des Formiats und die Keto-Enol-Tautomerisierung des resultierenden Endiols (22) - unter Aufnahme eines Protons - beenden die Reaktion.

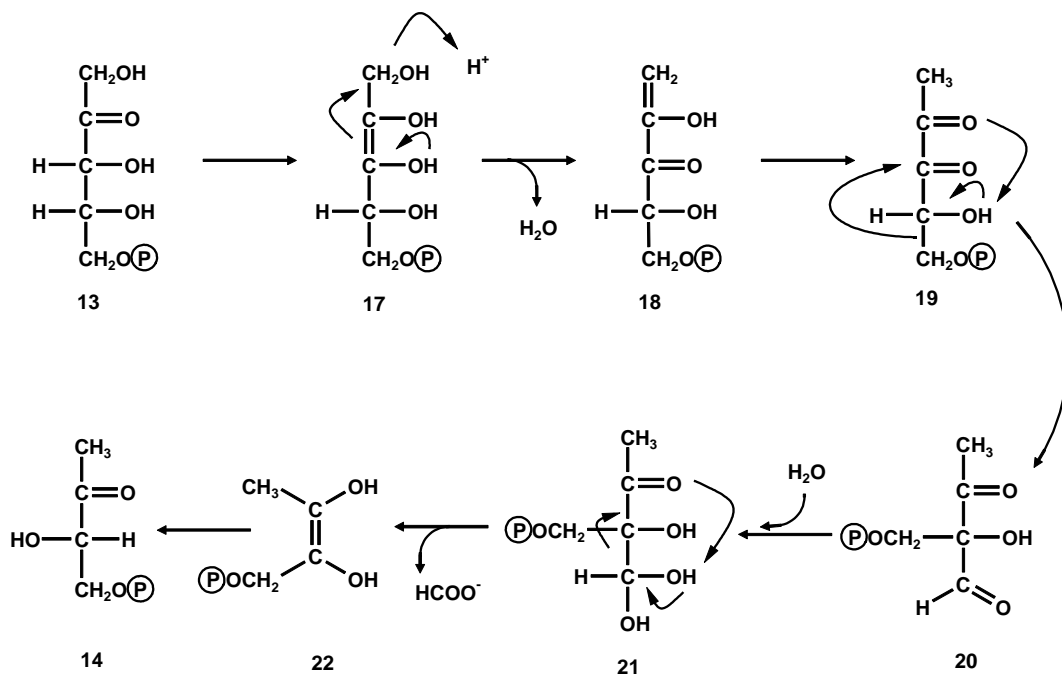


Abb. 7: Postulierter Mechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.

Der Reaktionsmechanismus der DS wurde mittels ¹³C-markierter Ribulose-5-phosphat untersucht (Volk *et al.*, 1988, 1990, 1991). Durch diese Markierungsexperimente konnte bestätigt werden, dass C-4 und das daran gebundene Proton von Ribulose-5-phosphat als Formiat eliminiert wird. Das Proton an C-3 sowie ein Proton der Methylgruppe stammen vom

Lösungsmittel. Vor kurzem konnte die Stereochemie der Umlagerungsreaktion aufgeklärt werden (Götze *et al.*, 1998). Stereospezifisch markierte 5- $[^2\text{H}_1]$ Ribulose-5-phosphat wurde enzymatisch zu DHBP umgesetzt. Es wurde festgestellt, dass die Umlagerung unter Retention an C-4 erfolgt, was einer 1,2-sigmatropen Umlagerung entspricht (Woodward *et al.*, 1970).

1.6 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Regulatorprotein aus Ratte gereinigt werden, um die Kristallstruktur des GFRP zu lösen. Für die humane GTP Cyclohydrolase I sollte eine effizientere Reinigungsstrategie entwickelt werden, um sie für Komplexstudien mit dem GFRP einsetzen zu können. Durch gerichtete Mutagenese sollten Punktmutanten der humanen GTP Cyclohydrolase I und des GFRP aus Ratte generiert werden, um damit den Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf den Komplex bestimmen zu können. Durch die Klonierung eines Fusionsproteins sollte die Ausrichtung des GFRP bei der Bindung an die GTP Cyclohydrolase I bestimmt werden. Des Weiteren sollte das humane GFRP kloniert, gereinigt und hinsichtlich seiner Komplexbildungseigenschaften untersucht werden. Die Ermittlung der Sequenz des GFRP von *G. gallus* und die Konstruktion einer DNA-Sonde für *in situ* Hybridisation war ebenso Ziel der Arbeit.

Zudem sollte durch Zufallsmutagenese Mutanten der GTP Cyclohydrolase I generiert werden, die 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat anreichern.

Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii* sollte exprimiert, gereinigt und charakterisiert werden. Zur Charakterisierung sollte zuerst die Kristallstruktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase gelöst werden. Die konservierten Aminosäuren des aus den Strukturdaten abgeleiteten aktiven Zentrums, sollten durch Mutationsanalyse eingehender untersucht werden. Die kinetischen Daten der mutierten Proteine sollte einen tieferen Einblick in den Reaktionsmechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase liefern.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

Analysenfeinwaage:

1602 MP, Sartorius (Göttingen)

Brutschrank:

Psychrotherm, New Brunswick Scientific Corp. (New Brunswick, N.J., USA)

CD-Spektrometer:

J715, JASCO, Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt)

DNA-Fluorimeter:

TKO 100, Hoefer Scientific Instr. (San Francisco/USA)

Elektroporator:

Gene Pulse mit Pulse Controller, Biorad (München)

FPLC-Anlage:

LKB, GP10, Pharmacia (Freiburg)

Gelelektrophorese:

Mighty Small II, Hoefer Scientific (San Francisco, USA)

Mini Cuve 8.1, Appligene (Heidelberg)

Spannungsquelle LKB-GPS 200/400, Pharmacia (Freiburg)

Hochdrucksterilisator:

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

PCR-Gerät:

Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut, USA)

pH-Meter:

WTW pH 521 (WTW, Weilheim) mit Standard-Glaselektrode, Deutsche Metrohm (Filderstadt)

Proteinreinigungsanlage:

Gradi Frac Fraktionssammler, Pharmacia (Freiburg)

Monitor UV-1 optische Einheit, Pharmacia (Freiburg)

Monitor UV-1 Kontrolleinheit, Pharmacia (Freiburg)

Schlauchpumpe P-1, Pharmacia (Freiburg)

Mischer 0,6 ml, Pharmacia (Freiburg)

Injektionsventil IV-7, Pharmacia (Freiburg)

Gradientenventil PSV-50, Pharmacia (Freiburg)

Schreiber REC 102, Pharmacia (Freiburg)

Rührzellen:

Amicon, Millipore Corporation (Bedford, USA),

Membranen von Pall Filtron (UK)

Schlauchpumpe:

Watson Marlow 502S, Petrogas (Berlin)

Schütteltisch:

IKA-Vibrax-VXR, IKA-Labortechnik (Staufen i. Br.)

Schüttelinkubator:

Innova 4230, Refrigerated incubator shaker, New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)

Sequenzieranlage:

PrismTM 377 DNA Sequenzer, Perkin Elmer Applied Biosystems Inc. (Weiterstadt)

Spektralphotometer:

UV-VIS-Spektrometer Ultraspec Plus, Pharmacia (Freiburg) mit Quarzküvetten von Helma/Mühlheim (Baden) zur Messung der Proteinkonzentration bei 280 nm

Spektralphotometer Novaspec II, Pharmacia (Freiburg) zur OD₆₀₀-Messung und der Bradfordbestimmung mit 1/2 Mikro-Plastikküvetten (ratiolab)

Thermoblock:

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

TRFA-Gerät:

Atomica (Oberschleißheim)

UV-Leuchttisch:

203 nm, Bachhofer (Reutlingen)

Ultraschallgerät:

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

Ultrazentrifuge:

LE70 mit den Festwinkelrotoren 70Ti und 70.1Ti, Beckman (Fullerton, USA)

Optima XL-A, Beckmann (Fullerton, USA)

Vakuumpumpe:

MZ 2C, VAKUUBRAND GmbH + Co (Wertheim)

zum Filtrieren und Entgasen der Eluenten für die Säulenchromatographie

Videodokumentation:

LTF Labortechnik (Wasserburg)

Wasserbad:

Häberle Labortechnik (Lonsee-Ettlenschieß)

Weißlichtleuchttisch:

Rex, Rex Messinstrumente (Erlangen)

Whirlmixer:

REAX 2000 (Heidolph)

Zentrifugen:

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

Eppendorfkühlzentrifuge Z 382 K, Hermle (Gosheim)

Kühlzentrifuge Sorvall Superspeed RC2B und RC5B mit den Rotoren GS-3 und SS-34, DuPont Instruments (Bad Homburg)

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

2.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien:

Biomol (Hamburg)

Europa Bioproducts Ltd (Cambridge, UK)

Gibco BRL (Eggenstein)

Fluka Feinchemikalien (Neu-Ulm)

Merck (Darmstadt)

Roth (Karlsruhe)

Serva Feinbiochemika (Heidelberg)

Sigma-Chemie (Deisenhofen)

Schircks (Jona/Schweiz) lieferte die Pterine

Enzyme:

Restriktionsendonukleasen:	New England Biolabs (Schwalbach) Pharmacia (Freiburg)
DNA-Polymerasen:	DyNAzyme EXT (Finnzymes, SF), Cgra Taq [®]
T4-DNA-Ligase:	Gibco BRL (Eggenstein)

Enzyme wurden in 50% (v/v) Glycerin bei -20°C aufbewahrt.

Molekularbiologische Kits:

Gel Extraction Kit, peqlab (Erlangen)
Cycle-Pure Kit, peqlab (Erlangen)

DNA-Leiter:

peqGOLD-Leiter-Mix, peqlab (Erlangen)

Oligonukleotide:

Thermo Hybaid, Interactiva Division (Ulm)
MWG Biotech (Ebersberg)

Protein-Marker:

Dalton-Mark VII-L, Sigma (Deisenhofen)
MultiMark[™], Novex (San Diego)

2.3 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden *E. coli*-Stämme mit den angegebenen Genotypen verwendet.

Stamm	Genotyp	Literatur
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F', proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(tet^r)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
XL1-Red	<i>EndA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, mutD5, mutS, mutT, Tn10(tet^r)^a</i>	Greener <i>et al.</i> , 1996
M15[pREP4]:	<i>lac, ara, gal, mtl, recA⁺, uvr⁺, [pREP4: lacI, kan^r]</i>	Zamenhof <i>et al.</i> , 1972
M15[pGB3]	<i>lac, ara, gal, mtl, recA⁺, uvr⁺, [pGB3: lacI, amp^r]</i>	Zamenhof <i>et al.</i> , 1972
<i>Rib5</i>	<i>F, thi, pro, lac, ara, gal, mtl, xyl, supE44, endA, hsd(r⁻, m⁻), pheS, recA, ribB (DS)</i>	Richter <i>et al.</i> , 1993
<i>Rib7</i>	<i>F, thi, pro, lac, ara, gal, mtl, xyl, supE44, endA, hsd(r⁻, m⁻), pheS, recA, ribA (CYH II)</i>	Richter <i>et al.</i> , 1993

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme.

2.4 Expressionsvektor

Die verwendeten Expressionsvektoren pNCO113 und p602/-CAT standen am Lehrstuhl zur Verfügung und sind in den Arbeiten von Stüber *et al.* (1990) und Fischer (1997) beschrieben. Der Vektor pBlueskript-SK stammte von Stratagene.

2.5 Molekularbiologische Methoden

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

Plasmid-DNA kann je nach Qualitätsanspruch auf zwei Arten gewonnen werden. Während die Schnellmethode DNA geringerer Qualität liefert, die aber für analytische Zwecke (z. B. Restriktionsverdau) ausreichend ist, liefert die DNA-Präparation mit Säulen von Macherey-Nagel (Düren) bzw. peqlab (Erlangen) extrem saubere DNA, die sich für die präparative Anwendung eignet.

2.5.1.1 Schnellisolierung mit Hitzeschock

Für die Schnellisolierung von Plasmid-DNA wurde die Methode von Holmes und Quigley (1981) in abgewandelter Form verwendet. Bei high-copy Plasmiden konnten dabei bis zu 10 µg saubere Plasmid-DNA gewonnen werden. Durch Verwendung von 1 % Triton X 100 anstelle von 1 % SDS konnte die Lagerstabilität des STET-Puffers erhöht werden.

5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika wurden mit dem plasmidhaltigen *E. coli*-Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bebrütet. Das Zellmaterial wurde am nächsten Tag zentrifugiert (4.000 U/min, 8 min, RT) und das Pellet in 300 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozymbilösung (10 mg/ml entionisiertem Wasser) wurde 30 sec bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 90 sec im Wasserbad gekocht. Unlösliche Zellbestandteile, Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (15.000 U/min, 15 min, RT) entfernt. Der DNA-haltige Überstand wurde abdekantiert und mit 200 µl Isopropanol die DNA ausgefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert (15.000 U/min, 15 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, zweimal mit je 170 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

STET-Puffer:

- 50 mM Tris/HCl pH 8
- 10 mM EDTA
- 8 % (w/v) Saccharose
- 5 % (w/v) Triton X-100

2.5.1.2 Plasmidisolierung mittels modifizierter Alkali/SDS-Methode

Mit dieser Methode (Birnboim und Doly, 1979) konnten größere DNA-Mengen - bis zu 150 µg - isoliert werden. Die erhaltene DNA war deutlich sauberer als die der Minipräparation und konnte ohne weitere Reinigungsschritte zur DNA-Sequenzierung eingesetzt werden.

Das zentrifugierte Zellmaterial aus 150 ml Übernacht-Kultur wurde in 5 ml S1-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 5 ml S2-Puffer und vorsichtigem Mischen wurde die Probe für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 ml S3-Puffer zugesetzt und die Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Zelltrümmer und Proteine wurden durch Zentrifugation (14.000 U/min, 30 min, 4 °C) entfernt. Der verbliebene Überstand wurde auf eine, mit 3 ml N2-Puffer equilibrierte, Anionenaustauschsäule Nucleobond AX100 (Macherey-Nagel) gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 2 ml N3-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 3 ml N5-Puffer eluiert, unter Zusatz von 2 ml Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (13.000 U/min, 20 min, 19 °C). Nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge wurde die DNA in 100-200 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

S1-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8
10 mM EDTA
100 µg Rnase A/ml

S2-Puffer: 200 mM NaOH
1 % SDS

S3-Puffer: 2,8 M Kaliumacetat, pH 5,2

N2-Puffer: 100 mM Tris/Phosphat, pH 6,3
0,9 M KCl
15 % (v/v) Ethanol

N3-Puffer: 100 mM Tris/Phosphat, pH 6,3
1,3 M KCl
15 % (v/v) Ethanol

N5-Puffer: 100 mM Tris/Phosphat, pH 8
1,3 M KCl
15 % (v/v) Ethanol

2.5.1.3 Plasmidisolierung mit dem peqlab-Kit

Das Plasmid wurde mit dem Miniprep Kit I (peqlab, Erlangen) isoliert. Für die Isolierung eines high-copy Plasmids wurden 5 ml einer frischen Übernachtskultur des *E.coli*-Stammes, der das zu isolierende Plasmid trug, 10 min bei 4.000 U/min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl RNase Lösung I (peqlab, Erlangen) resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden 250 µl Lösung II (peqlab, Erlangen) zugegeben und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl Lösung III (peqlab, Erlangen) wurden Zelltrümmer und denaturiertes Protein (14.000 U/min, 10 min, RT) abzentrifugiert. Zur Isolierung des Plasmids aus dem Überstand wurden Reversed Phase Säulen (peqlab, Erlangen) verwendet. Der Überstand wurde auf eine Säule aufgegeben und eine Minute bei 14.000 U/min zentrifugiert. Hierbei bindet die DNA an das Säulenmaterial. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl HB-Puffer (peqlab, Erlangen) beladen und wiederum 1 Minute bei 14.000 U/min zentrifugiert, bevor 750 µl DNA-Waschpuffer (peqlab, Erlangen) aufgegeben und zentrifugiert wurden. Um Reste des Waschpuffers zu entfernen, wurde die Säule bei 14.000 U/min zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 - 50 µl H₂O_{bidest.}

Plasmid-DNA in einer Menge von 2-10 µg konnte so erhalten und zur DNA-Sequenzierung eingesetzt werden.

Plasmid Miniprep Kit I: peqlab (Erlangen, Kat.-Nr. 12-694202)

2.5.2 Reinigung von DNA-Fragmenten

2.5.2.1 Direkte Reinigung von PCR-Fragmenten

Um PCR-Fragmente für Restriktionen oder Ligationen einsetzen zu können, müssen sie in der Regel von Bestandteilen der PCR, wie dNTP's oder Reste von Primern befreit und umgepuffert werden. Restriktionsansätze müssen vor der Ligation ebenfalls gereinigt werden. Die Ansätze wurden mit dem 4-5 fachen an CP-Puffer (peqlab, Erlangen) versetzt und auf die Extraktionssäule gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (14.000 U/min, 1 min, RT). Das Zentrifugat wurde verworfen. In die Säule wurde anschließend 750 µl Waschpuffer (peqlab, Erlangen) gegeben und zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die Säule mit der gewaschenen Membran wurde anschließend in ein neues steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Die Elution der DNA erfolgte mit 10-30µl bidestilliertem Wasser durch Zentrifugation.

Cycle-Pure Kit: peqlab (Erlangen, Kat.-Nr. 12-6493-02)

2.5.2.2 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Restriktions- oder PCR-Ansätze wurden zunächst mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die betreffenden Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, das Gelstück in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit DNA-Bindpuffer (peqlab) bis zur 2 ml Marke aufgefüllt. Nach Aufschmelzen (55 °C, ca. 10 min) des Gelstückes wurde die Lösung auf eine Extraktionssäule (peqlab, Erlangen) aufgegeben. Nach Zentrifugation (14.000 U/min, 1 min, RT) wurde mit 750 µl Waschpuffer (peqlab, Erlangen) gewaschen. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Zentrifugation wiederholt. Die Elution der DNA erfolgte mit 10 – 30 µl bidestilliertem Wasser durch Zentrifugation.

Gel Extraction Kit: peqlab (Erlangen, Kat.-Nr. 12-2501-02)

2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Agarose-Gelsysteme dienen sowohl zur Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten und superhelicalem Plasmid-DNA als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten. Durch Variation der Agarosekonzentration ließen sich Fragmente im Bereich von 60-0.05 kb elektrophoretisch auftrennen. Als Längenstandards wurden DNA-Molekulargewichtsmarker verwendet, deren Fragmentgrößen bekannt sind. Als Molekulargewichtsstandard wurde pGOLD DNA-Leiter für Fragmente zwischen 100 und 10.000 bp verwendet.

Es wurden Gele - abhängig von den zu erwarteten Fragmentgrößen - mit einer Agarosekonzentration von 1-3 % in TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer gekocht und nach Abkühlen auf ca. 60 °C in einen Gelträger gegossen. Die erstarrte Gelmatrix wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen wurden diese mit Probenpuffer (1:10 (v/v)), der zum Beschweren und als Farbmaler diente, versetzt. Der Elektrophoreselauf wurde bei einer konstanten Spannung von 150 V durchgeführt und dauerte je nach Laufstrecke und angelegter Spannung zwischen 30 und 45 min. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese in Ethidiumbromid (1µg/ml Wasser) 15 min unter Lichtausschluss gefärbt, mit entionisiertem Wasser gewaschen und unter UV-Licht (323 nm) dokumentiert. Bei präparativen Ansätzen wurden die betreffenden DNA-Banden mit einem Skalpell auf dem UV-Leuchttisch ausgeschnitten und anschließend gereinigt.

TAE-Puffer (50x): 2,0 M Tris/Acetat pH 8,2
 0,1 M EDTA

**Probenpuffer für Agarose-
gelelektrophorese:** 50 % (v/v) Glycerin
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
 0,25 % (w/v) Xylenblau
 in TE-Puffer gelöst

2.5.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte fluorimetrisch unter Verwendung des Farbstoffes Bisbenzimid H 33258. Das Absorptionsmaximum der Einlagerungsverbindung von DNA und Farbstoff liegt bei 365 nm, das Emissionsmaximum bei 458 nm. Das benutzte Fluorimeter verwendet zur Anregung eine Quecksilberlampe mit einer Bandbreite von 100 nm. Die Emission wird von einem Photomultiplier mit einer Bandbreite von 10 nm gemessen.

Vor jeder DNA-Bestimmung muss das Gerät neu geeicht werden. Dazu wurde zunächst ein Nullwert mit frischer Farbstofflösung (TNE-Puffer mit 0,1 µg/ml Bisbenzimid) bestimmt. Anschließend wurde 2 µl einer Lösung mit bekannter DNA-Konzentration in 2 ml Farbstofflösung gemessen und diese Konzentration am Fluorimeter eingestellt. Nun konnten 2 µl der DNA-Probe unbekannter Konzentration in jeweils 2 ml Farbstofflösung vermessen werden. Das Ergebnis konnte direkt in µg/µl abgelesen werden.

TNE-Puffer (10x): 100 mM Tris/HCl pH 7,4
 10 mM EDTA
 1 M NaCl

2.5.5 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation

2.5.5.1 Kompetente Zellen nach Hanahan

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Methode nach Hanahan (1983) verwendet. Mit dieser Methode konnten Transformationsraten von 10^6 bis 10^7 Kolonien pro µg supercoiled Plasmid-DNA erreicht werden.

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium (mit Antibiotikazusätzen je nach Zelltyp) mit 2 ml Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator (200 U/min) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bebrütet. Nach Zentrifugation (2.300 U/min, 30 min, 4 °C) wird der Rückstand in 100 ml RF1-Puffer aufgenommen. Nach 15 min Inkubation auf

Eis wird erneut zentrifugiert (2.300 U/min, 30 min, 4 °C), der Rückstand in 10 ml RF2-Puffer suspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden in Cryo-Gefäße zu 0,85 ml portioniert und zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

RF1-Puffer: 100 mM KCl
50 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
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 und sterilfiltriert

RF2-Puffer: 10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
15 % (v/v) Glycerin
pH 6,8 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert

2.5.5.2 Transformation mit kompetenten Zellen nach Hanahan

Für die Transformation von Plasmid-DNA werden die gefrorenen kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 200 µl dieser Zellsuspension wurden mit 10-100 pg DNA in einem Volumen von 1-20 µl versetzt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Hitzeschockbehandlung für 90 sec bei 42 °C wurde 2 min auf Eis gekühlt. Vor der Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C wurden 800 µl LB-Medium (ohne Antibiotikazusatz) zugegeben. Danach wurden 20 bzw. 200 µl des Transformationsansatzes auf Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.5.3 Herstellung von elektrokompetenten Zellen

Elektrokompetente Zellen sind nach dem Protokoll von Dower *et al.* (1988) in leicht modifizierter Form hergestellt worden.

Mit 20 ml Vorkultur, die nicht länger als 16 Stunden bei 30 °C inkubiert wurde, wurden 400 ml LB-Medium angeimpft. Sobald die Kultur eine optische Dichte von 0,5-0,7 (bei 600 nm) erreicht hatte, wurde sie 15 min lang auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen in einem auf 4 °C vorgekühlten Sorvall-GS3-Rotor bei 4.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abdekantiert und der Rückstand in 500 ml 10%iger eiskalter, steriler Glycerinlösung resuspendiert. Anschließend wurde zentrifugiert (siehe oben) und der Überstand abdekantiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, wobei 250 ml bzw. 10 ml der obigen Lösung eingesetzt wurden. Zum Schluss wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in einem Volumen von 1 ml 10 %iger eiskalter, steriler Glycerinlösung suspendiert. Die Suspension wurde in Cryo-Gefäßen zu 0,4 ml portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Transformationsrate betrug ca. 10^6 Transformanden/ μ g DNA.

2.5.5.4 Elektroporation elektrokompetenter Zellen

Einstellungen der Elektroporationsapparatur:

Kapazität:	15 μ F
Widerstand:	200 Ω
Spannung:	1,8 kV

40 μ l elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in ein steriles, vorgekühltes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert und mit ca. 10 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 1 μ l versetzt. Dann wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,2 cm), die auf Eis vorgekühlt wurde, überführt. Diese wurde im Küvettenhalter in die Elektroporationskammer geschoben, so dass Kontakt zu den Elektroden bestand. Anschließend wurde ein Puls mit den oben aufgeführten Parametern appliziert, die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium suspendiert und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. 10 bzw. 100 μ l des Transformationsansatzes wurden auf Selektivagarplatten verteilt.

SOC-Medium:	20 g Caseinhydrolysat
	5 g Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

2.5.5.5 Transformation in XL1-Red Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden die gefrorenen kompetenten XL1-Red Zellen auf Eis aufgetaut. 100 µl dieser Zellsuspension wurden mit β-Mercaptoethanol (25mM) versetzt. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis gekühlt und alle zwei min vorsichtig gemischt. Danach wurden ca. 25 ng DNA in einem Volumen von 1-10 µl zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Hitzeschockbehandlung für 45 sec bei 42 °C, wurde 2 min auf Eis gekühlt. Vor der Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C wurden 900 µl auf 42 °C vorgewärmtes SOC-Medium (ohne Antibiotikazusatz) zugegeben. Danach wurde der gesamte Transformationsansatz zu je 200 µl auf Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert

2.5.6 Polymerasekettenreaktion

Die von Mullis *et al.* (1987) entwickelte Methode zur Vervielfältigung von DNA wurde sowohl zur Amplifikation und Mutagenese der Ziel-DNA, als auch zur Analyse vorhandener Klone verwendet.

Für einen präparativen PCR-Ansatz (100 µl) wurden 10 ng Matrizen-DNA, je 100 pmol Primer und 0,75 U Taq-DNA-Polymerase (Cgra Taq[®]) eingesetzt. Zusätzlich wurden 1,5 mM Magnesiumchlorid zugesetzt, da es sich bei der Taq-Polymerase um ein magnesiumabhängiges Enzym handelt.

Folgendes Pipettierschema wurde für den Ansatz verwendet:

10 µl Taq-Puffer
6 µl Mg²⁺ (1,5 mM)
8 µl dNTP`s (je 200 µM)
1 µl Primer I (100 pmol)
1 µl Primer II (100 pmol)
1 µl Matrizen-DNA
1 µl Taq-Polymerase
72 µl H₂O_{bidest}

Die Amplifikation der DNA wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR-System 2400; Perkin Elmer) bei folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

1. 5,0 min bei 95 °C
2. 0,5 min bei 94 °C
3. 0,5 min bei 50 °C
4. 1,0 min bei 72 °C
5. 7,0 min bei 72 °C
6. Abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 30 x wiederholt.

Abweichungen von diesem Programm werden bei den entsprechenden Versuchen gesondert angesprochen.

Für die Randommutagenese wurde das Pipettierschemata verändert. Bei der Erhöhung der einzelnen dNTP Konzentrationen, wurde von den jeweiligen dNTP`s 3,4 µl einer 200µM Stammlösung zusätzlich eingesetzt. Bei Verwendung von Mangan(II)chlorid wurden folgende Kombinationen verwendet:

100 mM MgCl ₂	1,5 µl	2 µl	3,0 µl	4 µl	5,0 µl
10 mM MnCl ₂	5,0 µl	10 µl	7,5 µl	5 µl	2,5 µl

Zur Analytik von Transformanden wurden jeweils 30 µl PCR-Ansätze ohne Matrizen-DNA vorgelegt. In dieser Lösung wurde dann unter Verwendung von sterilen Zahnstochern frisches Zellmaterial, das von den Platten abgenommen wurde, suspendiert. Nach erfolgtem Eintauchen des Zahnstochers in die PCR-Lösung wurden Kopien von den jeweiligen Transformanden (durch Einstechen des Zahnstochers auf einer LB-Platte) angelegt. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

Taq-Puffer: 75 mM Tris/HCl pH 9,0
 20 mM (NH₄)₂SO₄
 0,01 % (w/v) Tween 20
 1,5 mM MgCl₂

2.5.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen mit den mitgelieferten Puffer-10x-Konzentraten durchgeführt.

Die analytische Restriktionsanalyse diente der Überprüfung der eingefügten Mutationen. Dazu wurde im allgemeinen folgender Ansatz verwendet:

2-8 µl DNA (ca. 0,2-1,0 µg DNA)
1,0 µl Puffer (10x)
1,0 µl Enzym (ca. 10 U)
mit H₂O_{bidest} auf 10 µl auffüllen

Die Inkubation erfolgte bei dem vom Hersteller angegebenen Temperaturoptimum für das jeweilige Restriktionsenzym für 60 min.

Präparative Ansätze (10-15 µg DNA) wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt und die Volumina der anderen Lösungen entsprechend erhöht. Die Inkubation erfolgte bei der optimalen Temperatur für 3 Stunden. Die vollständige Spaltung wurde auf einem Agarosegel überprüft. Die Reinigung erfolgt wie unter Punkt 2.5.2.1 beschrieben.

2.5.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase katalysiert die Verknüpfung der DNA-Stücke mit Einzelstrangüberhängen durch die Bildung von Phosphorsäurediesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen (Sagmarella *et al.*, 1979).

Zur Ligation wurden 20 - 100 fmol Plasmid-DNA und ein 2-5 facher molarer Überschuss an Insert-DNA in Wasser vorgelegt. Nach Inkubation im Wasserbad (10 min, 55 °C) und anschließender Eiskühlung (5 min) wurden Ligasepuffer und T4-DNA-Ligase (Gibco-BRL, Eggenstein) zugesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.5.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit markierten Terminatoren und mutagenisierter Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Dabei wurden die Komponenten des „Thermo sequenase dye terminator cycle sequencing pre-mix kit“ (Amersham Life Science, Cleveland, USA) verwendet.

Der Sequenzieransatz enthielt 1 µg Plasmid-DNA, 10 pmol Primer, 1 µl DMSO und 11 µl Terminator PremixTM (dNTP's, markierte ddNTP's und Taq-DNA-Polymerase) in einem Endvolumen von 21 µl. Da die markierten ddNTP's lichtempfindlich sind, sollte möglichst schnell und unter Ausschluss von Licht gearbeitet werden.

Die Reaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

- 25 Zyklen:
1. 30 sec bei 96 °C (Denaturierung der DNA)
 2. 15 sec bei 45 °C (Hybridisierung des Primers)
 3. 4 min bei 60 °C (Amplifizierung der DNA)

Nach Beendigung der Reaktion wurde der Reaktionsansatz in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, in dem 7 µl NH₄OAc (7,5 M) und 68 µl 100 % Ethanol vorgelegt waren. Nach dem Mischen wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (13.500 U/min, 30 min, 19 °C). Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 4 µl DMF-Auftragspuffer aufgenommen. Die DNA wurde durch Erhitzung für 2 min auf 90 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. 1,5 µl dieser Proben wurden dann auf ein 4,75 %iges Polyacrylamid-Sequenziergel

aufgetragen. Zur Erstellung des Sequenziergels wurden 13,3 ml UltraPureSequagel™-Sequencing-System-Diluent vermischt und mit einer Spatelspitze von Amberlite MB-1 entionisiert. Die Suspension wurde anschließend filtriert (0,2 µm Filter) und 7 ml UltraPureSequagel™-Sequencings-System-Puffer zugegeben. Nachdem 10 min unter Wasserstrahl-Vakuum entgast worden war, wurden 210 µl einer 10 %igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 25 µl TEMED zugegeben und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen.

Die Auftrennung der markierten DNA-Fragmente erfolgte in TBE-Puffer über einen Zeitraum von 7 Stunden auf einem Prism™-377-DNA-Sequencer von Perkin-Elmer-ABI (Weiterstadt).

TBE-Puffer (10x):

- 1 M Tris-Base
- 0,85 M Borsäure
- 10 mM EDTA, pH 8,3

2.5.10 Konstruktion von Mutantenplasmide

Die im folgenden beschriebene Mutationsmethode wurde von Fischer (1997) entwickelt. Es wurde das Expressionsplasmid pNCO113 verwendet. Abbildung 8 zeigt die Anordnung der benötigten Primern auf einem Expressionsplasmid.

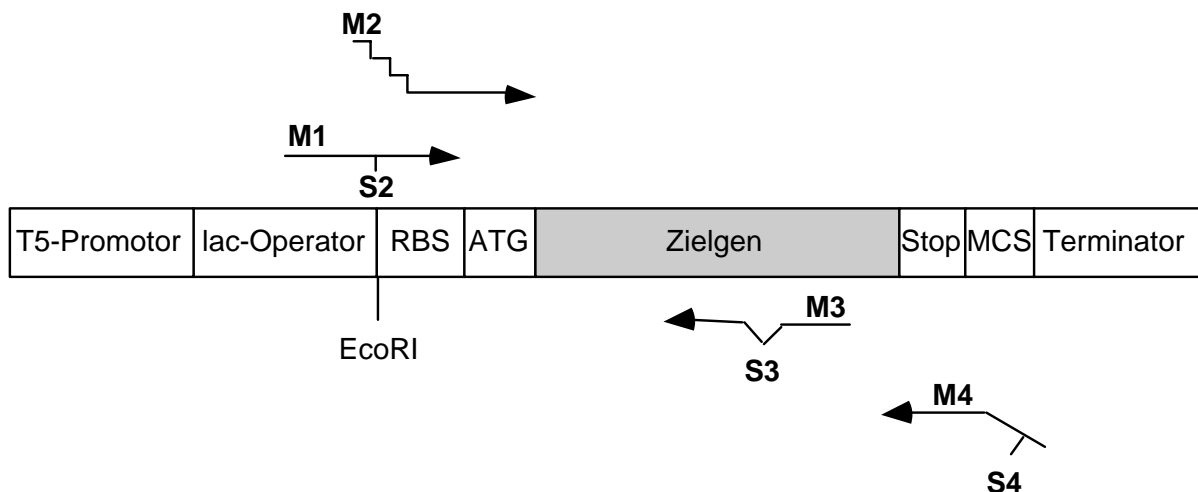
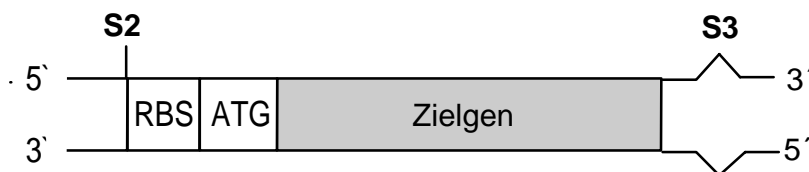


Abb. 8: Anordnung der Primer (**M1-M4**) auf einem *pNCO113* Expressionsplasmid mit dem Zielgen.

Für die Durchführung der Mutagenese sind vier Oligonukleotide, die als 'vorwärts' und 'rückwärts' Primer dienen, notwendig. Die Oligonukleotide **M1**, **M2** und **M4** dienen als Vektorprimer, während das Oligonukleotid **M3** die jeweilige Mutation und eine eigens eingeführte Schnittstelle (aminosäurenkonservativ) für eine Restriktionsendonuklease beinhaltet. Primer **M2** bindet am 3'-Ende an einen Teil der ribosomalen Bindungsstelle und enthält am 5'-Ende einen nicht bindenden Sequenzabschnitt zur Deletion der *EcoR* I-Schnittstelle. Primer **M1** bindet im Bereich der *EcoR* I-Schnittstelle (**S2**) im Expressionsvektor und lässt diese Erkennungssequenz unberührt. Primer **M4** (genspezifisch) führt eine Klonierungsschnittstelle (**S4**) (*BamH* I) in das PCR-Fragment ein. Abbildung 9 zeigt schematisch die Vorgehensweise bei der gerichteten Mutagenese.

1. PCR :dNTP's; Primer **M1/M3** und **M2/M4**; Ziel-DNA auf der Basis des oben genannten Expressionsvektors; Taq-Polymerase.

M1/M3 (Fragment A)



M2/M4 (Fragment B)



Abb. 9: 1. PCR zur Einführung einer Mutation. Im ersten Schritt der gerichteten Mutagenese werden zuerst zwei getrennte PCR-Ansätze, mit den Primerpaarungen **M1/M3** und **M2/M4** und dem oben beschriebenen Expressionsplasmid als Matrize, durchgeführt.

Die Primerkombination **M1/M3** führt eine Mutation in das Zielgen ein, während das Primerpaar **M2/M4** lediglich das gesamte Zielgen unmutiert amplifiziert. Das gebildete Fragment verfügt über *keine* Klonierungsschnittstelle am 5'-Ende, so dass es nicht in den Vektor ligiert werden kann. Nach erfolgter Amplifikation wurden die PCR-Ansätze über Agarosegelelektrophorese und mit dem Gel Extraktion Kit (peqlab, Erlangen) gereinigt, wobei die betreffende DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten, das Agarosegel im Wasserbad bei 55 °C aufgeschmolzen und 5 µl davon direkt zur 2. PCR eingesetzt wurde.

2. PCR: dNTP's; Fragmente der 1. PCR; Taq-Polymerase

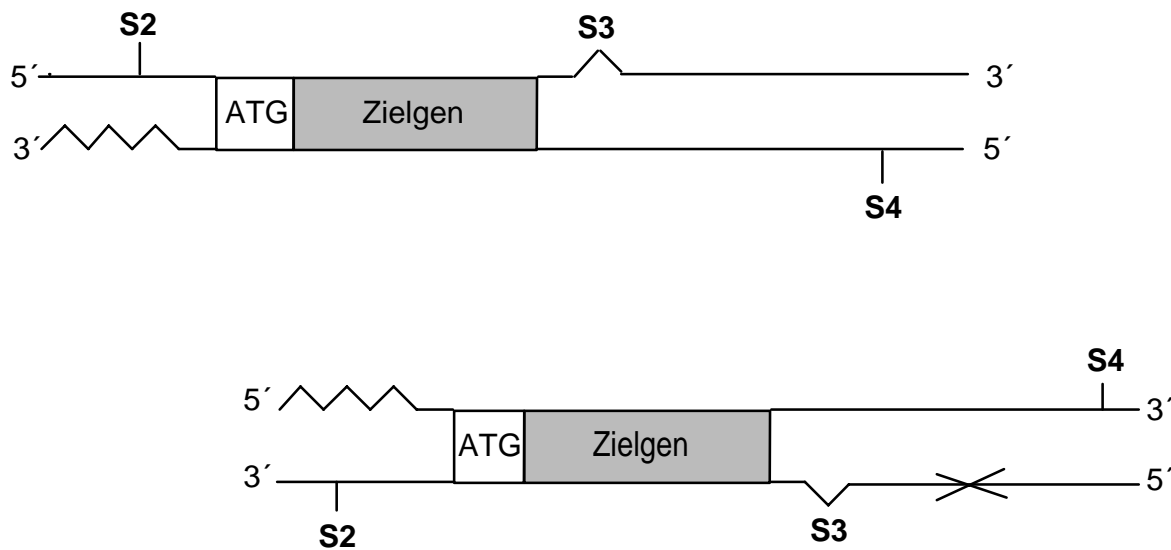


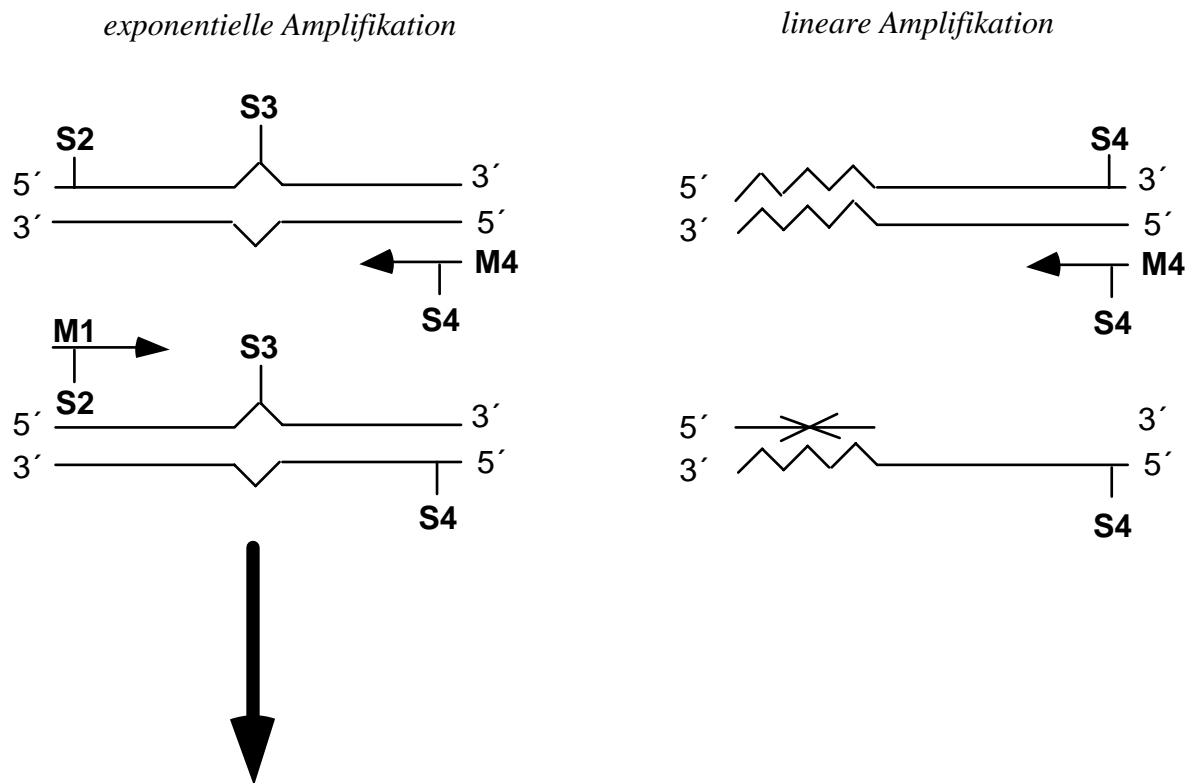
Abb. 10: 2. PCR zur Einführung einer Mutation. Im 2. Schritt der Mutagenese wird die eingeführte Mutation (**M1/M3**), die sich jetzt noch am 3'-Ende des durch PCR generierten Gen-Fragmentes befindet, durch überlappende Verlängerung in das gesamte Gen eingeführt.

Im 2. PCR-Ansatz dienen die eingesetzten PCR-Fragmente A und B selbst als Primer für die Polymerasereaktion (Abb. 10). Fragment B aus der 1. PCR repräsentiert die gesamte Genlänge, während Fragment A nur einen Teil des Gens mit der eingeführten Mutation am 3'-Ende darstellt.

Durch wiederholte Denaturierung der beiden Stränge mit nachfolgender Hybridisierung, bindet Fragment A an Fragment B und dient somit als Primer für die anschließende Polymerasereaktion. Da dieser Vorgang im 1. Schritt nicht zu einer Verlängerung aller Fragmente A führt (bevorzugt wird es zu einer Hybridisierung in der ursprünglichen Kombination kommen), muss dieser Vorgang mehrmals wiederholt werden. Um eine effiziente Verlängerung zu erreichen, sollten beide Fragmente in äquimolaren Mengen eingesetzt werden.

Da die DNA-Polymerase Nukleotide nur an das 3'-Ende eines Primers binden kann, wird nur der kodierende Strang von Fragment A verlängert, der Gegenstrang liegt weiterhin in der kurzen Form vor.

3. PCR: dNTP's; Produkt der 2. PCR; Primer **M1/M4**; Taq-Polymerase.



- Reinigung des PCR-Ansatzes (Cycle-Pure Kit, peqlab, Erlangen)
- Verdau mit Restriktionsendonukleasen (im linear amplifizierten Fragment schneidet nur **S4**, da **S2** mutiert ist)
- Ligation in geschnittenen Expressionsvektor
- Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen
- Detektion der mutierten DNA mittels PCR mit Primern **M1/M4** und anschließendem Verdau des PCR-Produktes mit **S3**

Abb. 11: 3. PCR zur Einführung einer Mutation. Die 3. PCR dient der Vermehrung des verlängerten Codonstranges von Fragment A.

Eine ungereinigte Portion des 2. PCR-Ansatzes dient als DNA-Matrize für die 3. PCR mit der Primerkombination **M1/M4** (Abb. 11).

Primer **M1** kann nur an Fragment A binden, nicht aber an Fragment B. Primer **M4** bindet sowohl an den verlängerten mutierten Codonstrang von Fragment A als auch an Fragment B. Aus dieser Konstellation folgt, dass nur das mutierte Fragment A exponentiell vermehrt wird, während das nicht mutierte Fragment B, aufgrund der ausschließlichen Bindung von Primer **M4** lediglich linear amplifiziert wird.

Das Produkt der 3. PCR wird nun mittels Agarosegelelektrophorese (Falls auf dem analytischen Gel nur eine Bande sichtbar ist, kann auf eine präparative elektrophoretische Auftrennung verzichtet und der PCR-Ansatz direkt mit dem Cycle-Pure Kit (peqlab, Erlangen) gereinigt werden.) gereinigt und einem Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonuklease **S2** (*EcoR I*) am 5'-Ende und **S4** (*BamH I*) am 3'-Ende unterworfen. Nach der Reinigung kann das Produkt der dritten PCR direkt in einen vorbereiteten Expressionsvektor (pNCO113) ligiert werden.

Da das nicht mutierte Fragment B, welches linear amplifiziert wurde, über keine Klonierungsschnittstelle am 5'-Ende verfügt, wird es nicht in den Expressionsvektor ligiert. Nach Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen können positive, d. h. Expressionsvektoren mit dem betreffenden mutierten Gen, mittels PCR mit der Primerkombination **M1/M4** direkt aus den Bakterienkolonien amplifiziert werden. Ein anschließender analytischer Verdau mit einer Restriktionsendonuklease, deren Erkennungssequenz (**S3**) mit in die Mutation eingebaut wurde, bestätigt die positiv durchgeführte Mutation.

2.5.11 Fragmentmuster des mutierten *DS*-Gens

Zum Nachweis der Mutation der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii* wurde das amplifizierte *DS* Gen mit mutationsspezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut. Die Fragmentgrößen der PCR-Amplifikate (pNCO-100, pNCO+80) dienen zur Identifikation. Für den Restriktionsverdau wurden Enzyme von New England Biolabs verwendet. Die für das jeweilige Restriktionsenzym vorgeschlagenen Puffer sind angegeben.

Mutation	Detektions-schnittstelle	Erkennungssequenz	Puffer	Fragment
D21E	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
D21N	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
D21S	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
S22A	<i>BstU</i> I	CG↓CG	NEB-2	166/698
D23S	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
R25E	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
R25K	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
E26D	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
E26Q	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
E26S	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
E28D	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
E28Q	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
E28S	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
D30E	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
D30N	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
D30S	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
C55S	<i>BstB</i> I	TT↓CG↓AA	NEB-4	265/599
C55G	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	NEB-1	160/704
T112A	<i>Nae</i> I	GCC↓GGC	NEB-1	436/428
T115A	<i>Alu</i> I	AG↓CT	NEB-2	445/419
D118S	<i>Pml</i> I	CAC↓GTG	NEB-1	454/410
R119S	<i>Aci</i> I	C↓CG↓C	NEB-3	457/407
T122A	<i>Nru</i> I	TCG↓CGA	NEB-3	466/398
H147S	<i>BstE</i> II	G↓↓GTNAC↓C	NEB-3	323/541
R161S	<i>Bfa</i> I	C↓TA↓G	NEB-4	290/574
H164N	<i>Dde</i> I	C↓TNA↓G	NEB-3	272/592
H164S	<i>Sal</i> I	G↓TCGA↓C	NEB-3	272/592
T165S	<i>Bfa</i> I	C↓TA↓G	NEB-4	290/574
T165A	<i>Bfa</i> I	C↓TA↓G	NEB-4	290/574
E166S	<i>Bfa</i> I	C↓TA↓G	NEB-4	290/574
E185D	<i>Nla</i> III	↓CATG↓	NEB-4	209/655
E185Q	<i>Nde</i> I	CA↓TA↓TG	NEB-4	212/652
E185S	<i>Bsm</i> I	GAATG↓CN↓	NEB-2	221/643

Tab. 2: Neben der Mutation ist die jeweilige Restriktionsendonuklease, deren Erkennungssequenz sowie deren Puffer angegeben. In der letzten Spalte sind die Fragmentgrößen aufgeführt.

2.6 Stammhaltung und proteinchemische Methoden

2.6.1 Kulturmedien

Die Kulturmedien wurden nach den unten aufgeführten Rezepturen hergestellt und bei 121 °C (1 bar Überdruck) für 25 min autoklaviert. Für LB-Platten wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich 12 g/l Agar zugegeben. Die Antibiotikalösungen wurden dem auf ca. 50 °C abgekühltem Medium zugesetzt. Für Riboflavin-Medium wurde vor dem Autoklavieren 400 mg/l Riboflavin zugegeben.

Bezeichnung	Zusammensetzung ^{o)}
LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g Caseinhydrolysat 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl
TB-Medium (Terrific Broth)	12 g Hefeextrakt 24 g Caseinhydrolysat 4 ml Glycerin auf 990 ml mit dest. Wasser aufgefüllt; autoklaviert
TB-Puffer (100 x)	23,1 g KH ₂ PO ₄ 125,4 g K ₂ HPO ₄ in 900 ml dest. Wasser gelöst; autoklaviert
LB-Medium/Glycerin	LB-Medium 50 % (v/v) Glycerin
SOC-Medium	20 g Caseinhydrolysat 5 g Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose

LB-AMP170 bzw. TB-AMP170	LB-Medium bzw. TB-Medium 170 mg Ampicillintrihydrat
LB-KAN15	LB-Medium 15 mg Kanamycinsulfat
LB-AMP170/KAN15 bzw. TB-AMP170/KAN15	LB-Medium bzw. TB-Medium 170 mg Ampicillintrihydrat 15 mg Kanamycinsulfat
Rib-Medium	LB-Medium 400 mg Riboflavin
Rib-AMP170	LB-Medium 400 mg Riboflavin 170 mg Ampicillintrihydrat

^{o)}Die Rezepturen beziehen sich auf 1 l Gesamtvolumen.

Tab. 3: Die verschiedenen Medien und ihre Zusammensetzung.

2.6.2 Stammhaltung

Für kurzzeitige Lagerung (1-2 Wochen) und schnelle Verfügbarkeit (DNA-Präparation) wurden die Bakterienkulturen auf Agarplatten bei 4 °C gelagert. Von jedem neu erstellten Bakterienklon wurde unmittelbar nach der Überprüfung der DNA eine Kultur in Stickstoff eingefroren. Dazu wurden 10 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und der Rückstand in 0,8 ml des LB-Glycerinmediums suspendiert und eingefroren.

2.6.3 Kulturbedingungen

Bakterienkulturen von *E. coli* wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Testanzucht der Bakterienkulturen wurden in einem Volumen von 25 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Es wurde zunächst eine Übernachtskultur (ca. 15 ml) mit Zellen, welche aus einer Einzelkolonie stammten, angeimpft. Die Hauptkultur wurde 1:50 (v/v) mit der Übernachtskultur angeimpft. 10 ml der Übernachtskultur wurden für die Stickstoffkultur eingesetzt.

Für präparative Anzuchten wurden die Bakterienkulturen in einem Volumen von 1 l in 2 l Erlenmeyerkolben angezogen. Die humane GTP Cyclohydrolase und das GFRP wurde im TB-Medium angezogen.

Das Wachstum der Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm gegen unbewachsenes Medium als Nullwert verfolgt. Expressionsstämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert und dann die Bildung des Zielproteins mit IPTG in einer Konzentration von 2 mM induziert. Bei *E. coli* XL1-Blue und M15 Stämmen erfolgte anschließend eine vierstündige Inkubation bei 37 °C.

Bei den Stämmen XL1[pNCO113-MJM-WT] bzw. den Mutantenproteinen wurden 1 l Kulturen angeimpft und über Nacht bei 37 °C ohne Induktion auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag konnte geerntet werden.

Nach der Fermentation wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5.000 U/min, 20 min, RT) geerntet. Das Zellpellet wurde mit 0,9 %iger Saline gewaschen und bei -20 °C bis zu einer weiteren Verwendung gelagert.

2.6.4 Zellaufschluss mit Ultraschall zur Proteingewinnung

E. coli Kulturen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Dazu wurden die gewaschenen Zellen der Testanzucht in 800 µl Aufschlusspuffer suspendiert, auf 4 °C gekühlt und mit dem Ultraschallgerät 8 sec (Stufe 4) behandelt. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert und die Ultraschallbehandlung wurde wiederholt. Unlösliche Proteine und Zellmembranbestandteile wurden abzentrifugiert (14.000 U/min, 5 min, 4 °C) und mit dem Überstand (Rohextrakt) wurde weitergearbeitet.

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8

Das Zellmaterial präparativer Anzuchten wurde in dem Puffer aufgeschlossen, der für die nachfolgende Reinigung benötigt wurde. Die Zellen wurden pro 5 g in 40 ml Puffer suspendiert, auf 4 °C gekühlt und durch dreimal 15 Pulse (60 %) bei Stufe 6 mit dem Ultraschallgerät aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt wurde durch Zentrifugation (15.000 U/min, 20 min, 4 °C) von unlöslichen Bestandteilen befreit und für die Proteinreinigung verwendet.

2.6.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es wurde eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Routinemäßig wurden Gele mit 4 % Acrylamid im Sammelgel und 15 % Acrylamid im Trenngel angefertigt.

Trenngel (15 %): Das Trenngel wurde aus 3,75 ml 40 %ige Acrylamidlösung, 2,5 ml Trenngelpuffer, 3,75 ml bidestilliertem Wasser, 50 µl 10 %iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 5 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) hergestellt.

Sammelgel (4 %): Zur Herstellung des Sammelgels wurden 0,4 ml 40 %ige Acrylamidlösung, 2,5 ml Sammelgelpuffer, 2,1 ml bidestilliertem Wasser, 50 µl 10 %iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 5 µl TEMED vermischt.

Probenvorbereitung: Die Rohextrakte wurden 1:3 mit 2x-Sample-Puffer verdünnt und 10 min gekocht. Nach dem Abkühlen wurde zentrifugiert (14.000 U/min, 1 min, RT) und 8 µl des klaren Überstandes auf das Sammelgel aufgetragen.

Als Proteinstandard diente Dalton Mark VII-L von Sigma (Deisenhofen) mit Proteinbanden bei 66, 40, 36, 28, 24, 20 und 14 kDa.

Die Elektrophorese wurde bei konstant 40 mA je SDS-Gel durchgeführt. Zur Anfärbung wurde das Gel für 1 Stunde mit Färbelösung inkubiert. Mittels der Entfärbelösung, die zweimal gewechselt wurde, erfolgte die Entfärbung des Gelhintergrundes innerhalb von 2 h.

Sammelgelpuffer: 0,25 M Tris/HCl pH 6,8
0,2 % SDS

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,3
0,4 % SDS

Acrylamidlösung (40 %): 40 % (w/v) Acrylamid
3 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Ammoniumperoxodisulfat-Lsg: 10 % (w/v) in H₂O_{bidest.}

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris pH 8,3
192 mM Glycin
0,1 % SDS

2x-Sample-Puffer: 6 % 2-Mercaptoethanol
10 % Glycerin
6 % (w/v) SDS
0,05 % Bromphenolblau
0,062 M Tris/HCl, pH 6,8

Färbelösung: 0,2 % (w/v) Coomassie Blue R 250
40 % Methanol
10 % Eisessig

Entfärbelösung: 50 % Methanol
10 % Eisessig

2.6.6 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

2.6.6.1 Enzymtest auf GTP Cyclohydrolase I

Zur Bestimmung der GTP Cyclohydrolase I Aktivität (Bracher *et al.*, 1998) wurde GTP in einer Konzentration von 0,1 – 1 mM im Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8) in einem Küvettenblock 5 min auf 37 °C temperiert. Nach Zugabe von GTP Cyclohydrolase I in einer Konzentration von 3 µM wurde die Extinktionszunahme bei 330 nm bestimmt. Bei 330 nm beträgt der Extinktionskoeffizient von Dihydroneopterintriphosphat $6.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Pfleiderer *et al.*, 1985).

2.6.6.2 Enzymtest auf GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein

Der GFRP-Enzymtest entspricht einem abgewandeltem GTP Cyclohydrolase I Test, dem neben der humanen GTP Cyclohydrolase I das GFRP zugesetzt wird. Da das GFRP nur in Gegenwart von BH_4 eukaryotische GTP Cyclohydrolase I hemmt, kann aus dem direkten Vergleich eines Enzymtests mit und ohne BH_4 über die Restaktivität der GTP Cyclohydrolase I auf die regulatorischen Eigenschaften des GFRP geschlossen werden.

Dem Assaypuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8) wurden 6 μM GFRP zugesetzt, während die BH_4 -Konzentration von 0 – 400 μM variiert wurde. Die Ansätze enthielten 0,1 – 1 mM GTP und wurden in einem Küvettenblock 5 min auf 37 °C temperiert. Nach Zugabe von humaner GTP Cyclohydrolase I (3 μM) wurde die Extinktionszunahme bei 330 nm bestimmt. Bei 330 nm beträgt der Extinktionskoeffizient von Dihydroneopterintriphosphat 6.600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Pfleiderer *et al.*, 1985).

2.6.6.3 Enzymtest auf 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

Der Testansatz für die Aktivitätsbestimmung enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,7, 10 mM Magnesiumchlorid, 1 – 2000 μM Ribulose-5-phosphat, 0,2 U Phosphoriboisomerase (Spinat), 34 μM Lumazinsynthase (*E. coli*) (gereinigt). Nach einer Inkubation von 5 min bei 37 °C wurden 0,41 mM 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase zugesetzt. Der Reaktionsverlauf wurde bei 410 nm photometrisch detektiert. Bei 410 nm und einem pH von 7,7 beträgt der Extinktionskoeffizient von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin 12.100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (Sedlmaier *et al.*, 1987) wurde durch Hydrieren mit einem Pt-Katalysator aus 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (Plaut *et al.*, 1971; Bacher *et al.*, 1986) erhalten.

2.6.6.4 In vivo-Nachweis der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase auf Agarplatte

Die DS-Aktivität wurde durch Transformation des betreffenden Expressionsplasmides pNCO113-MJM-WT in den Riboflavin-auxotrophen *E. coli*-Stamm *Rib5* geprüft. Diese chemisch erzeugte Mutante kann keine funktionstüchtige DS exprimieren. Als Positivkontrolle wurde ein Expressionsplasmid mit dem Gen für die DS von *E. coli* verwendet.

Die Vitalität der Transformanden wurde durch Inkubation auf LB-Agarplatten mit 170 mg/l Ampicillin über 48 Stunden bei 37 °C untersucht. Gleichzeitig wurde auf gleichartigen Platten, die zusätzlich 400 mg/l Riboflavin enthielten, geprüft, ob die Transformation erfolgreich war.

Als positiv galt der Assay, wenn spätestens nach zwei Tagen Inkubation bei 37 °C Kolonien auf der LB-Platte zu erkennen waren.

2.6.6.5 In vivo-Nachweis der GTP Cyclohydrolase II auf Agarplatte

Die GTP Cyclohydrolase II Aktivität von GTP Cyclohydrolase I Mutantenproteinen wurde durch Transformation der betreffenden Expressionsplasmide pNCO113 in den Riboflavin-auxotrophen *E. coli*-Stamm *Rib7* (Richter *et al.*, 1993) geprüft. Diese chemisch erzeugte Mutante kann keine funktionstüchtige GTP Cyclohydrolase II exprimieren. Als Positivkontrolle wurde ein Expressionsplasmid mit dem Gen für GTP Cyclohydrolase II (*ribA*) von *E. coli* verwendet; als Negativkontrolle diente das Expressionsplasmid pECHYI mit der GTP Cyclohydrolase I Wildtypsequenz.

Die Vitalität der Transformanden wurde durch Inkubation auf LB-Agarplatten mit 170 mg/l Ampicillin über 48 Stunden bei 37 °C untersucht. Gleichzeitig wurde auf LB-Agarplatten, die zusätzlich 400 mg/l Riboflavin enthielten, geprüft, ob die Transformation erfolgreich war. Von diesen Kolonien wurden Stickstoffkulturen angelegt. Als positiv galt der Assay, wenn spätestens nach zwei Tagen Inkubation bei 37 °C Kolonien auf der LB-Platte zu erkennen waren.

2.6.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.6.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt des Rohextraktes wurde nach einer Variante der Methode von Bradford (Bradford, 1976; Read und Northcote, 1981; Compton und Jones, 1985) bestimmt.

Das Farbstoffreagenz wurde filtriert und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

Die konzentrierten Proben wurden zunächst mit Bradfordpuffer verdünnt. Es wurden jeweils 50 µl verdünnte Probe und 950 µl Bradfordfarbstoffreagenz gemischt und 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde bei 595 nm gegen einen Leerwert aus 50 µl Bradfordpuffer und 950 µl Farbstoffreagenz die Extinktion bestimmt.

Die Ergebnisse wurden mittels einer mit Rinderserumalbumin als Standard erhaltenen Eichgeraden in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

Bradfordpuffer: 2,0 g Na_2HPO_4
 0,6 g NaH_2PO_4
 7,0 g NaCl
 0,2 g NaN_3
 pro 1 Liter

Farbstoffreagenz: 0,1 g Serva Blue G
 47 ml Ethanol
 100 ml 16 M Phosphorsäure
 pro 1 Liter

2.6.7.2 Proteinbestimmung mittels UV

Bei gereinigten Proteinen wurde die Konzentration mittels UV-Messung bei 280 nm durch eine Dreifachbestimmung ermittelt. Die Extinktionskoeffizienten bzw. Molmassen der jeweiligen Proteine wurden dem Sequenzanalysierungsprogramm OMIGA entnommen.

Protein	Molmasse [Da]	Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	pI
GTP Cyclohydrolase I Δ42	23573	20806	6.25
GFRP-Ratte	9671	11742	6.09
GFRP-Human	9699	11742	6.09
CBP-GFRP	12643	18706	9.84
Hisactophilin-GFRP	23462	18838	6.86
DS	25296	10600	5.48

Tab. 4: Molmasse, Extinktionskoeffizient und pI der untersuchten Proteine.

2.6.8 Aufkonzentration von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden zum einen durch Zentrifugation bei 4.500 U/min in Centricons (Millipore) mit Membranen einer unteren Ausschlussgrößengrenze von 10 bzw. 100 kD eingengt, zum anderen durch Druckfiltration in einer Amiconrührzelle bei 4°C, wobei ebenfalls Membranen mit einer unteren Ausschlussgrößengrenze von 10 bzw. 100 kD verwendet wurden. Die Filtrate wurden per SDS-PAGE und Proteinmengenbestimmung nach Bradford auf den Konzentrationseffekt hin analysiert.

2.6.9 Aminosäuresequenzanalyse

Zuerst wurde die Säule zur Aminosäuresequenzanalyse mit 10 µl Methanol aktiviert. Anschließend wurden 10 µl Proteinlösung (3 mg/ml) aufgetragen und mit 2 x 400 µl Wasser gespült. Die Aufarbeitung des Röhrchens wurde freundlicherweise von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie übernommen.

2.6.10 Ultrazentrifugation

Für die Ultrazentrifugation zur Bestimmung der Quartärstruktur wurde gereinigtes Wildtypprotein der DS sowie die Mutanten E26S und H164S eingesetzt. Die Proteinlösungen wurden auf eine $OD_{280} = 0,3$ gebracht und über Nacht gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 dialysiert. Die Durchführung der Ultrazentrifugation und die Auswertung der Daten übernahm freundlicherweise G. Richter.

2.6.11 CD-Spektrum

Das Produkt der DS aus *M. jannaschii* wurde von W. Römisch zur Verfügung gestellt. Zur Dephosphorylation wurden 100 μ l 53 mM DHBP mit 50 μ l alkalischer Phosphatase, 100 μ l einer Zn^{2+}/Mn^{2+} -Lösung (65mM /50 mM) in 100 μ l 1M Tris/HCl pH 8,5 für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das dephosphorylierte DHB wurde durch Zentrifugieren mit einem Ultracentricon (Millipore) von der Phosphatase getrennt. Das CD-Spektrum wurde mit einem J715 Spektropolarimeter (Labor- und Datentechnik GmbH) aufgenommen.

2.7 Proteinreinigung

2.7.1 Reinigung von humanen GTP Cyclohydrolase I Mutanten

2.7.1.1 Ni-NTA-Säule

Um die Reinigung der Deletionsmutante der GTP Cyclohydrolase I $\Delta 42$ zu erleichtern, wurden 6 Histidine an den N-Terminus gehängt. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Säule.

Die chelatisierende Sepharose ($V = 15$ ml) wurde wie in Punkt 2.7.2.3 beschrieben beladen. 15 g Zellmaterial wurden in 100 ml 50 mM Tris/HCl pH 8 suspendiert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert (15.000 U/min, 20 min, 4 °C). Die Säule wurde mit 150 ml Puffer A equilibriert. Nach dem Auftragen des Rohextraktes wurde mit 10 Säulenvolumina Puffer A gewaschen. Zum Eluieren wurde bei einer Flussrate von 1,5 ml/min ein Gradient von 10 bis 500 mM Imidazol (100 % Puffer B) über 200 ml angelegt.

2.7.1.2 Dialyse

Die Fraktionen mit dem Protein wurden vereinigt und über Centricons (Millipore, 100 kDa Membran) in der Zentrifuge bei 4.000 U/min aufkonzentriert. 30 ml Proteinlösung wurde gegen 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5 dialysiert. Der Dialysevorgang wurde dreimal wiederholt. Das Protein konnte bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml angereichert werden. Bei höheren Konzentrationen fällt das Protein aus.

2.7.2 Reinigung des GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorproteins

2.7.2.1 Reinigung des humanen GFRP

2.7.2.1.1 Präparative Hitzefällung

25 g Zellmaterial wurde in 200 ml 50 mM Tris/HCl pH 8 suspendiert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert (15.000 U/min, 20 min, 4 °C). Der Proteinrohextrakt wurde in einem schmalen, hohen Becherglas auf einer Heizplatte mit ca. 200 °C schnellstmöglich erhitzt. Die Temperatur wurde dabei über ein Thermometer in der Lösung überwacht. Bei Erreichen der Zieltemperatur von 65 °C wurde der Rohextrakt von der Heizplatte genommen, 20 ml weise portioniert und mit Eis gekühlt. Nachdem die Temperatur der Proteinlösung unter 30 °C gesunken war, wurden die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (15.000 U/min, 20 min, 4 °C) und der verbleibende Extrakt auf die Anionenaustauschsäule aufgetragen.

2.7.2.1.2 Anionenaustauschchromatographie

Die nach der Hitzefällung verbliebene Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte SepharoseQ-4FastFlow (V = 60 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit 500 ml Puffer A gespült, bevor ein linearer Gradient von 0 bis 360 mM NaCl (68 % Puffer B) über 1 l angelegt wurde.

Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 8
 2 mM DTE

Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 8
 0,5 M NaCl
 2 mM DTE

2.7.2.2 Reinigung des CBP-GFRP

Bei der Reinigung von CBP-GFRP wurde der relativ hohe pI von 9,81 ausgenutzt. Es wurde eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt.

10 – 15 g Zellmaterial wurde in 100 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 suspendiert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert (15.000 U/min, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Säule (V = 50 ml) aufgetragen. Mit 5 Säulenvolumina wurde gewaschen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 1,5 ml/min und bei einem Gradienten von 0 bis 1 M KCl (100% Puffer B) über 500 ml.

Puffer A: 50 mM Kaliumphosphat pH 7,5
 2 mM DTE

Puffer B: 50 mM Kaliumphosphat pH 7,5
 1 M KCl
 2 mM DTE

2.7.2.3 Reinigung des Hisactophilin-GFRP

Bei der Reinigung von Hisactophilin-GFRP wurde der Umstand ausgenutzt, dass auf der Proteinoberfläche von Hisactophilin drei Histidine lokalisiert sind. Es wurde eine Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Säule durchgeführt.

Die chelatisierende Sepharose FF (Chelatligand: Nitrilotriaceticacid (NTA)) wurde mit 0,3 M NiSO₄ beladen und mit 20 Säulenvolumina (V = 20 ml) (um ungebundene Nickelionen zu entfernen) Puffer A equilibriert. Der Überstand wurde auf die Säule aufgetragen und mit 7 Säulenvolumina von Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 1,5 ml/min mit einem Gradienten von 10 – 500 mM Imidazol (100 % Puffer B) über 200 ml.

Puffer A: 20 mM Tris/HCl pH 8
 0,5 M NaCl
 10 mM Imidazol
 10 mM β-Mercaptoethanol

Puffer B: 20 mM Tris/HCl pH 8
 0,5 M NaCl
 0,5 M Imidazol
 10 mM β -Mercaptoethanol

2.7.3 Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii*

2.7.3.1 Ammoniumsulfatfällung

5 g Zellen wurden in 30 ml 30 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 suspendiert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert (15.000 U/min, 20 min, 4 °C). Dem Rohextrakt wurden unter Rühren 30 ml einer kalt gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugesetzt. Die ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert (15.000 U/min, 20 min, 4 °C). Die Proteinlösung enthält ca. 2 mM Ammoniumsulfat und kann deshalb direkt auf die Phenyl Sepharose Säule aufgetragen werden.

2.7.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Phenyl Sepharose Säule mit einem Volumen von 30 ml wurde mit 100 ml Puffer A equilibriert. Nach dem Auftrag der Proteinlösung, wurde die Säule mit 200 ml Puffer A gespült. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 1,5 ml/min mit Puffer B. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und bei 4 °C gelagert.

Puffer A: 30 mM Kaliumphosphat pH 7
 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 2 mM DTE

Puffer B: 30 mM Kaliumphosphat pH 7
 2 mM DTE

2.7.4 Reinigung der Lumazinsynthase aus *E. coli*

Für die Hauptkultur wurde 1 l Terrific-Broth-Medium mit 170 mg Ampicillin aus einer Stickstoffkultur angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttler bei 200 U/min inkubiert. Nach erfolgter Fermentation wurden die Zellen abzentrifugiert (4.000 U/min, 10 min, 4 °C), mit Saline (0,9 % NaCl in Wasser) gewaschen und bei –20 °C gelagert. Die Ausbeute betrug für 1 l Medium 7 g Zellmasse.

14 g Zellen wurden in 90 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 suspendiert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert (15.000 U/min, 20 min, 4 °C). Der Rohextrakt wurde auf eine SepharoseQ-4FastFlow Säule (Säulenvolumina: 110 ml), die mit 150 ml Puffer A equilibriert wurde, aufgetragen. Nachdem mit 100 ml Puffer A gespült wurde, erfolgte die Elution bei einer Flussrate von 1,5 ml/min mit einem Gradienten von 20 – 1000 mM Kaliumphosphat (100 % Puffer B) über 800 ml. Die Lumazinsynthase eluiert bei einer Kaliumphosphatkonzentration von 450 – 575 mM. Mittels SDS-Page wurden die Fraktionen bestimmt, die Lumazinsynthase enthalten und vereinigt. Die Proteinlösung wurde auf 22 mg/ml aufkonzentriert.

Puffer A: 20 mM Kaliumphosphat pH 7

Puffer B: 1 M Kaliumphosphat pH 7

2.8 Synthese von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion

5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (40 µmol, 12,2 mg) wurden in 2 ml Wasser suspendiert und 12 Stunden über Palladiumkohle hydriert. Der Katalysator wurde über einen Membranfilter (0,2 µm) abgetrennt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde sofort ein Teil des Filtrats mit 0,1 N HCl verdünnt und die Extinktion bei 268 nm und 323 nm (Edukt) bestimmt. Zur restlichen Lösung wurde Dithiothreitol (ca. 50 mM Endkonzentration) gegeben. Die Lösung wurde bei –70 °C gelagert.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Humane GTP Cyclohydrolase I

Bei Versuchen zur Reinigung der rekombinant in *E. coli* exprimierten humanen GTP Cyclohydrolase I zeigte es sich, dass das Enzym während der Aufreinigung proteolytisch gespalten wurde (Herrmann, 1999). Hierbei wurden mehrere Spaltstellen innerhalb der ersten 40 Aminosäuren gefunden. Daraufhin wurde eine Deletionsmutante $\Delta 42$ kloniert, der die ersten 42 Aminosäuren fehlen (Herrmann, 1999). Von dieser Mutante konnte die Struktur mittels Röntgenkristallographie (Auerbach *et al.*, 2000) aufgeklärt werden. Die Aktivität dieser verkürzten GTP Cyclohydrolase I weist keinen Unterschied zum Wildtypenzym auf. Die Deletionsmutante erkennt ebenso das GFRP.

3.1.1 Klonierung von $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I

Um die Reinigung der Deletionsmutante zu vereinfachen, wurden an den N-Terminus, der offensichtlich weder die Aktivität der GTP Cyclohydrolase I noch die GFRP-Erkennung beeinflusst, 6 Histidine gehängt. Die sechs Histidine wurden mittels PCR mit den Oligonukleotiden $\Delta 42$ His (Tab. 16, Anhang) und dem korrespondierenden Vektorprimer mRNA5 (Tab. 12, Anhang) eingeführt. Als Template wurde der Vektor p602 $\Delta 42$ CHI eingesetzt. Mit einer zweiten PCR, wurde eine *EcoR* I-Schnittstelle vor dem Translationsstart eingeführt. Es wurde der Primer UniEcoRI (Tab. 12, Anhang) und der korrespondierende Vektorprimer mRNA5 (Tab. 12, Anhang) verwendet. Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Pst* I (die Erkennungssequenz von *Pst* I liegt hinter dem Stopcodon) verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113 ligiert. Mit dem resultierenden Plasmid pNCO113 $\Delta 42$ HisCHI wurden XL1-Zellen transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mit einem PCR-Screening mit den Oligonukleotiden $\Delta 42$ His und mRNA5 charakterisiert. Die Einführung der Histidine wurde durch Sequenzierung bestätigt. Aufgrund der geringen Expression in den XL1-Zellen wurden M15[pREP4]-Zellen mit dem Plasmid transformiert. Die Menge des rekombinanten Proteins betrug ca. 25 % des löslichen Zellproteins in Rohextrakten von M15[pREP4][pNCO113 $\Delta 42$ HisCHI]-Zellen.

3.1.2 Reinigung der $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I

Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule. Nach einem Waschschrift wurde ein linearer Gradient von 10 mM auf 500 mM Imidazol angelegt. Das rekombinante Protein eluiert bei einer Imidazolkonzentration von 225 bis 375 mM. Das Protein konnte bis zur vollständigen Homogenität gereinigt werden (Abb. 12). Zur Entfernung des Imidazols wurde die Proteinlösung gegen 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5 dialysiert.

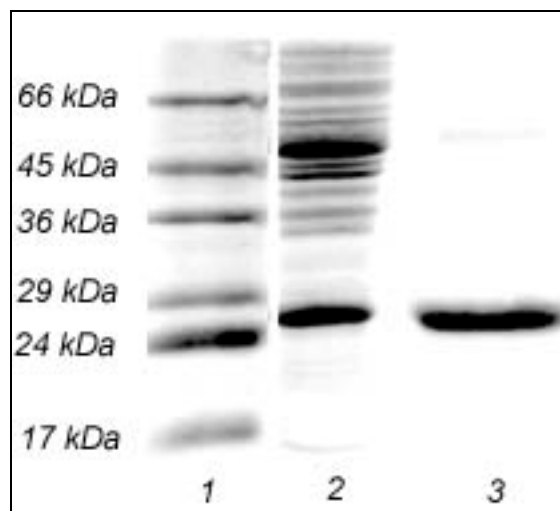


Abb. 12: SDS-Page zur Reinigung von $\Delta 42$ His. 1) Molekulargewichtsstandard, 2) Rohextrakt M15[pREP4][pNCO113 $\Delta 42$ HisCHI], 3) $\Delta 42$ HisCHI nach Ni-NTA-Säule.

3.1.3 Erkennung der humanen GTP Cyclohydrolase I durch das GFRP aus Ratte

3.1.3.1 Test auf Komplexbildung mittels Gelfiltration

Ein Komplex zwischen GFRP und GTP Cyclohydrolase I bildet sich nur in Anwesenheit von BH_4 und GTP oder Phenylalanin (Yoneyama *et al.*, 1997). Gereinigte $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I wurde mit isoliertem GFRP aus Ratte, welches im Überschuss zugesetzt wurde, in einem Puffer mit 75 mM Kaliumphosphat, 1 mM Phenylalanin pH 7,5 für 1 h inkubiert. Die Proteinlösung wurde auf eine Gelpermeationschromatographie Säule (Superdex 75) aufgetragen und mit 75 mM Kaliumphosphat, 1 mM Phenylalanin pH 7,5 eluiert. Im Elutionsprofil waren zwei Banden zu sehen. Bei 45 ml eluierte der Komplex aus GTP Cyclohydrolase I und GFRP, während das überschüssige GFRP bei 112 ml eluierte (Abb. 13).

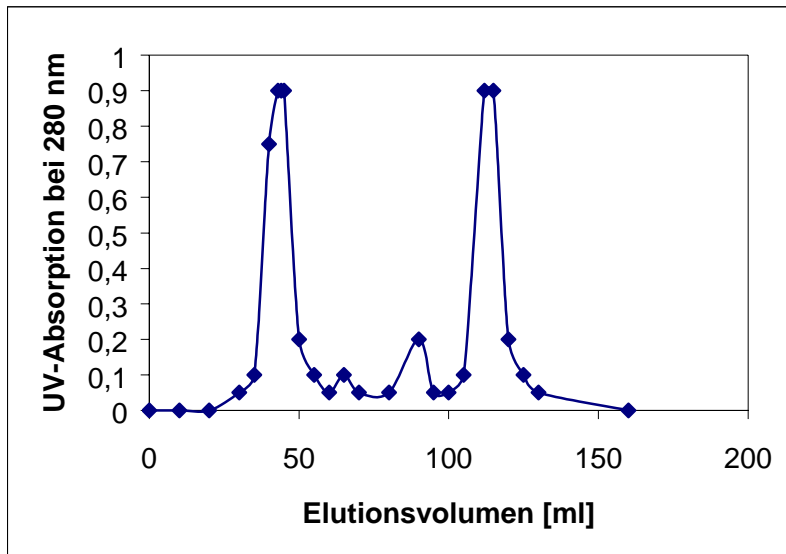


Abb. 13: Elutionsprofil des Komplexes mit der Superdex 75.

Die Komplexbildung konnte mittels SDS-Page bestätigt werden (Abb. 14). Die Fraktion des Komplexes enthielt $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I und GFRP.

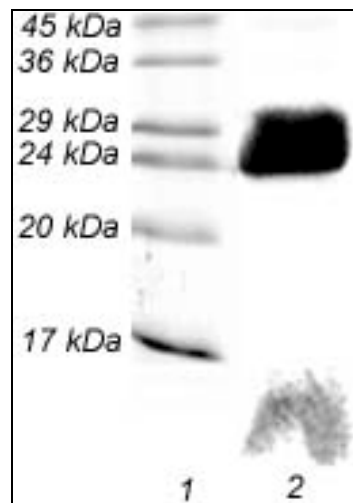


Abb. 14: SDS-Page zur Komplexbildung zwischen der humanen $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I und GFRP aus Ratte. 1) Molekulargewichtsstandard, 2) $\Delta 42$ HisCHI bei 24,7 kDa und GFRP-R bei 9,5 kDa.

3.1.3.2 Aktivitätstest des Komplexes

Die Bildung des Komplexes sollte mit einem Aktivitätstest verifiziert werden. Es wurde ein GTP Cyclohydrolase I Aktivitätstest mit und ohne GFRP aus Ratte durchgeführt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I wurde $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I mit $100\ \mu\text{M}$ GTP in $100\ \text{mM}$ Tris/HCl pH 8 bei $37\ ^\circ\text{C}$ umgesetzt. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität des inhibierenden Komplexes wurden dem Ansatz $400\ \mu\text{M}$ BH_4 und GFRP zugesetzt. Die Bildung von Dihydroneopterintriphosphat wurde bei $330\ \text{nm}$ am Photometer detektiert. Es zeigte sich, dass die spezifische Aktivität der $\Delta 42\text{His}$ von $85\ \text{nmol min}^{-1}\ \text{mg}^{-1}$ durch GFRP aus Ratte und BH_4 auf $7\ \text{nmol min}^{-1}\ \text{mg}^{-1}$ reprimiert wurde. Somit war bewiesen, dass die humane $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I mit dem GFRP aus Ratte einen inhibierenden Komplex bildet. Die 6 Histidine stören folglich weder die Aktivität der GTP Cyclohydrolase I noch die Komplexbildung.

3.1.4 Klonierung der $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I Mutanten

Ausgehend von der Struktur des GFRP's und der GTP Cyclohydrolase I konnte von G. Bader (2001) ein Komplex simuliert werden (Abb. 15). Zur Charakterisierung der Bindung zwischen der GTP Cyclohydrolase I und dem GFRP bei der Komplexbildung, wurde eine Aminosäure der GTP Cyclohydrolase I, die an der Kontaktstelle liegt, ausgetauscht.

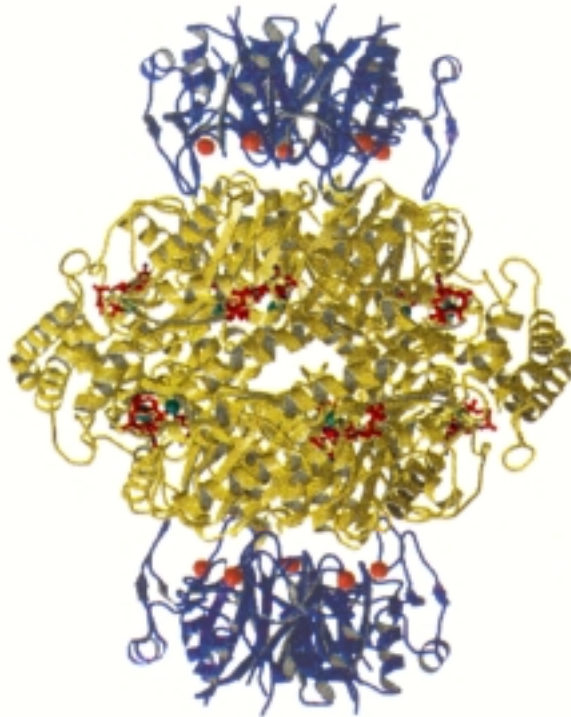


Abb. 15: Simulation des Komplexes zwischen humaner GTP Cyclohydrolase I (gelb) und GFRP aus Ratte (blau). Die Kaliumionen des GFRP's und GTP sind rot dargestellt.

3.1.4.1 Einführung der Mutation E236X

Um die Aminosäure Glutamat 236 gegen Alanin, Aspartat und Glutamin auszutauschen, wurde die überlappende PCR-Technik eingesetzt. Die Aminosäure Glutamat 236 befindet sich am C-Terminus des 250 Aminosäure langen Proteins. Die erste PCR diente zur Einführung der Mutation (Abb. 16) und der Restriktionsschnittstelle *Hind* III. Als Template wurde der Vektor pNCO113 Δ 42HisCHI eingesetzt. Es wurde der Primer Δ 42His (Tab. 16, Anhang) und die korrespondierenden Mutationsprimer Human-CHI-E236A, Human-CHI-E236D und Human-CHI-E236Q (Tab. 16, Anhang) verwendet. Mit einer zweiten PCR wurde die *EcoR* I-Schnittstelle generiert. Es wurde der Primer UniEcoRI (Tab. 12, Anhang) und der jeweilige korrespondierende Mutationsprimer eingesetzt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *EcoR* I geschnitten und in einen entsprechend restringierten pNCO113 ligiert. Mit den Plasmiden pNCO113 Δ 42HisCHI-E236A, pNCO113 Δ 42HisCHI-E236D und pNCO113 Δ 42HisCHI-E236Q wurden XL1-Zellen transformiert. Die Menge des rekombinanten Proteins betrug ca. 25 % des löslichen Zellproteins in Rohextrakten von XL1[pNCO113 Δ 42HisCHI-E236X]-Zellen.

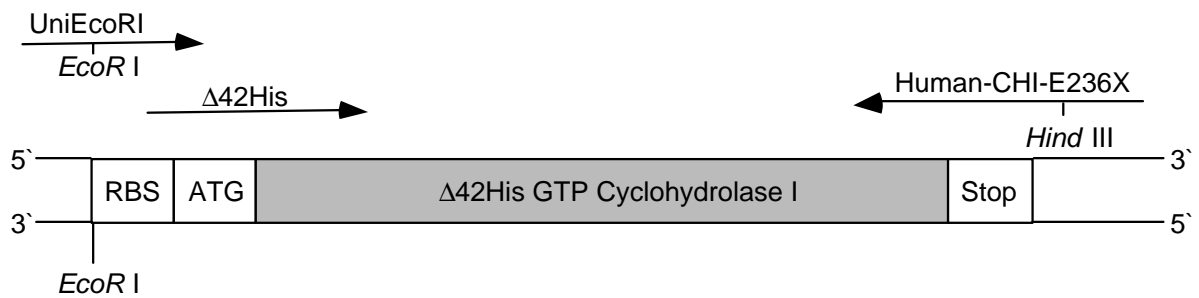


Abb. 16: Mutationsstrategie für die Mutanten E236A, E236D und E236Q.

3.1.4.2 Reinigung der $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I Mutanten

Die Reinigung der Mutanten erfolgte über Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Material. Die Mutanten wurden wie der Wildtyp bis zur vollständigen Homogenität gereinigt.

3.1.4.3 Aktivitätstests der $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I Mutanten

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I Mutanten wurden die entsprechenden $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolasen I mit $100 \mu\text{M}$ GTP in 100 mM Tris/HCl pH 8 bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ umgesetzt. Die Bildung von Dihydroneopterintriphosphat wurde photometrisch detektiert. Die Komplexbildung zwischen GFRP und $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I wurde durch die Inhibierung der $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I untersucht. Neben GTP ($100 \mu\text{M}$), $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I ($3 \mu\text{M}$) wurde BH_4 ($400 \mu\text{M}$) und GFRP aus Ratte ($6 \mu\text{M}$) zugesetzt. Die spezifischen Aktivitäten des Wildtyps und der Mutanten sind in Tab. 5 zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutanten E236D, E236Q und E236A in etwa eine spezifische Aktivität vergleichbar mit dem Wildtyp aufweisen. Die spezifischen Aktivitäten der Mutanten mit GFRP sind mit dem regulierten Wildtyp vergleichbar. Die Regulierung und damit die Komplexbildung wird nicht beeinflusst. Die Aminosäure E236 ist nicht an der Komplexbildung zwischen GFRP und $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I beteiligt.

$\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I	Spez. Aktivität [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	Spez. Aktivität mit GFRP [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]
$\Delta 42\text{HisWT}$	85	7
$\Delta 42\text{HisE236A}$	88	13
$\Delta 42\text{HisE236D}$	105	10
$\Delta 42\text{HisE236Q}$	96	12

Tab. 5: Spezifische Aktivitäten der $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I und des GFRP's.

3.2 Die GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*

Bei der GTP Cyclohydrolase I (*folE*-Gen) aus *E. coli* sollten Aminosäuren durch Zufallsmutagenese ausgetauscht werden. Es sollten Mutanten erzeugt werden, bei denen die Reaktionssequenz beim GTP Cyclohydrolase II Homologen (2,5-Diamino-6-ribosyl-amino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat) abbricht. Zur Überprüfung, ob die Mutationen den erwünschten Effekt erzielen, wurde ein *in vivo* Test mit *Rib7*-Zellen eingesetzt. *Rib7* (Richter *et al.*, 1993) ist eine chemisch erzeugte *E. coli*-Mutante, die einen Defekt im Gen für die GTP Cyclohydrolase II hat. Damit ist der erste Schritt der Biosynthese von Riboflavin gestoppt. Die *E. coli*-Mutante wächst deshalb nicht ohne externe Zufuhr von Riboflavin oder einer GTP Cyclohydrolase I, die die Aufgabe der GTP Cyclohydrolase II übernimmt. *Rib7*-Zellen wurden mit den durch Zufallsmutagenese erzeugten Plasmiden transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Agarplatten und auf Rib400-Agarplatten (400 mg/l Riboflavin) mit 170 mg/l Ampicillin ausgestrichen. Letzteres diente zur Kontrolle, ob die Transformation erfolgreich war.

3.2.1 Zufallsmutagenese mit dem Mutatorstamm XL1-Red

Der *E. coli*-Stamm XL1-Red (Stratagene) zeichnet sich dadurch aus, dass ihm drei Gene (*mutS*, *mutT*, *mutD*), die für Enzyme des primären DNA-Reparatursystems codieren, fehlen. Dazu gehört die 8-Oxo-deoxyguanosine Triphosphatase (*mutT*), die oxidiertes GTP hydrolysiert und so den Einbau von 8-Oxo-dGTP in die DNA verhindert. Bei der DNA-Replikation kann es zu Fehlpaarungen kommen, die dazu notwendige Reparatur wird durch das MutS-Protein initiiert (Marti *et al.*, 2002). Das *mutD*-Gen codiert die ϵ -Untereinheit der DNA Polymerase III, deren Funktion die 3' – 5' Exonukleaseaktivität ist (Scheuermann *et al.*, 1984). Durch die Störung des DNA-Reparatursystems besitzen XL1-Red Zellen eine 5000

mal höhere Mutationshäufigkeit als XL1-Blue-Zellen. Dieser Stamm wird verwendet, um willkürlich Aminosäuren auszutauschen.

Zur Mutagenisierung werden XL1-Red Zellen mit dem Plasmid pNCO113-foIE transformiert. Der Stamm wächst in LB-Medium sehr langsam mit einer Verdopplungszeit von 90 – 120 min. Es wuchsen nur wenige Kolonien nach ca. 48 h auf der LB-Agarplatte. Die Inkubationszeit von XL1-Red-Zellen auf Platten sollte minimal sein. Die hohe Mutationsrate führt zu ungewollten Mutationen im Chromosom, und die Folgekolonien sind eventuell genetisch nicht identisch mit dem Originalstamm. Durch die Isolierung und Retransformation der Plasmide in die *Rib7*-Zellen konnten diese Probleme umgangen werden. Es zeigte sich nach ca. 48 h keine *Rib7*-Kolonie. Die eingeführten Mutationen führten nicht zu GTP Cyclohydrolasen I, die das Zwischenprodukt 2,5-Diamino-6-ribosyl-amino-4(3H)-pyrimidinon-5`-triphosphat anreichern.

3.2.2 Zufallsmutagenese mit PCR

Zur Zufallsmutagenese kann auch die PCR eingesetzt werden. Die Fehlerhäufigkeit der Taq Polymerase kann durch Zugabe von Mangan(II)chlorid gesteigert werden. Es wurden mehrere PCR`s mit dem Vektor pNCO113-foIE als Template, dem Vektorprimer UniEcoRI (Tab. 12, Anhang) und dem korrespondierenden Primer Ec-Cy-Hi (liegt auf dem C-Terminus des foIE-Gens) (Tab. 16, Anhang) und variierender Mangan(II)chlorid- bzw. Magnesium(II)chlorid-Konzentration durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BamH* I verdaut und in einen entsprechend restringierten Vektor pNCO113 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurden elektrokompente *Rib7*-Zellen transformiert. Nach ca. 48 h zeigten sich keine Kolonien auf den LB-Agarplatten.

Eine weitere Möglichkeit der Zufallsmutagenese besteht darin, bei der PCR einen der vier dNTP zusätzlich in erhöhter Konzentration zuzugeben (Fromant *et al.*, 1995), da die Taq Polymerase dieses dNTP bevorzugt einsetzt und Fehler verursacht. Bei der PCR wurde der Vektor pNCO113-foIE als Template und der Vektorprimer UniEcoRI bzw. der korrespondierende Primer Ec-Cy-Hi eingesetzt. Zudem wurde abwechselnd einer der vier dNTP zusätzlich zugegeben. Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BamH* I verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurden elektrokompente *Rib7*-Zellen transformiert. Nach ca. 48 h zeigte sich eine kleine Kolonie auf der LB-Agarplatte, die den Transformationsansatz mit der PCR,

bei der dGTP im Überschuss zugegeben wurde, enthielt. Die Sequenz des folE-Gens des isolierten Plasmids zeigte eine Mehrfachmutation M30T, H64R, D118G, Q147R und R154C. Außerdem wurden die bereits erwähnten PCR-Zufallsmutagenese-Methoden kombiniert. Die PCR wurde mit erhöhter Mangan- bzw. erhöhter dATP/dGTP/dCTP/dTTP-Konzentration durchgeführt. Es wurde keine GTP Cyclohydrolase I Mutante erzeugt, die den Defekt der *Rib7*-Zellen ausgleichen konnte.

Eine weitere Kombinationsmöglichkeit bestand darin zwei PCR's nacheinander durchzuführen. Die erste PCR enthielt eine der vier dNTP's in erhöhter Konzentration. Bei der zweiten PCR wurde als Template das Amplifikat der ersten PCR eingesetzt und ein anderes dNTP in erhöhter Konzentration. Es entstanden keine GTP Cyclohydrolase I Mutanten, die das GTP Cyclohydrolase II Homologe anreichern.

Zu den Zufallsmutageneseverfahren zählte auch eine PCR ohne Modifikationen. Als Template wurde der Vektor pNCO113-folE und der Vektorprimer UniEcoRI sowie der korrespondierende Primer Ec-Cy-Hi eingesetzt. Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BamH* I geschnitten und in einen entsprechend restringierten pNCO113 ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden *Rib7*-Zellen transformiert. Nach ca. 48 h zeigten sich auf den LB-Platten Kolonien. Von den größten Kolonien wurden die Plasmide isoliert und das folE-Gen sequenziert. Die Mutationen und ihre Vitalität werden in Tab. 6 aufgelistet. Die Vitalität entspricht der Größe der Kolonien.

Einfachmutanten	Vitalität*	Doppelmutanten	Vitalität*	Dreifachmutanten	Vitalität*
P25S	++	S2P/E111G	+++	K92Q/E97G/V131A	+
L49P	+	E29G/T62A	+		
L59S	++	M43L/S58L	+++		
T62A	++	D56N/R153H	+++		
F75L	++	E73K/S174T	++		
T87A	++	L88F/A177T	+++		
I89T	++	L88P/S192P	++		
M93V	++	R185C/F203V	+++		
M93T	+				
T109A	+++				
E111G	+++				
E111K	+++				
V131M	++				
N138D	+				
A184V	++				
R185C	++				
R185S	+++				

* Positivkontrolle hat eine Vitalität von +++++.

Tab. 6: Zufallsmutanten und ihre Vitalität.

Alle in der Tabelle 6 enthaltenen Mutanten wurden mit der letzten Zufallsmutagenesemethode der normalen PCR eingeführt. Daraus kann gefolgert werden, dass durch die bereits getesteten Randommutageneseverfahren zu viele Mutationen eingeführt wurden, um noch funktionsfähige Enzyme zu erhalten.

Keine der Mutanten zeigt eine größere Vitalität als die Mutanten, die durch gerichtete Mutagenese erzeugt worden sind. Bemerkenswert ist jedoch, dass zum Teil die gleichen Aminosäuren mit der Zufallsmutagenese gefunden wurden, die auch bei der gerichteten Mutagenese ausgetauscht worden sind. Es wurden die Aminosäuren E111, R153 und R185 wieder gefunden. Nur die durch Randommutagenese generierte Mutante T109A weist eine ebenso große Vitalität auf, wie die Mutanten, die mit gerichteter Mutagenese erzeugt worden sind. Die Vitalität der Doppelmutante E111Q/V182M und der Einfachmutante R185A ist größer. Aus diesem Grund wurde eine Vierfachmutante T109A/E111Q/R185A/V182M mittels PCR erzeugt. Die Vitalität war geringer als bei den einzelnen Mutanten.

Die durch Zufallsmutagenese gefundenen Aminosäuren L59, T62, E97 und F203 sind absolut konserviert. Zu den konservierten Aminosäuren zählen M43, D56, S58, L88, V131, A177 und S192. Die Aminosäuren D56, S58, L59, T62, F75, V131, N138 und A184 sind zudem an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt.

Es wurde versucht, in ein synthetisches Gen Zufallsmutationen einzuführen. Es wurden Primer entwickelt, bei denen die Aminosäuren, die durch Zufallsmutagenese bzw. durch gerichtete Mutagenese gefunden wurden, durch NNN ersetzt wurden. Bei der Amplifikation entstehen jeweils Fragmente mit individuellen Mutationen. Die erzeugten mutierten *folE*-Gene konnten allerdings den Defekt der *Rib7*-Zellen nicht ausgleichen.

Ein weiterer Ansatz war die Entwicklung eines Systems, mit dem die Expression der mutierten GTP Cyclohydrolase I reduziert werden könnte, um so den *in vivo* Nachweis sensitiver gestalten zu können. Die Verwendung von low-copy Plasmiden, der Einsatz von schwächeren Promotoren bzw. der Gebrauch des Lac-Promotors mit einem Lac-Repressor-Gen auf einem Plasmid führte zu keinem Erfolg.

3.3 Das GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein

3.3.1 Das GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein aus Ratte

Zu Beginn der Arbeit an GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein (GFRP) aus Ratte lag der Klon XL1[pNCO113GFRP-R] (M. Gütlich) vor. Der Anteil von rekombinantem GFRP an der Gesamtproteinmenge des Rohextraktes betrug ca. 10 % (A. Herrmann, 1999).

Nach der Überexpression des GFRP in XL1-Zellen, wurde eine Hitzefällung bei 72 °C durchgeführt. Der Überstand wurde zuerst auf die Anionenaustauschsäule SepharoseQ-Fast Flow aufgetragen und mit einem Kaliumchloridgradienten bei einem Salzgehalt von 300 – 350 mM eluiert. Anschließend wurde das GFRP mittels Gelfiltrationschromatographie bis zur vollständigen Homogenität gereinigt.

3.3.1.1 Kristallisation von GFRP aus Ratte

Die Kristallisationsansätze und die Röntgenstrukturanalyse wurden von T. Lemm und G. Bader durchgeführt. GFRP aus Ratte kristallisierte bei einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml im Gelfiltrationspuffer (100 mM Kaliumphosphat, 2 mM DTE, pH 7,5). Über Nacht bildeten sich nadelförmige Kristalle mit der Abmessung von 0,1 x 0,1 x 1 mm³. Als Raumgruppe wurde P2₁2₁2 mit einem Pentamer pro asymmetrischer Untereinheit bestimmt. Zur Strukturlösung wurden die Schwermetallderivate der Verbindungen KAu(CN)₂ und K₂Pt(NO₂)₂(NH₃)₂ verwendet.

3.3.1.2 Kristallstruktur von GFRP

Die Struktur von GFRP wurde durch multiplen, isomorphen Ersatz bei einer Auflösung von 2,6 Å gelöst. Die Struktur bestätigt den Vorschlag Yoneyamas (1998), dass das GFRP ein Pentamer aus identischen Untereinheiten um eine fünfzählige Achse bildet. Jedes Monomer (Abb. 17), bei dem posttranslational das Methionin abgespalten wird, faltet zu einer α/β-Struktur mit einem dominierenden sechssträngigen antiparallelen β-Faltblatt.

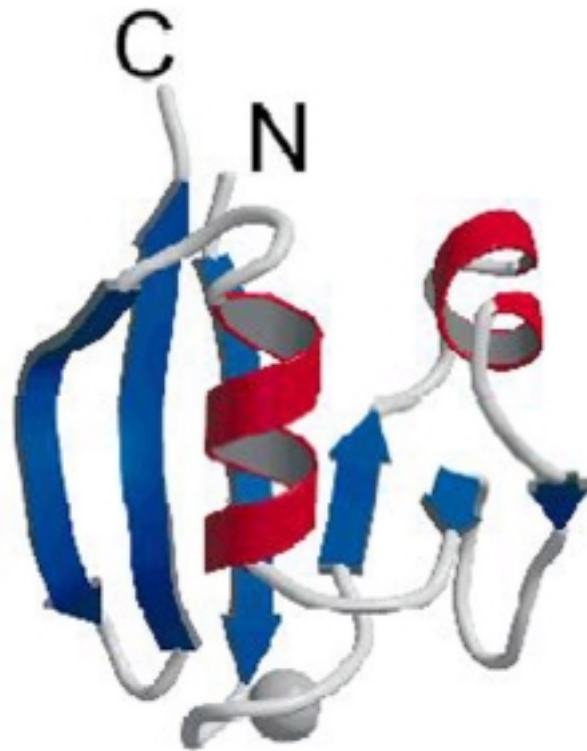


Abb. 17: Monomer des GFRP's aus Ratte. Das Metallion ist grau dargestellt.



Abb. 18: Pentamerstruktur von GFRP aus Ratte. Das Metallion ist grau dargestellt.

Das Pentamer (Abb. 18) bildet eine gekrümmte Scheibe mit einer konvexen und einer konkaven Seite, mit der Dimension von ungefähr $50 \times 50 \times 20 \text{ \AA}^3$. Zwischen den Strängen S2 und S3 ist eine kurze Helix (H1, Rest 25-30) und zwischen den Strängen S4 und S5 ist eine lange Helix (H2, Rest 52-60) eingeschoben (Abb. 19). Beide Helices liegen auf einer Seite

3.3.1.3 Charakterisierung des Metallions mit Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse des GFRP zeigt ein Metallion, dessen eindeutige Zuordnung nicht möglich war, jedoch wies die Größe des Metallions auf Calcium hin. In Zusammenarbeit mit F. Geistmann wurde eine Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TRFA) durchgeführt. Mittels der TRFA, die im Gegensatz zur Atomabsorptionsspektroskopie eine Multi-Elementanalyse ermöglicht, sollte eine Zuordnung erfolgen. Die Probe wurde in Form einer Lösung als homogene, dünne Schicht auf einen spiegelglatten Quarzträger aufgebracht und mit einem Röntgenstrahl durchleuchtet. Durch den ungewöhnlich flachen Einfallswinkel von weniger als einem Zehntel Grad wird die Probe der Länge nach durchstrahlt und zur Fluoreszenz angeregt. Jedes Element kann anhand seiner charakteristischen Linien unabhängig von allen anderen Elementen quantitativ und qualitativ bestimmt werden. Die Metalle, die von der TRFA nicht erfasst werden können (wie z. B. Na, Li), konnten aufgrund ihrer geringen Größe ausgeschlossen werden. Das erste Spektrum wies einen sehr großen Kalium-Peak auf, welcher vom Kaliumphosphatpuffer verursacht wurde. Daraufhin konnten alle in Frage kommenden Metalle bis auf Calcium, welches im Spektrum direkt neben dem Kalium-Peak liegt und so eventuell überdeckt wurde, ausgeschlossen werden. Die kaliumphosphatgepufferte Proteinlösung wurde auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75) aufgetragen, und das GFRP wurde mit 75 mM Tris/HCl pH 7,5 eluiert. Das TRFA-Spektrum dieser Proteinlösung zeigte weder einen Kalium- noch einen Calcium-Peak. Das Metallion konnte also nicht eindeutig bestimmt werden, doch es wird angenommen, dass es sich dabei um Kalium aus dem Kristallisationspuffer handelt. Maita *et al.* 2002 fanden in der Kristallstruktur des Komplexes aus GTP Cyclohydrolase I und GFRP aus Ratte ebenfalls ein Kaliumion, wobei der Kristallisationspuffer KCl enthielt (Maita *et al.*, 2002). Das GFRP reprimiert im Tris/HCl-Puffer die Aktivität der GTP Cyclohydrolase I von 135 auf 5 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Im Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) wurde durch den Zusatz von GFRP die GTP Cyclohydrolase I Aktivität von 135 auf 3 nmol min⁻¹ mg⁻¹ reduziert. Somit hat das Metallion keinen Einfluss auf die Regulierung der GTP Cyclohydrolase I Aktivität. Eine Kristallisation des GFRP's im Tris/HCl-Puffer und eine Untersuchung des Kristalls hinsichtlich eines Metallions steht noch aus.

3.3.1.4 Punktmutagenese von GFRP aus Ratte

Es sollten Aminosäuren am GFRP ausgetauscht werden, um deren Bedeutung für die Metallbindung bzw. Komplexbildung zu untersuchen. Es handelt sich dabei, um die Mutanten T8V, K36E, R37E und die Doppelmutante K36E/R37E. Der Sauerstoff der Seitenkette von Threonin 8 könnte das Metallion koordinieren. Lysin 36 und Arginin 37 sind an dem Loop beteiligt, der vom Pentamer absteht und zur Komplexbildung beitragen könnte (Abb. 15).

3.3.1.4.1 Mutagenisierungsstrategien für den Austausch T8V

Threonin 8 sollte gegen Valin ersetzt werden. Um die Mutation in das GFRP-Gen einzuführen, wurde eine zweistufige PCR-Strategie eingesetzt. In der ersten PCR wurde als Template der Vektor pNCO113GFRP-R und der Mutationsprimer GFRP-R-BclI-T8V (Tab. 14, Anhang) sowie der korrespondierende Primer GFRP-H-PstI-r (Tab. 15, Anhang) eingesetzt (Abb. 20). Mit dem Primer GFRP-H-PstI-r wird nach dem Stopcodon die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Pst*I erzeugt. Die zweite PCR wurde mit dem Vektorprimer UniEcoRI (Tab. 12, Anhang) und dem korrespondierenden Primer GFRP-H-PstI-r durchgeführt. Das DNA-Fragment wurde dann mit den Restriktionsenzymen *Eco*R I und *Pst* I verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113 ligiert. Mit dem Plasmid pNCO113GFRP-R-T8V wurden dann *E. coli*-XL1 Zellen transformiert. Die Einführung der Mutation wurde mit einer DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Da in den *E. coli*-XL1 Zellen keine Expression erzielt werden konnte, wurden M15[pREP4] Zellen mit dem Vektor transformiert. Eine Expression blieb aus.

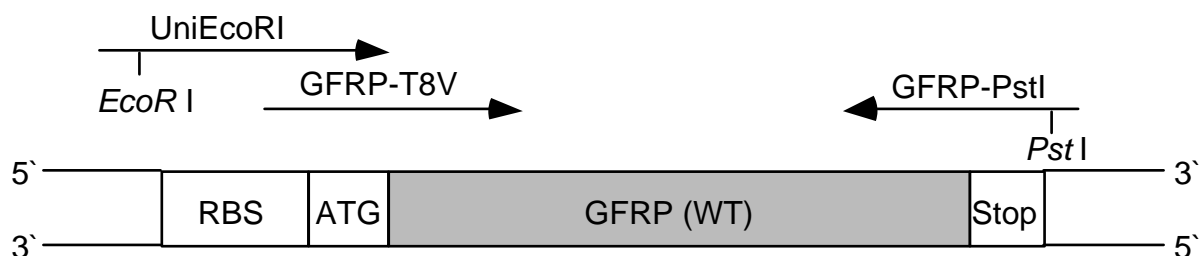


Abb. 20: Mutationsstrategie für GFRP-R-T8V.

3.3.1.4.2 Mutagenisierungsstrategien für die Austäusche K36E, R37E und K36E/R37E

Zur Generierung der Punktmutanten K36E, R37E und der Doppelmutante K36E/R37E wurde nach einem Verfahren von M. Fischer (1997) vorgegangen. Das hier angewandte Mutageneseverfahren benötigt drei PCR's. Für diese Mutationstechnik sind jeweils vier Primer (Abb. 21) notwendig, wobei aber nur einer genspezifisch (M3: GFRP-R-MluI-K36E, GFRP-R-MluI-R37E, GFRP-R-MluI-K36E/R37E) (Tab. 14, Anhang) sein muss, während die übrigen (M1 (UniEcoRI) (Tab. 12, Anhang), M2 (Uni ohne EcoRI) (Tab. 12, Anhang), M4(GFRP-PstI-r) (Tab. 15, Anhang) universell eingesetzt werden können. Der genspezifische M3-Primer trägt die einzuführende Mutation sowie eine spezifische Schnittstelle S3, anhand derer die Identifizierung der Mutation möglich ist. Die Universalprimer sind so konstruiert, dass nur die mutierten DNA-Fragmente zur Ligation in den Expressionsvektor imstande sind. Nur die mutierten Amplifikate verfügen neben der *Pst* I Schnittstelle (S4) über eine zusätzliche Klonierungsschnittstelle *EcoR* I (S2). Die nicht mutierten DNA-Fragmente enthalten wegen dem nicht bindenden Überhang von M2 nur die S4 Schnittstelle.

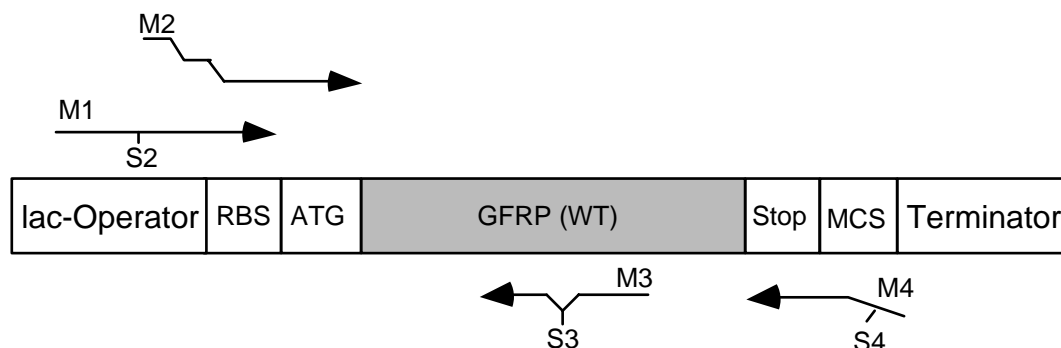


Abb. 21: Mutationsstrategie zur Generierung der Mutanten K36E, R37E und K36E/R37E.

Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Pst* I verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113 ligiert. Zunächst wurden *E. coli*-XL1 Zellen mit den Plasmiden pNCO113-GFRP-R-K36E, pNCO113-GFRP-R-R37E und pNCO113-GFRP-R-K36E-R37E transformiert. Die Einführung der Mutation wurde mit DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Da in den XL1-Zellen keine Expression erfolgte, wurden M15[pREP4]-Zellen getestet. Die Proteine konnten nicht exprimiert werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die eingeführten Mutationen eine Faltung verhindern und das Protein aufgrund seiner geringen Größe sofort abgebaut wird.

3.3.2 Das humane GFRP

Das GFRP aus Ratte (GFRP-R) erkennt die humane GTP Cyclohydrolase I sowie die humane Deletionsmutante $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I, der am N-Terminus 41 Aminosäuren fehlen. Es sollte untersucht werden, ob das humane GFRP (GFRP-HS) ebenfalls einen Komplex mit der Deletionsmutante bildet. Ein Aminosäuresequenzvergleich ergab eine nahezu vollkommene Übereinstimmung (94 %) (Abb. 19) zwischen dem humanen GFRP und dem aus Ratte.

3.3.2.1 Klonierung des humanen GFRP

Das humane GFRP-Gen wurde synthetisch unter Einsatz der PCR aufgebaut. Dazu wurden Oligonukleotide (Tab. 15, Anhang) eingesetzt, die sich jeweils mit ca. 25 Basen überlappen (Abb. 22). Die forward-Primer erhielten ungerade und die reverse-Primer geraden Ziffern. Beim Primerdesign wurde darauf geachtet, dass die regulatorischen Codons für *E. coli* so wenig wie möglich zum Einsatz kamen. Zudem wurden zusätzliche Schnittstellen eingefügt, um den Einbau von Mutationen zu erleichtern. Beginnend in der Mitte des zu synthetisierenden Gens mit den Primern HSGFRP-1 und HSGFRP-2 wurde das erste Fragment amplifiziert. Dieses DNA-Stück wurde dann mit den Primerkombinationen HSGFRP-3/HSGFRP-4, HSGFRP-5/HSGFRP-6 und HSGFRP-7/HSGFRP-6 vervollständigt. Durch die letzten beiden Primer wurden die Schnittstellen *EcoR* I und *Bam*HI eingeführt. Zur Amplifikation des synthetischen Gens wurde eine Annealingtemperatur von 48 °C gewählt. Die Anzahl der Zyklen wurde auf 20 beschränkt, um unerwünschte Mutationen möglichst zu vermeiden. Zudem wurden die PCR's –abgesehen von der Letzten– mit einer Polymerase, die über Exonucleaseaktivität verfügt und damit Korrekturlesen kann, durchgeführt, um unerwünschte Mutationen zu reduzieren. Das synthetische Gen wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Bam*HI geschnitten und in einen entsprechend restringierten pNCO113 ligiert. Mit dem Plasmid pNCO113-GFRP-HS wurden *E. coli*-XL1 Zellen transformiert. Der Anteil von rekombinantem GFRP an der Gesamtproteinmenge des Rohextraktes betrug ca. 15 %. Die Sequenz wurde durch eine DNA-Sequenzanalyse auf ihre Richtigkeit überprüft.

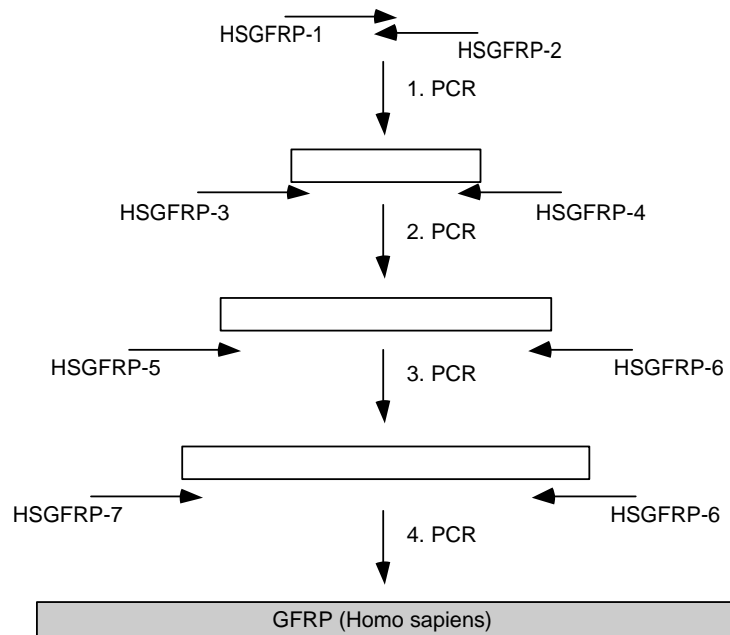


Abb. 22: Synthesestrategie für das humane GFRP-Gen.

3.3.2.2 Reinigungsstrategie für das humane GFRP

Für die Reinigung des humanen GFRP's wurde wie beim GFRP aus Ratte zuerst eine Hitzefällung bei 65 °C durchgeführt. Die hitzegefällte Proteinlösung wurde mit einer SepharoseQ-Fast Flow bis zur vollständigen Homogenität gereinigt. Das Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von 110 bis 130 mM KCl. Die Reinigungsschritte wurden mittels SDS-Page dokumentiert (Abb. 23).

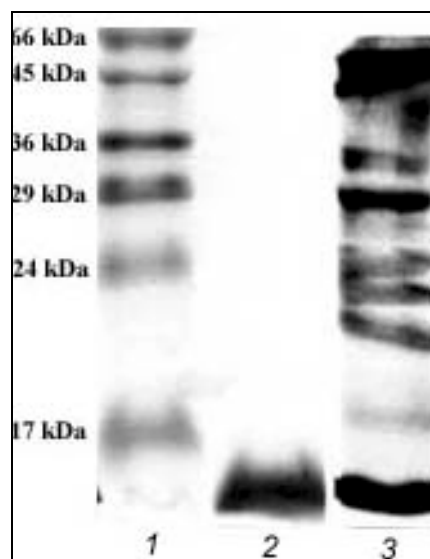


Abb. 23: SDS-Page zur Reinigung des humanen GFRP's. 1) Molekulargewichtsstandard, 2) GFRP-HS nach SepharoseQ-Fast Flow, 3) Rohextrakt von XL1[pNCO113-GFRP-HS].

3.3.2.3 Erkennung der humanen $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I durch das humane GFRP

Durch die Bestimmung der spezifischen Aktivität der humanen GTP Cyclohydrolase I mit und ohne GFRP kann festgestellt werden, ob das humane GFRP die humane $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I erkennt. Es wurden 2,8 μM humane $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I mit 100 mM GTP, 400 μM BH_4 und 6,6 μM humanes GFRP in 100 mM Tris/HCl pH 8 bei 37 °C inkubiert. Der Vergleichsansatz enthielt weder BH_4 noch GFRP. Gemessen wurde die Bildung von Dihydroneopterintriphosphat durch Bestimmung der Extinktionszunahme bei 330 nm. Die $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I zeigte eine spezifische Aktivität von 135 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ im Vergleich zu 3 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ in Anwesenheit von BH_4 und GFRP. Das humane GFRP ist somit in der Lage, die humane $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I zu reprimieren.

3.3.2.4 Untersuchungen zur Bestimmung der Ausrichtung des GFRP

Nachdem das GFRP, ebenso wie die GTP Cyclohydrolase I, eine C_5 -Symmetrie aufweist und von Yoneyama (1998) für den Komplex eine Sandwichstruktur vorgeschlagen wurde, sollte untersucht werden, ob die konvexe oder die konkave Seite des GFRP an der Bindung mit der GTP Cyclohydrolase I beteiligt ist. Dazu wurden zuerst die elektrostatischen Potentiale der Oberflächen des GFRP's mit denen der GTP Cyclohydrolase I verglichen. Die relevante Seite der GTP Cyclohydrolase I (Auerbach *et al.*, 2001) ist überwiegend positiv geladen. Die konvexe Seite des GFRP ist ebenfalls positiv geladen, während die konkave Seite ein neutrales bis negatives Oberflächenpotential aufweist (Abb. 24). Es ist daher anzunehmen, dass die GTP Cyclohydrolase I mit der konkaven Seite des GFRP's in Wechselwirkung steht. G. Bader erhielt durch Docking-Experimente mit FTDOCK (Gabb *et al.*, 1997) bei denen er versuchte, GFRP aus Ratte an ein aus den Resten 57-250 bestehendes Modell der humanen GTP Cyclohydrolase I zu docken, ein Modell mit dem erwarteten Bindungsmodus (Abb. 15). In diesem Modell bindet der abstehende Loop zwischen den Faltblättern S3 und S4 jeweils eine Spalte, die von zwei benachbarten GTP Cyclohydrolase I Monomeren gebildet wird. Die drei nicht konservierten Aminosäuresubstitutionen in der Rattensequenz (Abb. 21), verglichen zur humanen Sequenz, sind nicht Teil dieser vermuteten Kontaktfläche. Dies weist darauf hin, dass der Regulationsmechanismus in Ratte und Mensch identisch ist.

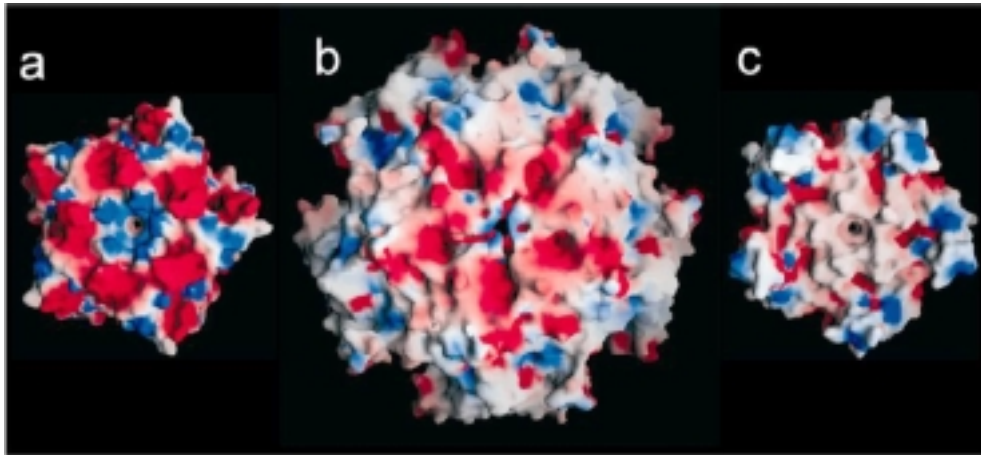


Abb. 24: Elektrostatische Potentiale an der konvexen Oberfläche des GFRP-Pentamers (a), an der Oberfläche der humanen GTP Cyclohydrolase I (b) und an der konkaven Oberfläche des GFRP Pentamers (c).

Der N-Terminus und der C-Terminus des GFRP liegen beide auf der konvexen Seite. An den N-Terminus sollte das Calmodulin-Binding-Peptide (CBP) fusioniert werden. Zwischen dem CBP, einem 21 Aminosäure langen C-terminalen Fragment der leicht-kettigen Myosinkinase, und dem humanen GFRP wurde ein 15 Aminosäure langer Linker eingebaut. Das CBP-Linker-Fragment würde demzufolge von der konvexen Seite des GFRP abstehen und so eine Wechselwirkung dieser Seite mit der GTP Cyclohydrolase I verhindern. Würde dieses Fusionsprotein eine Regulierung der GTP Cyclohydrolase I beim Enzymtest bewirken, könnte man daraus schließen, dass die konkave Seite des GFRP an die GTP Cyclohydrolase I bindet.

3.3.2.4.1 Klonierung des CBP-GFRP-HS

Zur Klonierung des humanen CBP-GFRP wurde eine PCR mit dem zweiten Amplifikat aus der Gensynthese und den Primern HSGFRP-5/HSGFRP-6 (Tab. 15, Anhang) durchgeführt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *BamH* I und *Hind* III verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113-CBP (von M. Fischer), der das CBP bereits enthielt, ligiert. Mit dem Vektor pNCO113-CBP-GFRP-HS wurden XL1-Zellen transformiert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde mit DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Der Anteil von rekombinantem CBP-GFRP an der Gesamtproteinmenge des Rohextraktes betrug ca. 20 %.

3.3.2.4.1.1 Reinigungsstrategie des humanen CBP-GFRP

Bei der Reinigung des humanen CBP-GFRP's (CBP-GFRP-HS) wurde der relativ hohe pI von 9,84 (pI von GFRP: 6,08) ausgenutzt. Der pI wurde mit dem Sequenzverarbeitungsprogramm OMIGA ermittelt. Es wurde eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Der Zellextrakt wurde auf eine Sepharose SP Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 auf 1 M Kaliumchlorid (pH 7,5) wurde das Protein eluiert. Das rekombinante Protein eluierte bei einer Kaliumchloridkonzentration von 180 – 360 mM. Die Reinigung wurde mittels SDS-Page detektiert (Abb. 25). Zum Vergleich wurde neben dem CBP-GFRP-HS auch das GFRP-HS aufgetragen. Das CBP-GFRP-HS hat eine Molmasse von 12,6 kDa, im Gegensatz zum GFRP-HS mit 9,7 kDa. Das CBP-GFRP-HS konnte bis zur vollständigen Homogenität gereinigt werden.

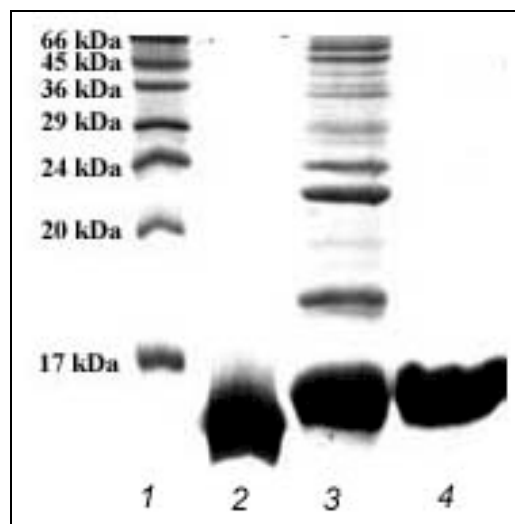


Abb. 25: SDS-Page zur Reinigung von CBP-GFRP-HS. 1) Molekulargewichtsstandard, 2) GFRP-HS, 3) Rohextrakt von XL1[pNCO113-CBP-GFRP-HS], 4) CBP-GFRP-HS nach der Sepharose SP Säule.

3.3.2.4.1.2 Erkennung der humanen GTP Cyclohydrolase I durch das CBP-GFRP-HS

Das gereinigte CBP-GFRP-Human wurde einer Aminosäuresequenzanalyse unterzogen. Es zeigte sich, dass das CBP beim Reinigungsprozess abgespalten wurde. Es waren nur noch 17 Aminosäuren des Linkers am GFRP-HS gebunden. Das verkürzte CBP-GFRP-HS wurde in einem Enzymtest mit der humanen $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I eingesetzt. Der Ansatz enthielt 400 μ M BH₄, 100 μ M GTP, 2,8 μ M GTP Cyclohydrolase I und 6 μ M CBP-GFRP-HS. Das verkürzte CBP-GFRP-HS war in der Lage die $\Delta 42$ His GTP Cyclohydrolase I zu erkennen. Die spezifische Aktivität der GTP Cyclohydrolase I wurde durch das CBP-GFRP-HS von 135 nmol min⁻¹ mg⁻¹ auf 7 nmol min⁻¹ mg⁻¹ reduziert (Tab. 7).

3.3.2.4.2 Klonierung des Hisactophilin-GFRP-HS

Um sicherzustellen, dass die N-terminale Verlängerung groß genug ist, um eine Komplexbildung mit dieser Seite des GFRP-Pentamers zu verhindern, wurde Hisactophilin, ein 119 Aminosäure großes Protein aus *Dictyostelium discoideum*, an den N-Terminus des GFRP-HS kloniert.

Um das Hisactophilin an das humane GFRP zu fusionieren, wurde ein pNCO113 mit Hisactophilin (M. Fischer) verwendet. Der pNCO113-CBP-GFRP-HS wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Hind* III verdaut. Das geschnittene GFRP-HS-Fragment wurde in einen entsprechend restringierten pNCO113-Hisacto ligiert. Mit dem pNCO113-Hisacto-GFRP-HS wurden XL1-Zellen transformiert. Der Anteil von rekombinantem Hisacto-GFRP-HS an der Gesamtproteinmenge des Rohextraktes betrug ca. 30 %.

3.3.2.4.2.1 Reinigungsstrategie für Hisactophilin-GFRP-HS

Aufgrund von drei Histidinen an der Oberfläche des Hisactophilins kann bei der Reinigung auf eine Ni-NTA-Säule zurückgegriffen werden. Das Fusionsprotein eluierte bei 500 mM Imidazol. Zur Entfernung des Imidazols wurde gegen 50 mM Tris/HCl pH 8 dialysiert. Ein weiterer Reinigungsschritt war nicht erforderlich. Die Reinigung wurde mittels SDS-Page detektiert (Abb. 26).

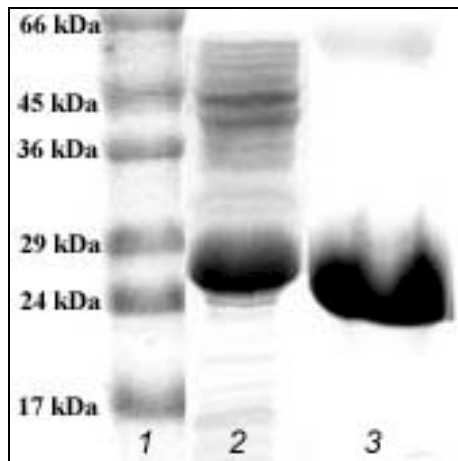


Abb. 26: SDS-Page zur Reinigung von Hisacto-GFRP-HS. 1) Molekulargewichtsstandard, 2) Rohextrakt von XL1[pNCO113-Hisacto-GFRP-HS], 3) Hisacto-GFRP-HS nach Ni-NTA-Säule.

3.3.2.4.2.2 Erkennung der humanen GTP Cyclohydrolase I durch das Hisactophilin-GFRP-HS

Es ergab sich eine Regulierung der spezifische Aktivität von $135 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ auf $10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Tab. 7). Das gereinigte Fusionsprotein zeigte die gleichen regulatorischen Eigenschaften wie das CBP-GFRP-HS. Daraus kann gefolgert werden, dass das GFRP mit seiner konkaven Seite an die GTP Cyclohydrolase I bindet, da diese sowohl bei CBP-GFRP-HS als auch bei Hisacto-GFRP-HS noch frei zugänglich ist. Dies stimmt mit den Röntgenstrukturdaten überein, die Maita vom Komplex aus GFRP mit GTP Cyclohydrolase I und Phenylalanin erhielt (Maita *et al.*, 2002).

GFRP	BH ₄ [μM]	Spez. Aktivität von $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I [$\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$]
-	-	135
GFRP-R	400	3
GFRP-HS	400	3
CBP-GFRP-HS	400	7
Hisacto-GFRP-HS	400	10

Tab. 7: Die spezifischen Aktivitäten der $\Delta 42\text{His}$ GTP Cyclohydrolase I in Abhängigkeit der verschiedenen GFRP's.

3.3.3 Das GFRP aus *G. gallus*

Die Sequenz des GFRP von *G. gallus* war bislang noch unbekannt. Für *in situ* Hybridisierungsexperimente wurde das GFRP-Gen von *G. gallus* in den Vektor pBluescript kloniert. Es wurde aus der m-RNA von Hirn aus *G. gallus* die c-DNA mittels reverser Transkription hergestellt. Da das Alignment des GFRP's von *R. norvegicus*, *H. sapiens* und *M. musculus* eine Übereinstimmung von 84 % aufweist, war die Wahrscheinlichkeit einer großen Sequenzhomologie zu *G. gallus* recht hoch. Es wurden degenerierte Oligonukleotide in besonders konservierten Sequenzbereichen positioniert, die alle Codons der jeweiligen Aminosäuren enthielten. Es wurden sechs degenerierte Oligonukleotide wobble 1 bis wobble 6 (Tab. 13, Anhang) konstruiert, die das gesamte GFRP-Gen abdecken. Es wurde getestet, ob sich die cDNA von *G. gallus* mit verschiedenen Kombinationen der forward und reverse Primer amplifizieren lässt. Die Primerkombination wobble-1 und wobble-5 (Abb. 27) führte zu einem 213 Bp langen DNA-Fragment. Dieses Amplifikat wurde mit seinen von der Polymerase angefügten A-Überhängen in einen pBluescript mit T-Überhängen ligiert. Mit dem pBluescript-GFRP-G wurden *E. coli*-XL1 Zellen transformiert. Das isolierte Plasmid wurde sequenziert. Das amplifizierte Fragment zeigte große Homologie zu den GFRP's der anderen Organismen (Abb. 19). Die letzten Aminosäuren konnten nicht bestimmt werden, da der wobble-5 Primer ein vom Stopcodon her eingerückter Primer ist. Die Aminosäuren die die wobble 1 und wobble 5 Primer überspannen, konnten nicht exakt bestimmt werden, da die Primer die Aminosäuresequenz vorgeben.

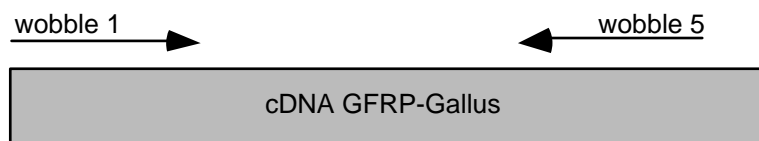


Abb. 27: Sequenzbestimmung des GFRP's aus *G. Gallus*.

Zur Herstellung von Proben für die *in situ* Hybridisierung wurde mit Hilfe der PCR unter Verwendung der beiden Primer GFRP-G-KpnI (Tab. 13, Anhang) und GFRP-G-SacI (Tab. 13, Anhang) ein 156 Bp langes Fragment des GFRP's von *G. Gallus* amplifiziert und in den Vektor pBluescript-SK (Stratagene) ligiert. Mit dem so erhaltenen Vektor konnten im Labor von Y. Ben Shaul (Tel Aviv, Israel) von C. Krieger Digoxigenin markierte Proben für die *in situ* Hybridisierung hergestellt werden.

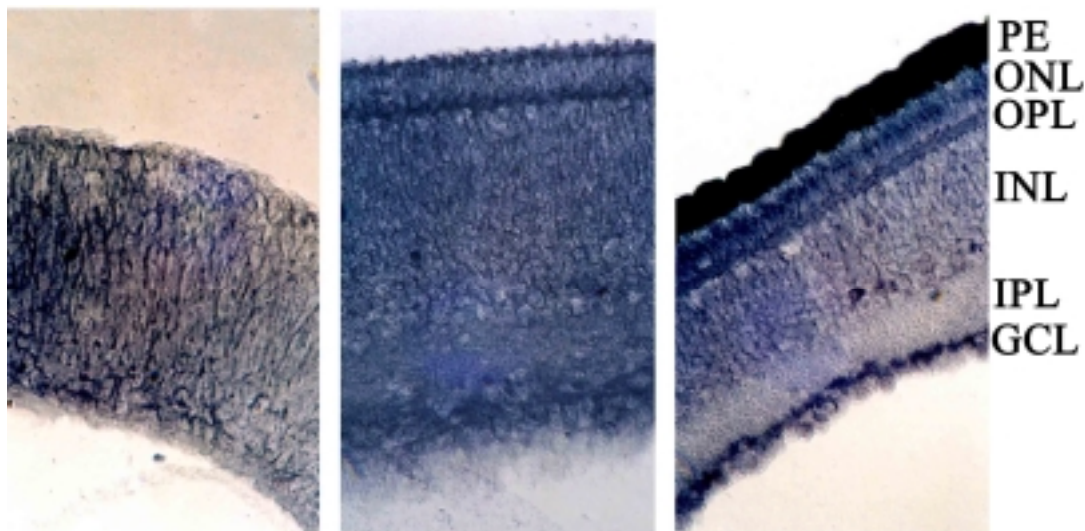


Abb. 28: Lokalisation von GFRP mRNA in embryonaler Hühnerretina durch *in situ* Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Proben nach 7, 11 und 18 Tagen. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; PE, pigmented epithelium.

Abb. 28 zeigt die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Proben an Hühner-Retina am Tag 7, 11 und 18. Erst ab Tag 18 ist zu erkennen, dass die GFRP-mRNA überwiegend in den Ganglionzellen und im pigmented epithelium exprimiert wird, während sie in der inner plexiform layer nicht auftritt und in der inner nuclear layer teilweise vorhanden ist.

Durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem GFRP aus Ratte konnten im Labor von Y. Ben Shaul polyklonale Antikörper gegen das GFRP hergestellt werden. Mit diesen Antikörpern wurden Immunhistochemische Untersuchungen an Retina von Hühnern in verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt. Das GFRP-Protein wird am deutlichsten in der Schicht der Photorezeptoren und in der inneren Ganglionschicht bei der älteren Retina exprimiert.

3.4 Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

3.4.1 Identifizierung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

Zu Beginn der Arbeit lag der Klon XL1[pNCO113-MJM-WT] von M. Fischer vor. Es handelt sich um den offenen Leserahmen MJ0055 aus *M. jannaschii*, der als synthetisches Gen in den Vektor pNCO113 kloniert wurde. Der offene Leserahmen wies eine 29 %ige Homologie zu der DS aus *E. coli* auf. Zuerst wurde das Genprodukt dieses Klons auf DS-Aktivität überprüft. Die von Richter *et al.* (1993) chemisch erzeugte *E. coli* Mutante *Rib5* hat einen Defekt im Gen für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase, so dass keine Biosynthese von Riboflavin stattfindet. Die *E. coli* Mutante wächst deshalb nicht ohne externe Zufuhr von Riboflavin. Es wurde getestet, ob das Gen aus *M. jannaschii* in der Lage ist, den Defekt zu prototrophieren. Dazu wurden mit dem Plasmid pNCO113-MJM-WT elektrokompetente *Rib5* Zellen transformiert und auf Platten mit Ampicillin aber ohne Riboflavin ausgestrichen. Es bildeten sich Kolonien. Der offene Leserahmen codiert für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase. Da in einigen Organismen die DS und die GTP Cyclohydrolase II als bifunktionelle Enzyme auftreten, wurde auf GTP Cyclohydrolase II Aktivität getestet. Das Gen aus *M. jannaschii* codiert für eine monofunktionelle DS.

3.4.2 Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat synthase

Zellextrakt aus *E. coli* XL1[pNCO113-MJM-WT] wurde mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 2 M versetzt. Präzipitierte Proteine wurden abgetrennt und der Überstand wurde auf eine Phenyl Sepharose Säule aufgetragen. Es wurde eine Batchelution mit 30 mM Kaliumphosphat pH 7 durchgeführt. Die Fraktionen mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase wurden dann auf eine Hydroxylapatit Säule aufgetragen. Bei einem Gradienten von 20 mM auf 1 M Kaliumphosphat eluiert die DS im Bereich einer Salzkonzentration von 180 - 220 mM Kaliumphosphat (Abb. 29). Auf diese Weise konnte die DS bis zur vollständigen Homogenität gereinigt werden (Abb. 30). Das Ergebnis der Reinigung ist in Tab. 8 aufgezeigt.

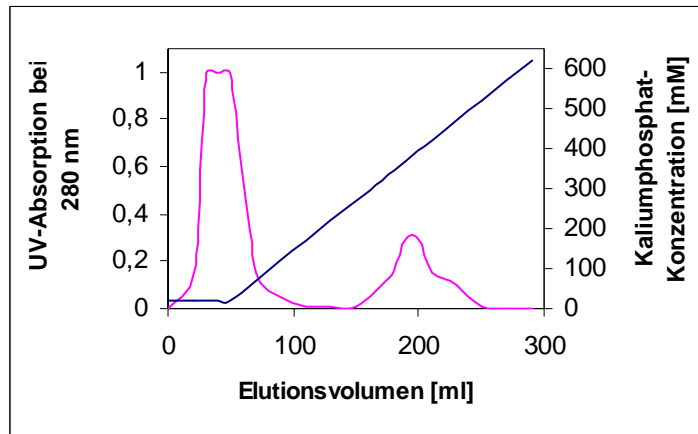


Abb. 29: Elutionsprofil der Hydroxylapatit Säule zur Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.

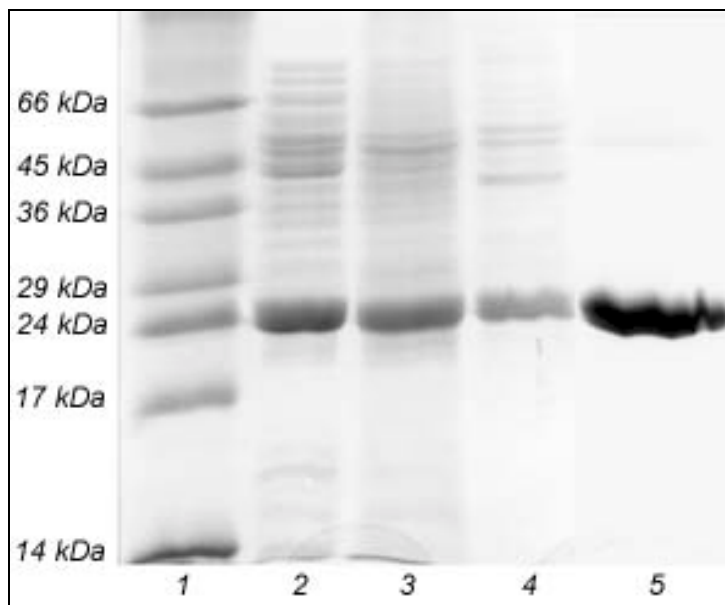


Abb. 30: SDS-Page zur Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase. 1) Molekulargewichtsstandard, 2) Rohextrakt von XL1[pNCO113-MJM-WT], 3) DS nach Ammoniumsulfatfällung, 4) DS nach Phenyl Sepharose Säule, 5) DS nach Hydroxylapatit Säule.

	Gesamtprotein [mg]	Spez. Aktivität [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	Aus- beute	AF
Rohextrakt	244	20	100	1
Ammoniumsulfatfällung	123	35	66	1,8
Phenyl Sepharose	82	70	50	3,5
Hydroxylapaptit Säule	25	148	42	7,4

Tab. 8: Ergebnis der Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii*.

3.4.3 Molekulargewicht der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat synthase

Dem gereinigten Protein konnte mittels Elektronenspray-Massenspektrometrie (Mann *et al.*, 1995) eine Masse von 25.799 Da zugeordnet werden. Diese stimmt sehr gut mit der berechneten Masse von 25.796 Da überein. Es findet folglich keine posttranslationale Abspaltung von Methionin statt. Dies konnte durch eine N-terminale Sequenzbestimmung mittels Edman Abbau verifiziert werden. Es ergab die Aminosäuresequenz MNNVEKAIEALKKGE, die dem N-Terminus der DS entspricht.

Für die DS wurde mittels Gelfiltration eine dimere Struktur ermittelt. Diese dimere Struktur konnte von G. Richter für das Wildtypenzym und die Mutantenproteine E26S und H164S durch Sedimentations-Gleichgewichts-Zentrifugation bestätigt werden. Die Sedimentations-Gleichgewichts-Zentrifugation ergab für das Wildtypprotein ein Molekulargewicht von 58.066 Da.

3.4.4 Bestimmung der Konfiguration von 3,4-Dihydroxy-2-butanon

Es wurde ein CD-Spektrum von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat, dem Produkt der DS aus *M. jannaschii* nach Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase, aufgenommen (Abb. 31). Dieses CD-Spektrum wurde mit dem CD-Spektrum von synthetisch hergestelltem D-3,4-Dihydroxy-2-butanon und L-3,4-Dihydroxy-2-butanon, produziert von der DS aus *C. guilliermondii* (Volk *et al.*, 1990) und *E. coli*, verglichen. Daraus folgt, dass das Enzymprodukt der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii* L-Konfiguration besitzt und damit Archaeen, Bakterien und Pilze das gleiche Intermediat als Vorstufe für den Xylenring des Riboflavins haben.

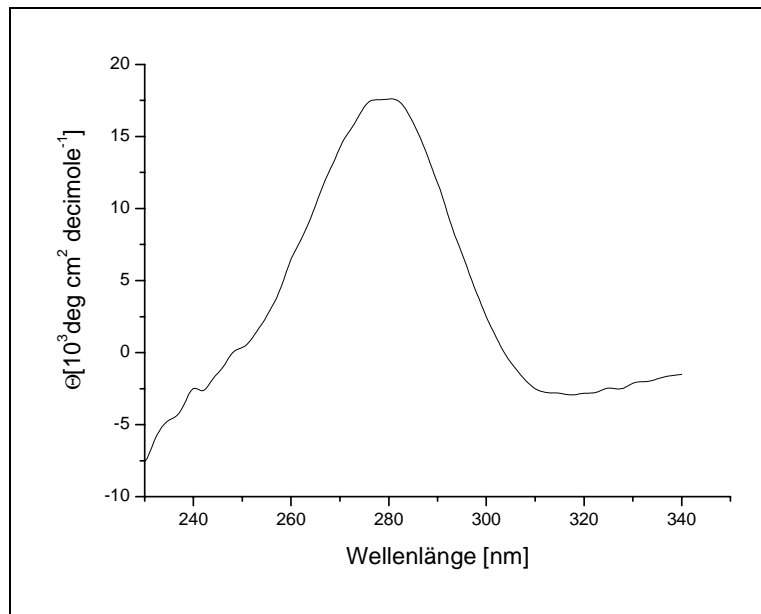


Abb. 31: CD-Spektrum von L-3,4-Dihydroxy-2-butanon.

3.4.5 Struktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

3.4.5.1 Kristallisation der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

Die Kristallisationsansätze und die Röntgenstrukturanalyse der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii* wurden von S. Steinbacher durchgeführt. Die DS kristallisierte bei einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml. Dazu wurde eine Lösung, bestehend aus 350 mM Kaliumphosphat, 2 mM Zinkacetat (pH 7,2) und dem Protein mit einer gleichen Menge einer Lösung, bestehend aus 100 mM Tris/HCl, 200 mM Calciumacetat und 18 % PEG 1000 (pH 7,5), gemischt. Als Raumgruppe wurde P2(1) mit $a = 53.2 \text{ \AA}$, $b = 69.3 \text{ \AA}$ und $c = 57.1 \text{ \AA}$ und $\beta = 93.5^\circ$ für die Mutante H147S bestimmt.

3.4.5.2 Kristallstruktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

Die Struktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase wurde durch multiplen, isomorphen Ersatz bei einer Auflösung von $1,7 \text{ \AA}$ gelöst. Die homodimere DS ist ein $\alpha + \beta$ Protein mit C_2 -Symmetrie. Die C- und N-Termini der DS liegen weit weg von der Kontaktstelle der beiden Monomere. Jedes Monomer weist zehn α -Helices und sieben antiparallele β -Faltblätter auf (Abb. 32). Die DS besitzt zwei aktive Zentren, die nicht direkt an

der Kontaktstelle der beiden Monomere liegen. In der aktiven Tasche ist ein Zink und ein Calcium lokalisiert. Zwischen den Faltblättern S1 und S2 befindet sich ein Loop (Aminosäuren: 22 – 27) bestehend aus hoch konservierten polaren Aminosäuren (siehe Abb. 33). Dieser Loop stellt einen Teil des aktiven Zentrums dar. Am aktiven Zentrum sind noch die konservierten Aminosäuren Aspartat 21, Serin 22, Glutamat 28, Aspartat 30, Tyrosin 95, Arginin 161, Histidin 164, Threonin 165 und Glutamat 185 beteiligt. Die Reste Histidin 164 und Threonin 165 sind Teil der α -Helix H8, die zwischen den antiparallelen β -Faltblättern S5 und S6 eingeschoben ist. Glutamat 185 liegt auf dem β -Faltblatt S6. Histidin 147 ist ebenfalls am aktiven Zentrum beteiligt, ist aber auf dem β -Faltblatt S5 des anderen Monomers lokalisiert.

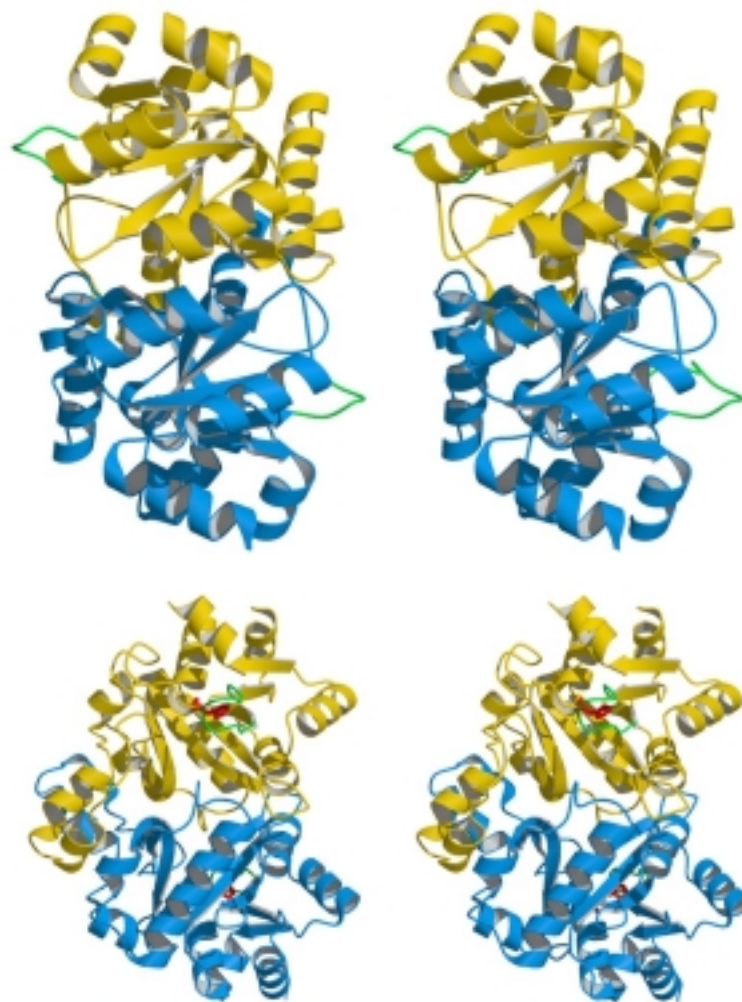


Abb. 32: Kristallstruktur der DS aus *M. jannaschii*. Der polare Loop ist grün markiert.

3.4.6 Auswahl der katalytisch essentiellen Aminosäuren

Um das aktive Zentrum, das durch die Röntgenstruktur postuliert wurde, näher bestimmen zu können, sollten Punktmutanten der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase mittels gerichteter Mutagenese generiert werden. Bei der Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren wurde auf Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse sowie auf NMR-Daten (Kelly *et al.*, 2001) zurückgegriffen. Die NMR-Daten beziehen sich nur auf das Enzym aus *E. coli*, während die Röntgenstrukturdaten mit der DS aus *M. jannaschii* (Steinbacher *et al.*, unveröffentlicht) und *E. coli* (Liao *et al.* 2001, 2002) ermittelt wurden. Ein Alignment, das die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthasen aus 54 verschiedenen Organismen berücksichtigt, wies 36 konservierte Aminosäuren auf. Um ein überschaubares Alignment zu erhalten, wurde jeweils nur ein Vertreter von Pflanzen, Pilzen, Archaeobakterien, gram-positiver und gram-negativer Bakterien mit einbezogen (Abb. 33). Es zeigte sich eine 29 %ige Identität zwischen der DS aus *E. coli* und *M. jannaschii*.

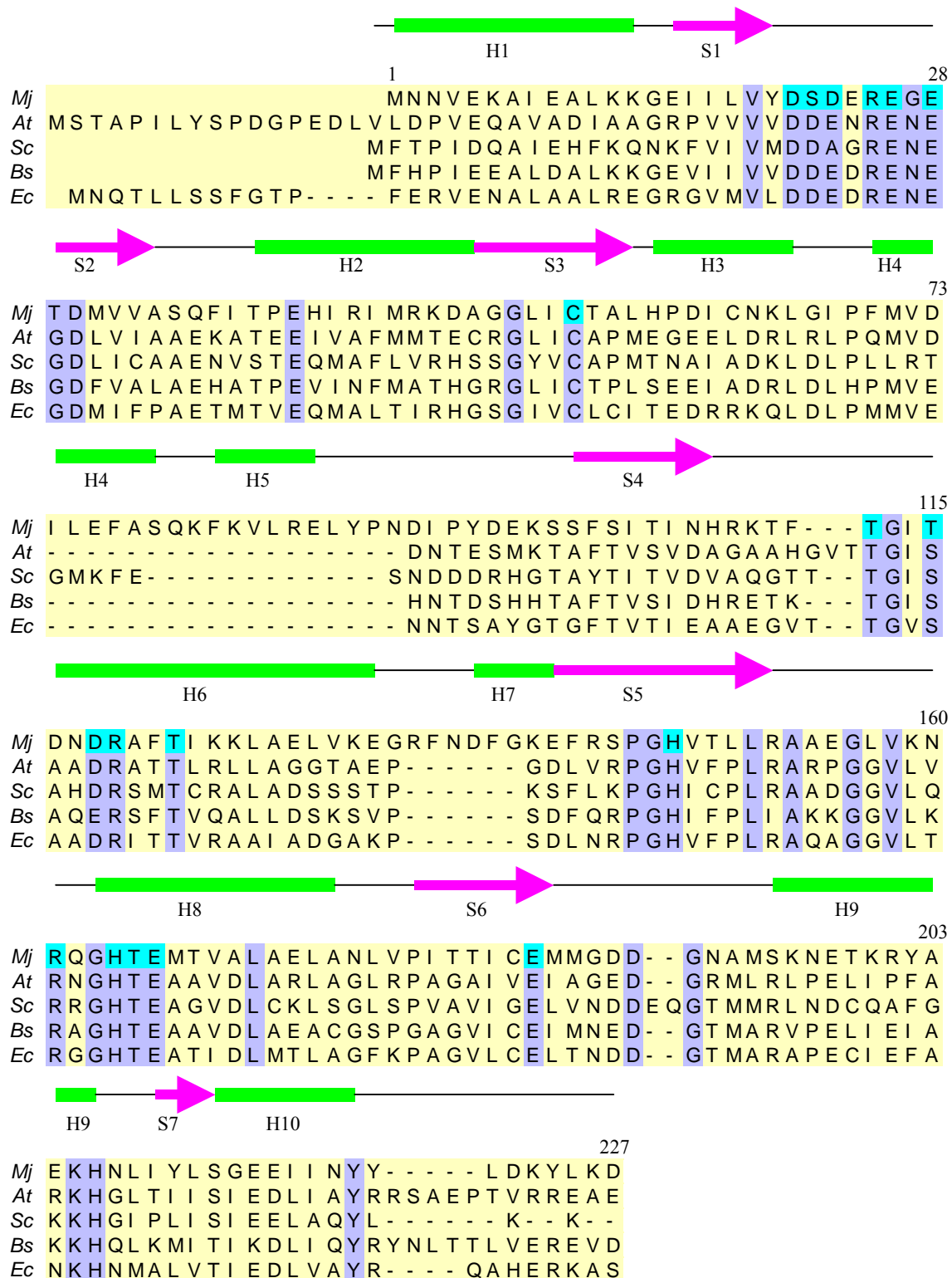


Abb. 33: Proteinalignment von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthasen aus *A. thaliana* (*At*), *B. subtilis* (*Bs*), *E. coli* (*Ec*), *S. cerevisiae* (*Sc*) und *M. jannaschii* (*Mj*). Bei den DS aus *A. thaliana* und *B. subtilis* handelt es sich um bifunktionelle Enzyme, von denen nur die DS-Domäne aufgeführt wurde. Die konservierten Aminosäuren sind lila unterlegt und die mutierten Aminosäuren sind blau unterlegt. Über dem Alignment ist die Sekundärstruktur der DS aus *M. jannaschii* abgebildet (grüne Balken kennzeichnen die Helices, während die pinkfarbenen Pfeile für die β -Faltblätter stehen).

In die Mutagenese wurden nur streng konservierte Aminosäuren einbezogen, die strukturell nicht von Bedeutung waren. Glycine wurden prinzipiell nicht ausgetauscht, da diese in der Regel für die korrekte Ausbildung der Tertiärstruktur wichtig sind. Der hypothetische Reaktionsmechanismus basiert auf Säure/Base-Katalyse, und polare Aminosäuren scheinen an der Wechselwirkung der DS mit dem Magnesiumion beteiligt zu sein.

Am bemerkenswertesten ist der hochkonservierte Aminosäurebereich zwischen Position 21 und 30. Er besteht in allen verglichenen Organismen aus polaren Aminosäuren. Die Auswertung der Röntgenstruktur wies die Reste Glutamat 26, 28 und 185 sowie Aspartat 30 mit ihren Carboxylatgruppen als potentielle Liganden für den Kofaktor Magnesium aus (Liao *et al.*, 2001). Der Loop, der von den Resten 22 - 27 gebildet wird und die ersten beiden β -Faltblätter miteinander verbindet, liegt in der Nähe der mutmaßlichen Kationenbindestelle. Zudem sind die polaren Aminosäuren des Loops streng konserviert (Abb. 52). Die Röntgenstruktur des *M. jannaschii* Enzyms zeigt, dass Aspartat 21 das reguläre Faltblatt unterbricht und mit der Seitenkette den Loop stützt, indem es Wasserstoffbrücken zur NH-Gruppe von Glutamat 28 (3.0 Å) und Glutamat 26 (2.7 Å) sowie eine Salzbrücke zum Arginin 25 (3.25 Å) ausbildet. Serin 22 zeigt ins Solvens und bildet eventuell eine Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe von Glutamat 24 (3.3 Å). Arginin 25 stellt einen potentiellen Liganden für die Phosphatgruppe des Substrates dar. Das Metallion wird von dem Glutamat 26 gebunden. Glycin 27 ermöglicht einen Knick im Loop und wird aus strukturellen Gründen nicht ausgetauscht. Glutamat 28 bindet über ein Wassermolekül an das Metallion. Zudem zeigt Glutamat 28 in die solvensgefüllte Kavität auf der substratabgewandten Seite des Metallions. Aspartat 30 zeigt auf die Zuckerkette des Substrates und bindet wie Glutamat 28 über ein Wassermolekül das Metallion. Methionin 31 und Valin 32 verankern den Loop im hydrophoben Kern. Die Seitenketten von Arginin 25, Glutamat 26, Glutamat 28 und Aspartat 30 stehen in Kontakt mit dem Substrat, während Aspartat 21 für die Loop-Struktur wichtig ist. Arginin 25 und Arginin 161 könnten mit ihrer Guanidiniumgruppe und Threonin 165 mit der Hydroxylgruppe den Phosphatrest von Ribulose-5-phosphat stabilisieren. Aufgrund der Thiolgruppe bzw. der Imidazolgruppe weisen die Aminosäure Cystein 55, Histidin 147 und 164 potentielle Säure/Base-Eigenschaften auf und könnten dementsprechende Aufgaben bei der Katalyse übernehmen. Die Aminosäure Glutamat 166 könnte durch eine Salzbrücke zu Arginin 161 dessen Seitenkette für die Substraterkennung stabilisieren.

Kelly *et al.* führte NMR-Bindungsstudien mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *E. coli* und dem Substrat Ribulose-5-phosphat durch, um das aktive Zentrum zu identifizieren (Kelly *et al.*, 2001). Um die Abhängigkeit der Bindung des Substrates vom

Kofaktor Mg^{2+} an das aktive Zentrum zu erhalten, wurde das Enzym mit EDTA inkubiert, um Mg^{2+} zu chelatisieren. Die Veränderung der NMR-Signale der DS deutet daraufhin, dass das Substrat auch in Abwesenheit von Mg^{2+} an die DS bindet. Mehrere Aminosäuren sind an der Substratbindung in Abwesenheit von Mg^{2+} beteiligt, aber nur Arginin 119 und Cystein 55 wurden mutiert. Die anderen Aminosäuren waren entweder nicht streng konserviert oder von struktureller Bedeutung.

Die NMR-Signale der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase in Anwesenheit des Substrates und des Kofaktors Mg^{2+} sind größer und zahlreicher als die NMR-Signale, die in Abwesenheit vom Mg^{2+} aufgenommen wurden. Dies ist ein Hinweis für eine stärkere Bindung des Substrates in Anwesenheit von Mg^{2+} . Die Auswertung der NMR-Signale ergab, dass vier Bereiche an der Substratbindung in Anwesenheit von Mg^{2+} beteiligt sind (Kelly *et al.*, 2001). Daraus wurden die vier Aminosäuren Threonin 112, Threonin 115, Aspartat 118 und Threonin 122 ausgesucht und mutiert.

In Tab. 9 sind die Aminosäuren mit ihren potentiellen Funktionen und durch welche Aminosäuren sie ersetzt wurden aufgelistet.

Aminosäure	Mutagenisierte Aminosäure	Potentielle Funktion
D21	D21E/D21N/D21S	Stabilisiert den sauren Loop
S22	S22A	Stabilisiert den sauren Loop
D23	D23S	Ligand für Mg^{2+}
R25	R25K/R25E	Ligand für die Phosphatgruppe des DHBP
E26	E26D/E26Q/E26S	Ligand für Mg^{2+}
E28	E28D/E28Q/E28S	Ligand für Mg^{2+}
D30	D30E/D30N/D30S	Ligand für Mg^{2+} ; bindet Substrat ^{*)}
C55	C55S/C55G	Katalyse: Säure/Base
T112	T112A	Bindet Substrat in Anwesenheit von Mg^{2+} ^{*)}
T115	T115A	Bindet Substrat in Anwesenheit von Mg^{2+} ^{*)}
D118	D118S	Bindet Substrat in Anwesenheit von Mg^{2+} ^{*)}
R119	R119S	Bindet Substrat in Abwesenheit von Mg^{2+} ^{*)}
T122	T122A	Bindet Substrat in Anwesenheit von Mg^{2+} ^{*)}
H147	H147S	Säure/Base-Eigenschaft
R161	R161S	Ligand für die Phosphatgruppe des DHBP; bindet Substrat in Anwesenheit von Mg^{2+} ^{*)}
H164	H164S	Katalyse: Säure/Base.
T165	T165S/T165A	Ligand für die Phosphatgruppe von DHBP
E166	E166S	Eine Salzbrücke könnte zur Stabilisierung der Seitenkette von R161 dienen; bindet Substrat ^{*)}
E185	E185D/E185Q/E185S	Ligand für Mg^{2+} ^{*)}

Tab. 9: Potentielle Funktionen von konservierten Aminosäuren der DS. Die Annahmen beruhen auf der Auswertung der Röntgenstruktur (Liao *et al.*, 2001; Steinbacher (unveröffentlichte Ergebnisse)) bzw. der NMR-Daten^{*)} (Kelly *et al.*, 2001).

3.4.7 Mutationsstrategien zur Generierung der Punktmutanten

Für die gerichtete Mutagenese wurde die PCR eingesetzt. Die verwendeten Mutationsprimer (Tab. 18, Anhang) enthalten neben der einzuführenden Mutation auch eine Detektions-schnittstelle.

3.4.7.1 Punktmutanten R161S, H164N, H164S, T165S, T165A, E166S

In 3'-Richtung von den Mutationsstellen R161S, H164N, H164S, T165S, T165A und E166S, liegt die Erkennungssequenz für die singuläre Schnittstelle *BssH* II. Die Mutationsprimer überspannen neben der Mutationsstelle auch die Erkennungssequenz von *BssH* II. Zur Einführung der Punktmutation wird eine PCR mit dem Vektor pNCO113-MJM-WT als Template durchgeführt. Es wurden die jeweiligen Mutationsprimer MJM-R161S-f, MJM-H164N-f, MJM-H164S-f, MJM-T165A-f, MJM-T165S-f, MJM-E166S-f (Tab. 18, Anhang) und der korrespondierende Vektorprimer mRNA5 (Tab. 12, Anhang) eingesetzt (Abb. 34). Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen *BssH* II und *Hind* III verdaut und in einen entsprechend restringierten Vektor pNCO113-MJM-WT ligiert. Mit den resultierenden Plasmiden pNCO113-MJM-R161S, pNCO113-MJM-H164N, pNCO113-MJM-H164S, pNCO113-MJM-T165A, pNCO113-MJM-T165S, pNCO113-MJM-E166S wurden *E. coli*-XL1 Zellen transformiert.

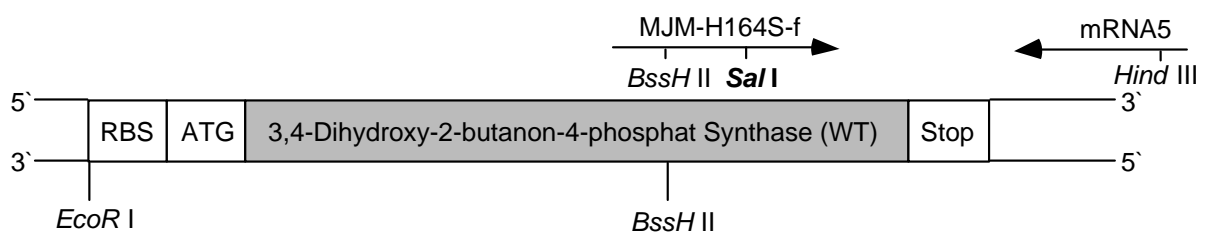


Abb. 34: Mutationsstrategie zur Einführung der Mutation H164S. Die Detektionsschnittstelle ist fett unterlegt.

3.4.7.2 Punktmutante H147S

In 5'-Richtung von der Mutationsstelle H147S liegt die Erkennungssequenz für die singuläre Schnittstelle *BssH* II. Der Mutationsprimer überspannt neben der Mutationsstelle auch die Erkennungssequenz von *BssH* II. Die PCR wurde mit dem Vektor pNCO113-MJM-WT als

Template durchgeführt. Es wurde der Mutationsprimer MJM-H147-r (Tab. 18, Anhang) und der korrespondierende Vektorprimer UniEcoRI (Tab. 12, Anhang) eingesetzt (Abb. 35). Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BssH* II verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113-MJM-WT ligiert. Mit dem Plasmid pNCO113-MJM-H147S wurden *E. coli*-XL1 Zellen transformiert.

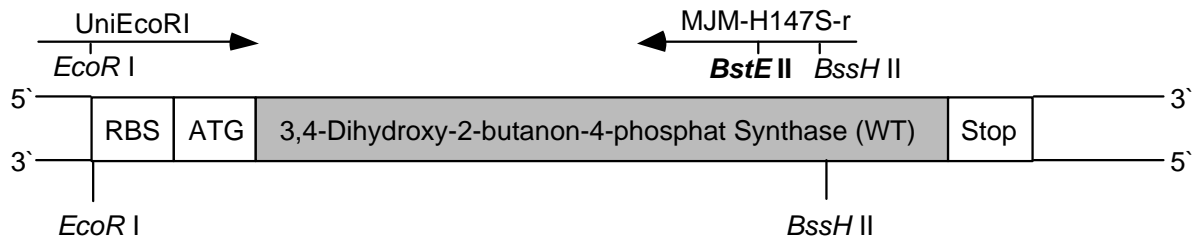


Abb. 35: Mutationsstrategie zur Einführung der Mutation H147S. Die Detektionsschnittstelle ist fett unterlegt.

3.4.7.3 Punktmutante E185D, E185Q und E185S

Die Punktmutanten E185D, E185Q und E185S wurden mit der überlappenden PCR-Technik generiert (Abb. 36). Die erste PCR enthielt den Vektor pNCO113-MJM-WT als Template sowie den jeweiligen Mutationsprimer MJM-E185D-1, MJM-E185Q-1 und MJM-E185S-1 (Tab. 18, Anhang) und den korrespondierenden Vektorprimer UniEcoRI (Tab. 12, Anhang) (überspannt die Erkennungssequenz für die *EcoR* I-Schnittstelle). Die zweite und die dritte PCR dienten zur Vervollständigung des DNA-Fragments. Es wurden die Primerkombinationen UniEcoRI/MJM-E185S-2 (Tab. 18, Anhang) und UniEcoRI/MJM16 (Tab. 17, Anhang) eingesetzt. Der Synthesepimer MJM16 führt nach dem Stopcodon die *BamH* I-Schnittstelle ein. Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BamH* I verdaut und in einen entsprechend restringierten Vektor pNCO113 ligiert. Die Vektoren pNCO113-MJM-E185D, pNCO113-MJM-E185Q, pNCO113-MJM-E185S wurden in XLI-Zellen transformiert.

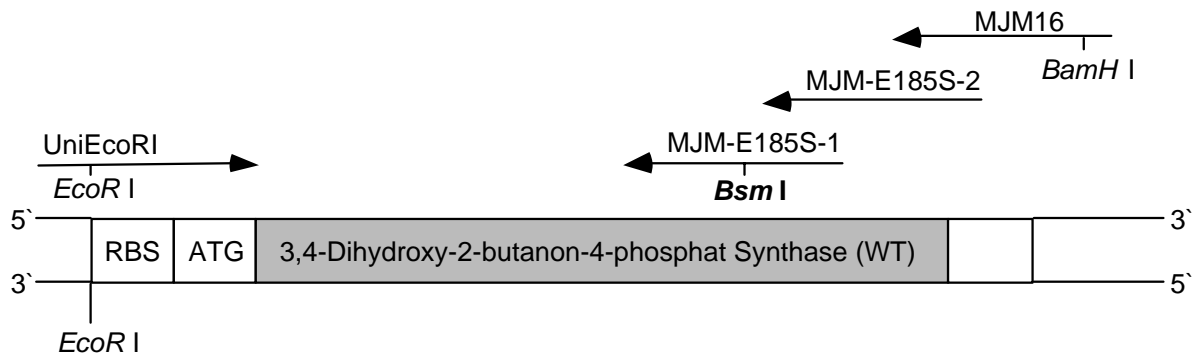


Abb. 36: Mutationsstrategie für E185S. Die Detektionsschnittstelle ist fett unterlegt.

3.4.7.4 Punktmutanten D21E, D21N, D21S, S22A, R25E und R25K

Die Punktmutanten D21E, D21N, D21S, S22A, R25E und R25K wurden mit der überlappenden PCR-Technik generiert. Die erste PCR enthielt den Vektor pNCO113-MJM-WT als Template sowie die jeweiligen Mutationsprimer MJM-D21E-f, MJM-D21N-f, MJM-D21S-f, MJM-S22A-f, MJM-R25E-f, MJM-R25K-f (Tab. 18, Anhang) und den korrespondierenden Syntheseprimer MJM6 (Tab. 17, Anhang) (überspannt die Erkennungssequenz für die *BssH* II-Schnittstelle). (Abb. 37). Die zweite PCR diente der Vervollständigung des Amplifikats. Es wurde die Primerkombination MJM15/MJM6 (Tab. 17, Anhang) eingesetzt. Der Syntheseprimer MJM15 führt vor dem Startcodon die *EcoR* I-Schnittstelle ein. Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BssH* II verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113-MJM-WT ligiert. Die Plasmide pNCO113-MJM-D21E, pNCO113-MJM-D21N, pNCO113-MJM-D21S, pNCO113-MJM-S22A, pNCO113-MJM-R25E und pNCO113-MJM-R25K wurden in XLI-Zellen transformiert.

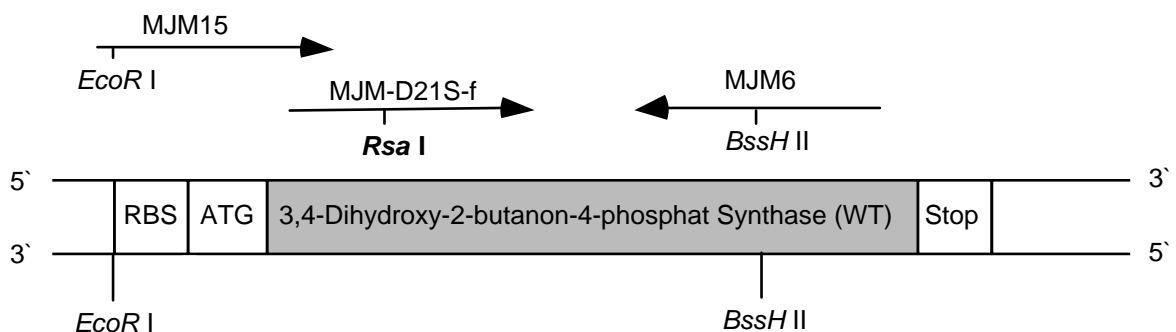


Abb. 37: Mutationsstrategie für D21S. Die Detektionsschnittstelle ist fett unterlegt.

3.4.7.5 Punktmutante E26D, E26Q und E26S

Die Punktmutanten E26D, E26Q und E26S wurden mit der überlappenden PCR-Technik generiert (Abb. 38). Die erste PCR wurde mit dem Vektor pNCO113-MJM-WT als Template durchgeführt. Es wurden die jeweiligen Mutationsprimer MJM-E26D-1, MJM-E26Q-1, MJM-E26S-1 (Tab. 18, Anhang) und der korrespondierende Synthesepimer MJM6 (Tab. 17, Anhang) (überspannt die Erkennungssequenz für die *BssH* II-Schnittstelle) verwendet. Die zweite und die dritte PCR dienten der Vervollständigung des Amplifikats. Es wurden die Primerkombinationen MJM-E26S-2/MJM6 (Tab. 18, 17, Anhang) und MJM15/MJM6 (Tab. 17, Anhang) eingesetzt. Der Synthesepimer MJM15 führt vor dem Startcodon die Erkennungssequenz der *EcoR* I-Schnittstelle ein. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BssH* II verdaut und in den entsprechend restringierten pNCO113-MJM-WT ligiert. Die resultierenden Plasmide pNCO113-MJM-E26D, pNCO113-MJM-E26Q und pNCO113-MJM-E26S wurden in *E. coli*-XL1 Zellen transformiert.

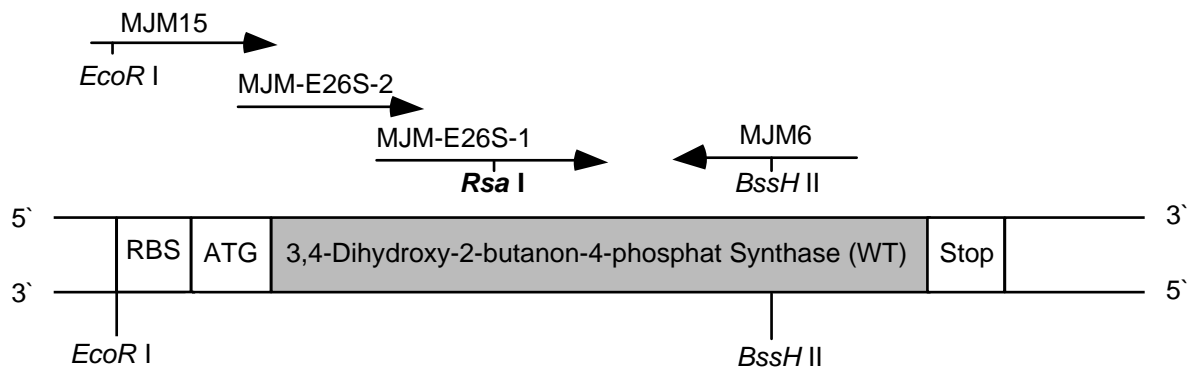


Abb. 38: Mutationsstrategie für E26S. Die Detektionsschnittstelle ist fett unterlegt.

3.4.7.6 Punktmutanten E28D, E28Q, E28S, D30E, D30N und D30S

Die Punktmutanten E28D, E28Q, E28S, D30E, D30N und D30S wurden mit der überlappenden PCR-Technik generiert (Abb. 39). Die erste PCR wurde mit dem Vektor pNCO113-MJM-WT als Template durchgeführt. Es wurden die jeweiligen Mutationsprimer MJM-E28D-f, MJM-E28Q-f, MJM-E28S-f bzw. MJM-D30E-f, MJM-D30N-f, MJM-D30S-f (Tab. 18, Anhang) und der korrespondierende Synthesepimer MJM6 (Tab. 17, Anhang) (überspannt die Erkennungssequenz für die *BssH* II-Schnittstelle) verwendet. Die zweite und die dritte PCR dienten der Vervollständigung des Amplifikats. Es wurden die

Primerkombinationen MJM13/MJM6 (Tab. 17, Anhang) und MJM15/MJM6 (Tab. 17, Anhang) eingesetzt. Der Synthesepriemer MJM15 führt vor dem Startcodon die Erkennungssequenz der *EcoR I*-Schnittstelle ein. Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR I* und *BssH II* verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113 ligiert. Mit den resultierenden Vektoren pNCO113-MJM-E28D, pNCO113-MJM-E28Q, pNCO113-MJM-E28S bzw. pNCO113-MJM-D30E, pNCO113-MJM-D30N, pNCO113-MJM-D30S wurden *E. coli*-XL1 Zellen transformiert.

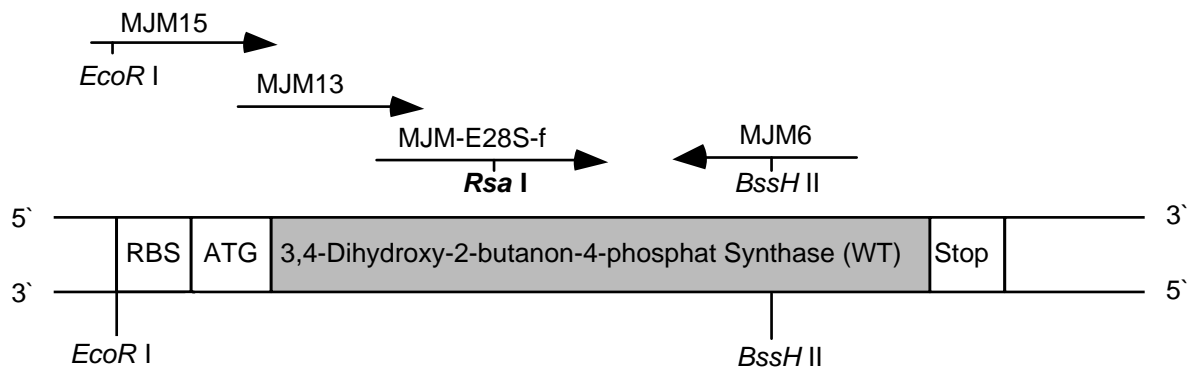


Abb. 39: Mutationsstrategie für die Mutanten E28S. Die Detektionsschnittstelle ist fett unterlegt.

3.4.7.7 Punktmutanten C55S und C55G

Die Punktmutanten C55S und C55G wurden mit der überlappenden PCR-Technik generiert (Abb. 40). Die erste PCR wurde mit dem Vektor pNCO113-MJM-WT als Template durchgeführt. Es wurden die jeweiligen Mutationsprimer MJM-C55S-1-f bzw. MJM-C55G-f (Tab. 18, Anhang) und der korrespondierende Synthesepriemer MJM6 (Tab. 17, Anhang) (überspannt die Erkennungssequenz für die *BssH II*-Schnittstelle) verwendet. Die zweite, dritte und vierte PCR dienten der Vervollständigung des Amplifikats. Es wurden die Primerkombinationen MJM-C55G-2-f/MJM6 (Tab. 18, 17, Anhang), MJM13/MJM6 (Tab. 17, Anhang) und MJM15/MJM6 (Tab. 17, Anhang) eingesetzt. Der Synthesepriemer MJM15 führt vor dem Startcodon die Erkennungssequenz der *EcoR I*-Schnittstelle ein. Die DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR I* und *BssH II* verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113-MJM-WT ligiert. Mit dem Plasmid pNCO113-MJM-C55S bzw. pNCO113-MJM-C55G wurden XLI-Zellen transformiert.

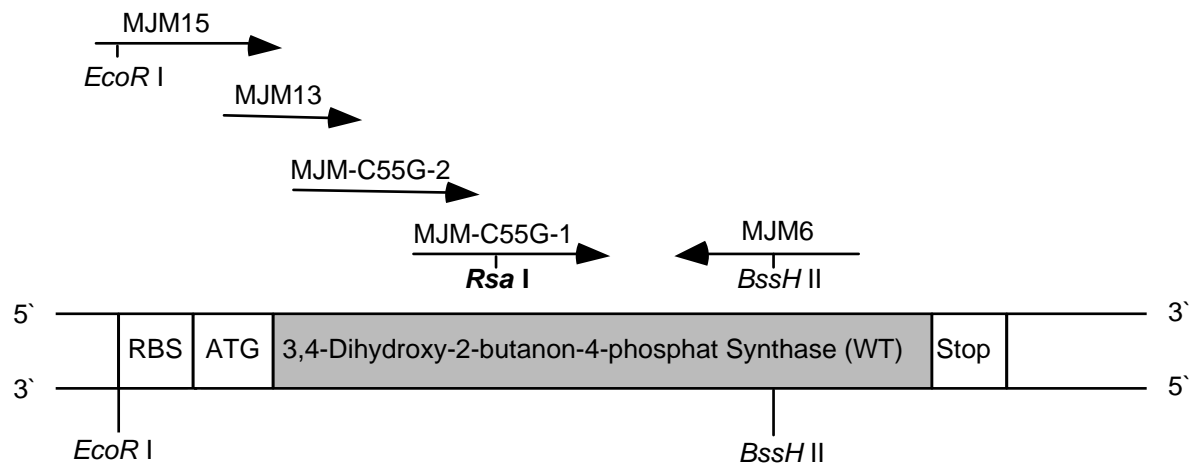


Abb. 40: Mutationsstrategie für C55G. Die Detektionsschnittstelle ist fett unterlegt.

3.4.7.8 Punktmutanten T112A, T115A, D118S, R119S und T122A

Die Punktmutanten T112A, T115A, D118S, R119S und T122A wurden mit der überlappenden PCR-Technik generiert (Abb. 41). Die erste PCR wurde mit dem Vektor pNCO113-MJM-WT als Template durchgeführt. Es wurde der Vektorprimer UniEcoRI (Tab. 12, Anhang) und die korrespondierenden Mutationsprimer MJM-T112A-r, MJM-T115A-r, MJM-D118S-r, MJM-R119S-r und MJM-T122A-r (Tab. 18, Anhang) verwendet. Die zweite und die dritte PCR dienten zur Vervollständigung des Amplifikats. Es wurden die Primerkombinationen UniEcoRI/MJM4 (Tab. 12, 17, Anhang) und UniEcoRI/MJM6 (Tab. 12, 17, Anhang) eingesetzt. Der Synthesepimer MJM6 überspannt die Erkennungssequenz für die Schnittstelle *BssH* II. Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BssH* II verdaut und in einen entsprechend restringierten pNCO113-MJM-WT ligiert. Mit den Vektoren pNCO113-MJM-T112A, pNCO113-MJM-T115A, pNCO113-MJM-D118S, pNCO113-MJM-R119S und pNCO113-MJM-T122A wurden *E. coli*-XL1 Zellen transformiert.

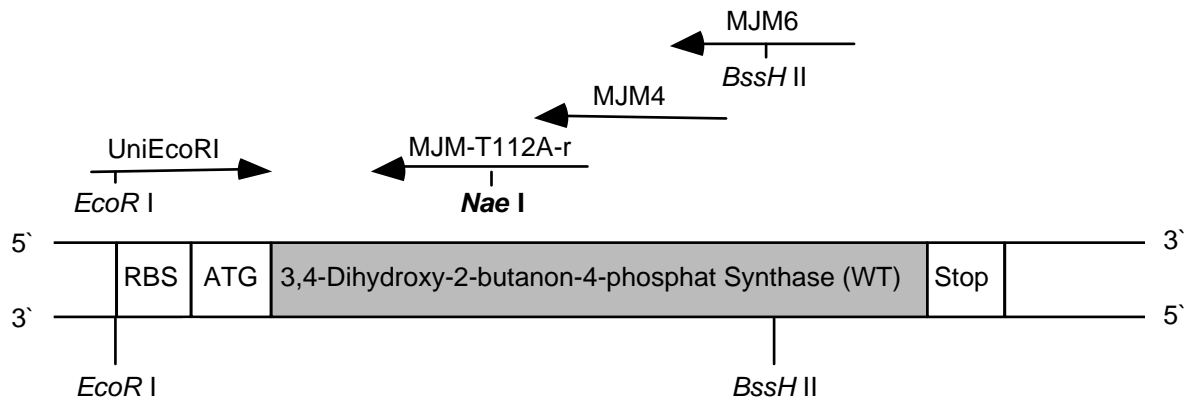


Abb. 41: Mutationsstrategie für die Mutante T112A. Die Detektionsschnittstelle ist fett unterlegt.

3.4.7.9 Doppelmutante D30N/H147S

Für die Klonierung der Doppelmutante D30N/H147S wurde eine PCR mit dem Template pNCO113-MJM-D30N durchgeführt. Es wurde der Vektorprimer UniEcoRI (Tab. 12, Anhang) und der korrespondierende Mutationsprimer MJM-H147S-r (Tab. 18, Anhang) (überspannt die Erkennungssequenz der *BssH* II-Schnittstelle) eingesetzt (Abb. 42). Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BssH* II geschnitten und in einen entsprechend restringierten pNCO113-MJM-WT ligiert. Mit dem Vektor pNCO113-MJM-D30N/H147S wurden *E. coli*-XL1 Zellen transformiert.

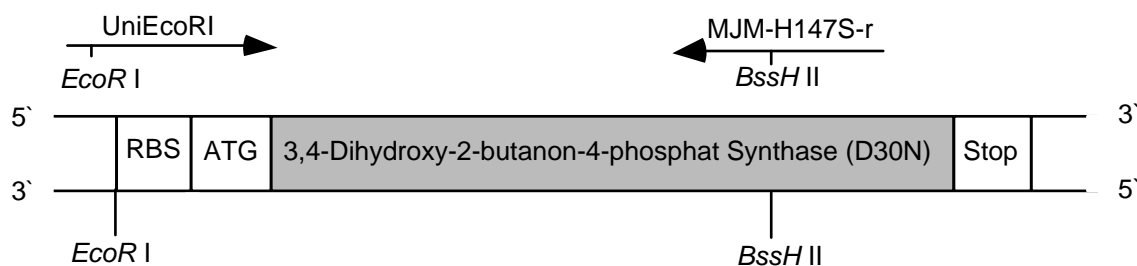


Abb. 42: Mutationsstrategie für die Doppelmutante D30N/H147S.

3.4.7.10 Identifizierung der einzelnen Punktmutanten

Die erhaltenen Kolonien wurden mit einem PCR-Screening mit den Vektoroligonukleotiden pNCO+80 und pNCO-100 überprüft. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit einer Restriktionsanalyse mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Tab. 10) charakterisiert.

Da nur die mutagenisierte DNA geschnitten wurde, konnten die positiven Klone leicht identifiziert werden. Die Einführung der Mutation wurde noch mit einer DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Die Mutantensequenzen wurden mit den Accession Numbers AF490541 – AF490573 bei GenBank hinterlegt. Der Wildtyp erhielt die Accession Number AF490554.

Mutation	Detektions-schnittstelle	Accession Number
D21E	<i>Rsa</i> I	AF490552
D21N	<i>Rsa</i> I	AF490551
D21S	<i>Rsa</i> I	AF490553
S22A	<i>BstU</i> I	AF490561
D23S	<i>Rsa</i> I	AF490550
R25E	<i>Rsa</i> I	AF490567
R25K	<i>Rsa</i> I	AF490563
E26D	<i>Rsa</i> I	AF490557
E26Q	<i>Rsa</i> I	AF490572
E26S	<i>Rsa</i> I	AF490570
E28D	<i>Rsa</i> I	*)
E28Q	<i>Rsa</i> I	AF490569
E28S	<i>Rsa</i> I	AF490571
D30E	<i>Rsa</i> I	AF490549
D30N	<i>Rsa</i> I	AF490548
D30S	<i>Rsa</i> I	AF490547
C55S	<i>BstB</i> I	AF490541
C55G	<i>Rsa</i> I	AF490542
T112A	<i>Nae</i> I	AF490566
T115A	<i>Alu</i> I	AF490560
D118S	<i>Pml</i> I	AF490543
R119S	<i>Aci</i> I	AF490564
T122A	<i>Nru</i> I	AF490566
H147S	<i>BstE</i> II	AF490573
R161S	<i>Bfa</i> I	AF490559
H164N	<i>Dde</i> I	AF490556
H164S	<i>Sal</i> I	AF490555
T165S	<i>Bfa</i> I	AF490568
T165A	<i>Bfa</i> I	AF490565
E166S	<i>Bfa</i> I	AF490546
E185D	<i>Nla</i> III	AF490545
E185Q	<i>Nde</i> I	AF490544
E185S	<i>Bsm</i> I	AF490558

*) Eine Eintragung der Mutantensequenz in die GenBank erfolgt noch.

Tab. 10: Die Detektionsschnittstellen der Mutationen und deren Accession Number.

3.4.8 Enzymatische Eigenschaften der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

3.4.8.1 Kinetik des Wildtyps und der Mutanten

Um bestimmen zu können, ob die ausgetauschten Aminosäuren Einfluss auf die Katalyse haben, wurde zunächst der K_M -Wert und die spezifische Aktivität des Wildtypproteins und der mutierten Proteine bestimmt. Bei den kinetischen Untersuchungen wurde statt Ribulose-5-phosphat Ribose-5-phosphat und Ribose-5-phosphat Isomerase aus Spinat eingesetzt. Die spezifische Aktivität der Riboisomerase liegt bei 6280 U/mg (Jung *et al.*, 2000).

Die indirekte Aktivitätsbestimmung der DS erfolgte über die photometrische Messung der Lumazinbildung. Der Ansatz enthält DS, Lumazin Synthase (30 μM), Ribose-5-phosphat Isomerase (5U) (Spinat), Ribose-5-phosphat, 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidindion (0,75 mM), 10 mM MgCl_2 in 100 mM Tris/HCl, pH 7,7. Die Isomerase katalysiert die Umsetzung von Ribose-5-phosphat zu Ribulose-5-phosphat, welches von der DS zu DHBP umgesetzt wird. Die Lumazinsynthase katalysiert die Reaktion von DHBP und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidindion zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (Abb. 43). Dieses Produkt kann photometrisch bei 410 nm detektiert werden ($\epsilon = 12.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

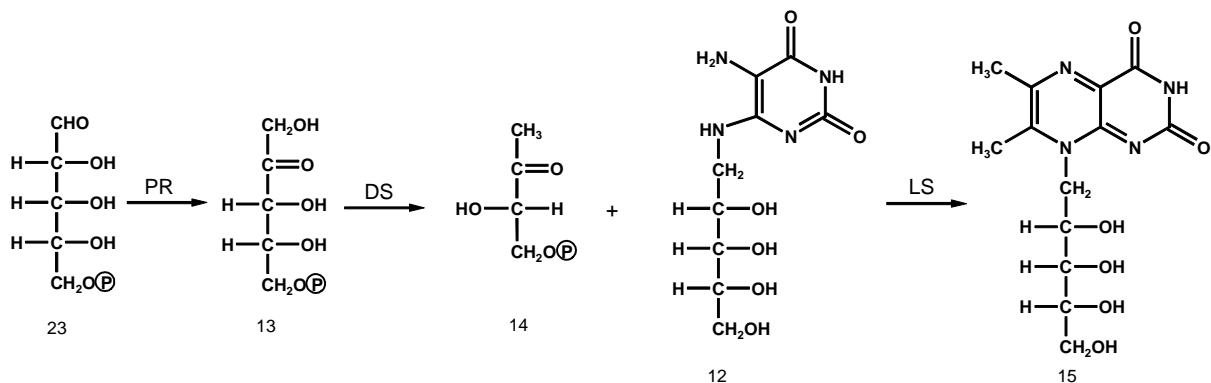


Abb. 43: Bildung von Lumazin aus Ribose-5-phosphat. PR) Phosphoribosylisomerase, DS) 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase; LS) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase; 23) Ribose-5-phosphat, 13) Ribulose-5-phosphat, 14) 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat, 12) 5-Amino-2,4-pyrimidindion, 15) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin.

Um den K_M -Wert und v_{max} zu bestimmen, wurde die Lumazinbildung bei unterschiedlichen Ribose-5-phosphat Konzentrationen gemessen. Mit einer Michaelis-Menten-Auftragung konnte dann über v_{max} die spezifische Aktivität von $148 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und ein K_M -Wert von $140 \text{ }\mu\text{M}$ ermittelt werden (Abb. 44). Die DS ist ein sehr langsames Enzym mit einer Wechselzahl von 4 min^{-1}

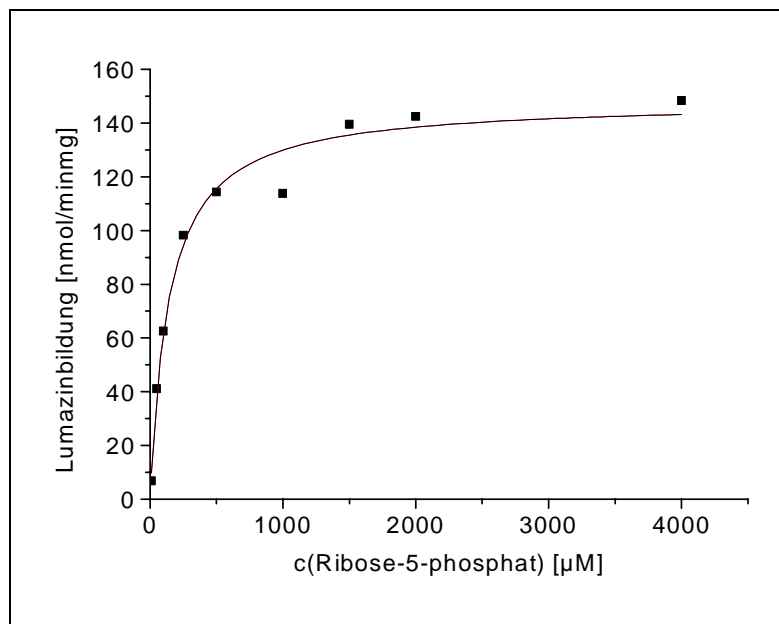


Abb. 44: Substratabhängigkeit der DS. Der Aktivitätstest wurde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in 100 mM Tris/HCl pH 7,7, 10 mM MgCl_2 durchgeführt. Die Konzentration der DS betrug $1,6 \text{ }\mu\text{M}$.

Um die kinetischen Daten der mutierten Enzyme mit dem Wildtyp vergleichen zu können, wurde die spezifische Aktivität des Wildtyps auf 100 % gesetzt und die spezifische Aktivität der Mutantenproteine darauf bezogen. Für die Mutantenproteine wurden ebenfalls Michaelis-Menten-Kinetiken bestimmt. Bei einigen mutierten Enzymen war die Aktivität so gering, dass die Aufstellung einer Michaelis-Menten-Kurve und damit eine Bestimmung des K_M -Wertes nicht möglich war (Tab. 11).

Mutante	Aktivität [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	K _M	[%]
WT	148	140	100
D21E	0,42	-	<1
D21N	0,8	-	<1
D21S	2	-	1
S22A	76	437	51
D23S	33	453	22
R25E	3	-	2
R25K	1,12	-	<1
E26D	0,4	-	<1
E26Q	0,1	-	<1
E26S	0,7	-	<1
E28D	0,4	-	<1
E28Q	6,4	-	4
E28S	0,4	-	<1
D30E	0,7	-	<1
D30N	0,6	-	<1
D30S	5	-	3
C55S	44	191	30
C55G	19	927	13
T112A	3	1415	2
T115A	38	264	26
D118S	27	253	18
R119S	17	1200	11
T122A	60	126	41
H147S	18	41	12
R161S	15	1026	10
H164N	0,5	-	<1
H164S	0,8	-	<1
T165S	54	74	36
T165A	74	1116	50
E166S	39	1054	26
E185D	0,5	-	<1
E185Q	0,19	-	<1
E185S	0,2	-	<1
D30N/H147S	-	-	<1
<i>E. coli</i>	467	80	315

Tab. 11: In der Tabelle sind für den Wildtyp und die Mutanten die spezifische Aktivität, K_M und die spezifische Aktivität der Mutanten prozentual zum Wildtyp aufgeführt.

3.4.8.2 Bestimmung der Aktivierungsenergie

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie wurde die Geschwindigkeitskonstante k bei unterschiedlichen Temperaturen für die DS photometrisch bestimmt. Die Aktivität wurde bei 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C und 60°C gemessen. Aufgetragen wurde $\ln k$ gegen $1/T$ [1/K] (Abb. 45).

Arrheniusgleichung: $k = A \cdot e^{-E_A/RT}$

Entsprechend der Arrheniusgleichung lässt sich aus der Steigung die Aktivierungsenergie mit 56 kJ/mol bestimmen. Der Arrheniusfaktor von $1,2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ ergibt sich aus dem Achsenabschnitt.

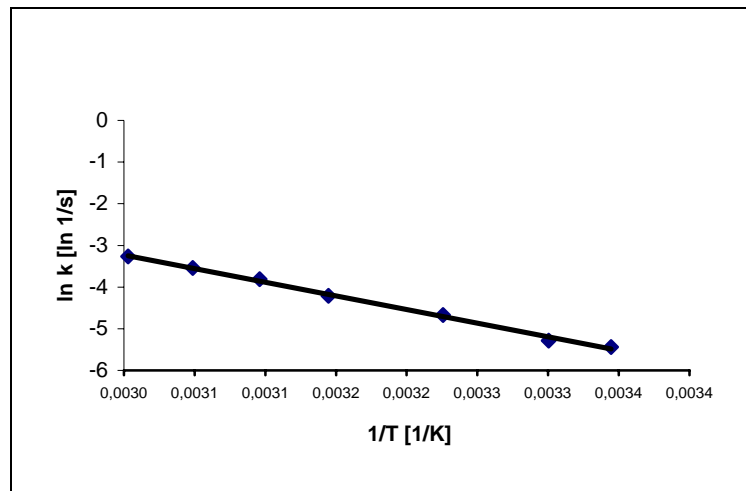


Abb. 45: Abhängigkeit der Ratenkonstante k von der Temperatur. Die Konzentration der DS betrug $8,2 \mu\text{M}$, die von Ribulose-5-phosphat 5 mM . Die Aktivitätsbestimmungen wurden in 10 mM MgCl_2 , 100 mM Tris/HCl , pH 7,5 durchgeführt.

3.4.8.3 Einfluss von EDTA auf die enzymatische Aktivität

Da die Kristallstruktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii* ein Zink aufweist, sollte untersucht werden, ob dieses Zinkion Einfluss auf die Aktivität der DS hat. Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthasen aus *E. coli* und *M. jannaschii* wurden zwei Tage mit 100 mM EDTA bei 4°C (100 mM Tris/HCl pH 7) inkubiert, um vorhandene Zinkionen zu komplexieren. Beide Proteine zeigten danach keinen Aktivitätsverlust. Das Zinkion scheint für die Aktivität der DS nicht erforderlich zu sein.

3.4.8.4 Einfluss von Metallionen auf die enzymatische Aktivität

3.4.8.4.1 Abhängigkeit der Aktivität von der Mg^{2+} -Konzentration

Es wurde die Aktivität der DS bei unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen gemessen (Abb. 46). Die Ribose-5-phosphat Konzentration betrug 1 mM und die Mg^{2+} -Konzentration variierte von 100 μ M bis 10 mM. Es konnte festgestellt werden, dass bei 100 μ M $MgCl_2$ noch kein messbarer Umsatz an Ribose-5-phosphat erfolgt. Ab einer Konzentration von 2 mM Mg^{2+} ist die maximale Aktivität erreicht.

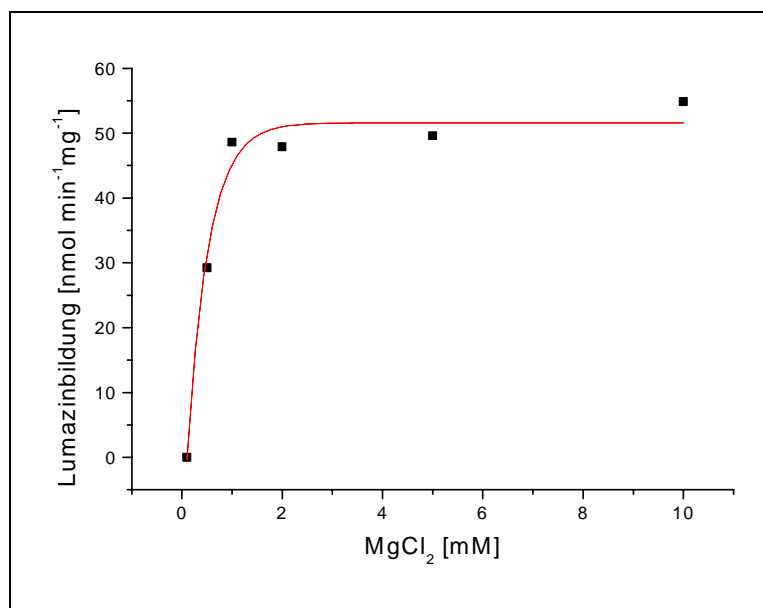


Abb. 46: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Mg^{2+} -Konzentration. Die DS wurde in einer Konzentration von 3,1 μ M eingesetzt. Die Aktivitätsbestimmungen wurden bei 37 °C in 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 durchgeführt.

3.4.8.4.2 Abhängigkeit der Aktivität von der Mn^{2+} -Konzentration

Es sollte untersucht werden, ob der Kofaktor Mg^{2+} durch Mn^{2+} ersetzt werden kann (Abb. 47). Die Ribose-5-phosphat Konzentration betrug 1 mM. Die Konzentrationen von MnCl_2 lagen zwischen 100 μM und 500 μM . Bereits eine Mn^{2+} -Konzentration von 100 μM führte zu einer messbaren Aktivität. Bei steigender Mn^{2+} -Konzentration nahm die Aktivität zu. Bei 500 μM MnCl_2 präzipitierten die Proteine, und eine Aktivitätsbestimmung mit dem Photometer war nicht mehr möglich. Bei einer Konzentration von 500 μM Mn^{2+} war die spezifische Aktivität etwas geringer als bei einer vergleichbaren Mg^{2+} -Konzentration.

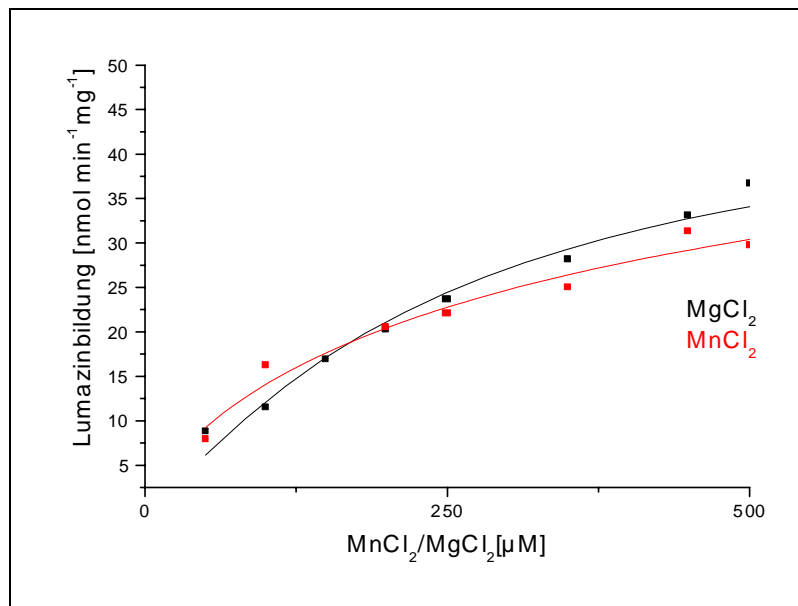


Abb. 47: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Mn^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Konzentration. Die DS wurde in einer Konzentration von 3,1 μM eingesetzt. Die Aktivitätsbestimmungen wurden bei 37 °C in 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 durchgeführt.

3.4.8.4.3 Abhängigkeit der Aktivität von der Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Konzentration

Es sollte untersucht werden, ob Zink bzw. Cadmium Einfluss auf die Aktivität der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase haben. Die Ribose-5-phosphat Konzentration betrug 1 mM. Um die Abhängigkeit von Zn^{2+} zu bestimmen, wurden die Aktivitätstests ohne, mit 10 μM und mit 100 μM $ZnCl_2$ durchgeführt (Abb. 48).

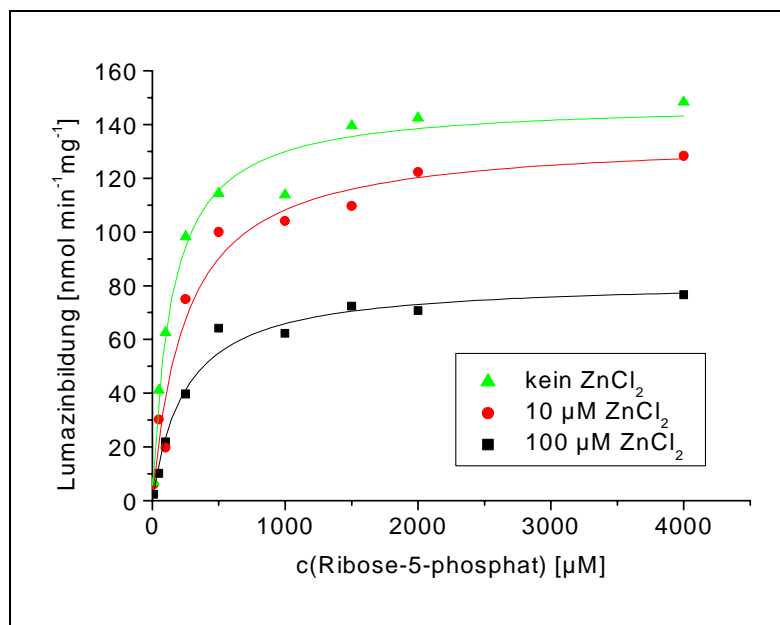


Abb. 48: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Zinkchloridkonzentration. Es wurde eine Konzentration von 4,1 μM von der DS eingesetzt. Die Aktivitätsbestimmungen wurden bei 37 °C in 100 mM Tris/HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7,5 durchgeführt.

Die spezifische Aktivität der DS reduzierte sich bei einer Zn^{2+} -Konzentration von 10 μM von 148 $nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ auf 135 $nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}$. Bei einer Zn^{2+} -Konzentration von 100 μM sank die Aktivität der DS auf 82 $nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}$. Ein Aktivitätstest bei dem das $MgCl_2$ durch $ZnCl_2$ (500 μM) ersetzt wurde, zeigte keine Aktivität. Der Aktivitätsverlust deutet darauf hin, dass das Enzym nicht zinkabhängig ist.

Um den Einfluss von Cd^{2+} auf die Aktivität der DS zu bestimmen, wurden die Aktivitätstests ohne, mit 3,5 μM , 7 μM und 100 μM $CdSO_4$ durchgeführt (Abb. 49). Die Ribose-5-phosphat Konzentration betrug 1 mM.

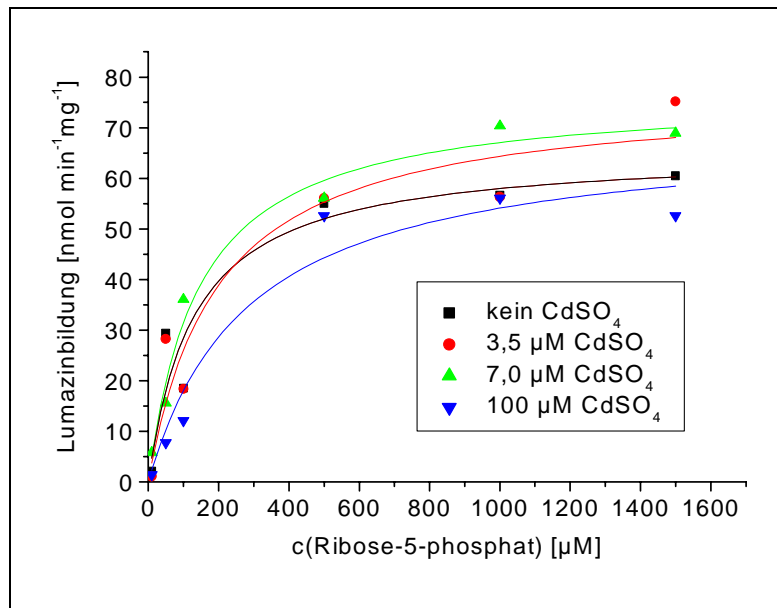


Abb. 49: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Cadmiumsulfatkonzentration. Es wurde eine Konzentration von 3,5 µM von der DS eingesetzt. Die Aktivitätsbestimmungen wurden bei 37 °C in 100 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5 durchgeführt.

Die spezifische Aktivität der DS stieg leicht von 65 nmol min⁻¹ mg⁻¹ bei einer äquimolaren Cd²⁺-Konzentration von 3,5 µM auf 77 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Bei 7 µM CdSO₄ blieb die spezifische Aktivität unverändert bei 77 nmol min⁻¹ mg⁻¹, während sie bei einer Cd²⁺-Konzentration von 100 µM auf 69 nmol min⁻¹ mg⁻¹ abfiel. Alle vier Werte liegen innerhalb des Fehlerbereichs von 10 %. Daraus folgt, dass Cd²⁺ keinen Einfluss auf die Aktivität hat. Es wurde ein Enzymtest durchgeführt, bei dem CdSO₄ statt MgCl₂ als einziger Kofaktor eingesetzt wurde. Es zeigte sich keine Aktivität.

3.4.8.4.4 Atomabsorptionsspektroskopie

In der Röntgenstruktur der DS wurde eine Elektronendichte gefunden, die nur einem Metall entsprechen konnte. Bei den Aminosäuren, die in direkter Nachbarschaft dazu lagen, handelte es sich um typische Zn-Liganden. Aus diesem Grund wurde bei der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) auf Zink getestet. Neben dem Wildtyp wurden sowohl mutierte Enzyme, die noch Aktivität aufwiesen, als auch solche, die nur noch minimale Aktivität aufwiesen, mittels AAS untersucht. Bei keiner der Enzymproben konnte Zink nachgewiesen werden. Bei dem gebundenen Metall handelt es sich also wahrscheinlich um ein Artefakt aus dem Kristallisationspuffer.

3.4.9 Das aktive Zentrum der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

Die inaktive Mutante H147S kristallisierte in Anwesenheit des Substrates. Damit konnte das aktive Zentrum und die Lage des Substrates bestimmt werden (Abb. 50). Am aktiven Zentrum sind zwei Metalle lokalisiert, die als Calcium und als Zink identifiziert wurden. Gereinigte DS zeigte in der AAS kein Zn. Die Kristalle, die zur Röntgenstrukturaufklärung verwendet wurden, bildeten sich in einem zink- und calciumhaltigen Puffer. Aktivitätstests, bei denen der Kofaktor Magnesium durch Zink ersetzt wurde, zeigten keinen Umsatz des Eduktes. Die DS ist nach zweitägiger Inkubation mit EDTA immer noch aktiv, wenn Magnesium zugesetzt wird. Es wird deshalb angenommen, dass während der Katalyse die beiden Metallplätze von Magnesium belegt sind. Für die Substratbindung sind offensichtlich die Magnesiumionen nicht notwendig. Die Unabhängigkeit der Substratbindung von den Magnesiumionen konnte auch durch NMR-Experimente nachgewiesen werden (Kelly *et al.*, 2001).

Die beiden Metallionen sind jeweils sechsfach koordiniert (Abb. 51). Die OH-Gruppe des C-3 koordiniert an beide Metalle, während die OH-Gruppe des C-4 nur an Zink bindet. Der Sauerstoff von C-2 koordiniert mit einer etwas längeren Bindung an das Calcium. Zudem wird von jedem Metall noch ein Sauerstoff der Phosphatgruppe des Substrates und ein Wassermolekül koordiniert. Die Carboxylatgruppe des Glutamats 26 koordiniert ebenfalls an beide Metalle. Tyrosin 95 bindet an das Calciumion, während Histidin 164 an das Zinkion koordiniert. Alle Aminosäuren, die an die Metalle koordinieren weisen nach Austausch eine spezifische Aktivität von unter 1 % verglichen mit dem Wildtyp auf.

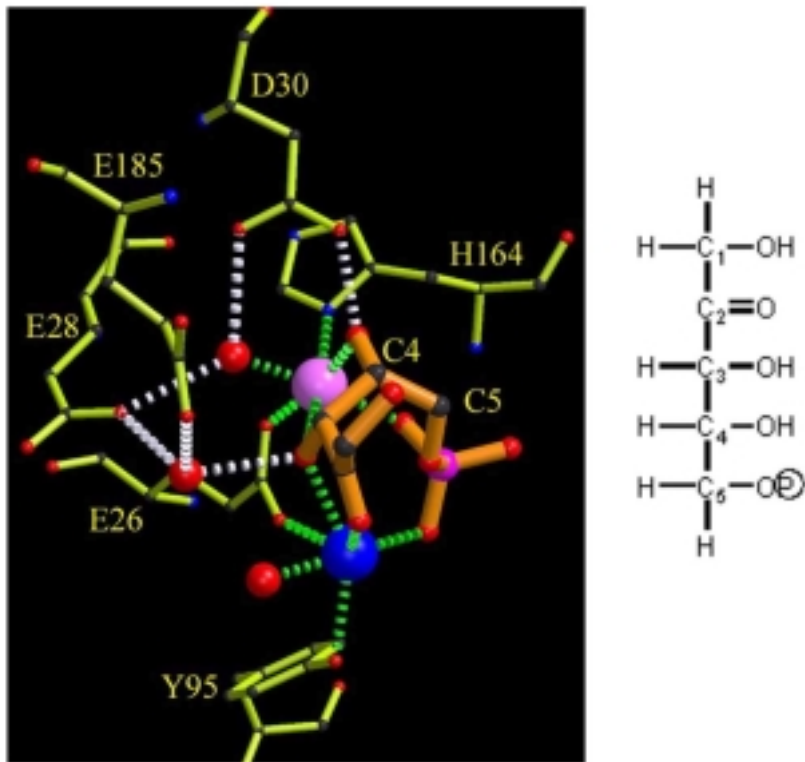


Abb. 50: Das aktive Zentrum der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase mit Ribulose-5-phosphat. Das Calcium ist blau und das Zink ist rosa markiert.

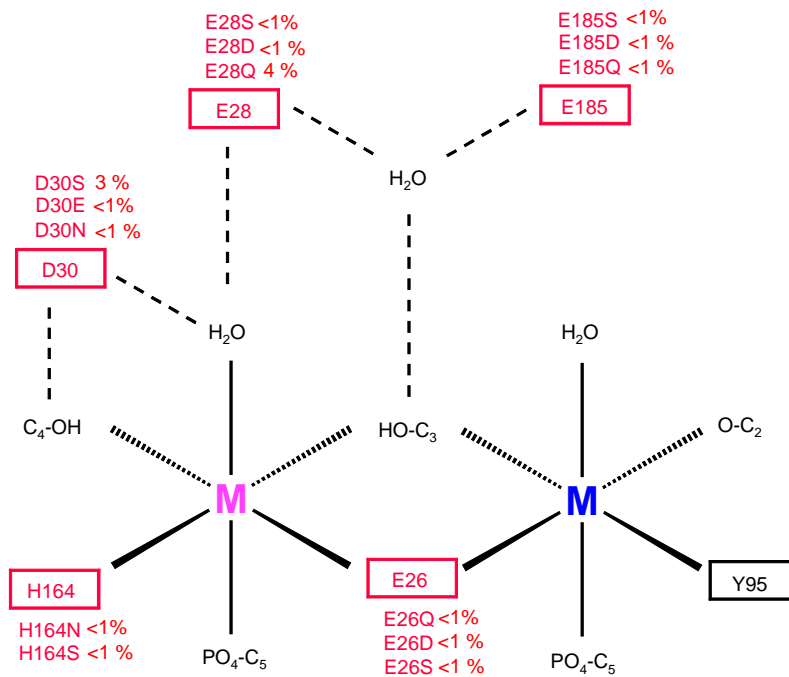


Abb. 51: Die Koordination der beiden Metallionen (Calcium (blau), Zink (rosa)), wobei tatsächlich keine exakte oktaedrische Geometrie vorliegt. Die rot markierten Aminosäuren weisen nach Austausch eine spezifische Aktivität von weniger als 1 % im Vergleich zum Wildtyp auf.

Die spezifische Aktivität der Mutante H147S ist um den Faktor sieben und der K_M -Wert um den Faktor drei im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Histidin 147 hat also sowohl katalytischen Einfluss als auch Substratbindungseigenschaften.

Die OH-Gruppe des C-1 ist relativ flexibel und steht mit Cystein 55 in Kontakt. Die Mutanten C55G und C55S besitzen im Vergleich zum Wildtypprotein eine spezifische Aktivität von 13 % bzw. 30 %.

Das Wassermolekül, das an Glutamat 28 und 185 gebunden ist und an die OH-Gruppe des C-3 koordiniert, könnte als Protonenrelais fungieren. Bei den Mutanten E28D, E28S, E185D, E185Q und E185S sank die Aktivität in Bezug auf den Wildtyp auf unter 1 %. Nur die Mutante E28Q wies noch Restaktivität in Höhe von 1,5 % auf. Offensichtlich ist sowohl die Größe (Austausch E gegen D) als auch die Säurefunktion (Austausch E gegen Q) entscheidend für die katalytische Aufgabe der beiden Aminosäuren. Die Planarisierung des C-3 könnte sich auf den C-1/C-2 Teil ausweiten und dieser könnte sich in Richtung Glutamat 185 drehen. Dieser Teil des Substrates weist die größte Beweglichkeit auf, während der Rest gut verankert wirkt.

Der auffallendste Abschnitt in der Sequenz der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase ist ein Bereich bestehend aus polaren Aminosäuren, der sich von der Aminosäure 21 bis 30 erstreckt. Ein Alignment, das sich auf 54 Organismen bezieht, zeigt eine absolute Homologie bei 5 Aminosäuren. Die rot unterlegten Aminosäuren weisen bei einem Austausch eine spezifische Aktivität von weniger als 1 % im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 52).

<i>Methanococcus jannaschii</i>	DSDEREGETD
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	DADNRERET D
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	DFEDREGETD
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	DDEDRENEGD
<i>Lycopersicon Esculentum</i>	DDEDRENEGD
<i>Arabidopsis thaliana</i>	DDENRENEGD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DDAGRENEGD
<i>Escherichia coli</i>	DDEDRENEGD
<i>Haemophilus influenzae</i>	DDEDRENEGD
<i>Bacillus subtilis</i>	DDEDRENEGD
<i>Aquifex aeolicus</i>	DDPDRENEGD

Abb. 52: Sequenz Alignment des streng konservierten Bereichs der DS am Beispiel von verschiedenen Organismen. Die rot hinterlegten absolut konservierten Aminosäuren weisen nach Austausch eine spezifische Aktivität von weniger als 1 % im Vergleich zum Wildtyp auf.

Der polare Loop stellt einen Teil des aktiven Zentrums dar (Abb. 53). Das Aspartat 21 stabilisiert die Geometrie des Loops, indem es Wasserstoffbrücken zu den NH-Gruppen von Glutamat 28 (3.0 Å) und 26 (3.3 Å) und eine Salzbrücke zu Arginin 25 (3.25 Å) ausbildet. D21N, D21E und D21S weisen eine drastisch reduzierte spezifische Aktivität auf. Serin 22 zeigt ins Solvens und bildet eventuell eine Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe von Glutamat 24 (3.3 Å) aus. Die spezifische Aktivität von S22A ist um den Faktor 2 kleiner als die des Wildtyps. Die Aminosäure Aspartat 23 zeigt ebenfalls ins Solvens und durch Mutation zu D23S reduziert sich die spezifische Aktivität der DS um den Faktor 5. Die Aminosäure Glutamat 26 bindet über ihre Carboxylatgruppe an beide Metalle, während Glutamat 28 über ein Wassermolekül an die OH-Gruppe des C-3 und über ein anderes Wassermolekül an Zink bindet. Ein Austausch durch D, S bzw. Q hat eine Reduktion der spezifischen Aktivität auf unter 1 % des Wildtyps zur Folge. Aspartat 30 koordiniert über ein Wassermolekül an Zink als auch an die OH-Gruppe von C-4. Der Austausch der Aminosäure Aspartat 30 durch Glutamat und Asparagin führt zu einem Aktivitätsverlust von unter 1 % und bei Serin von 2 % der Wildtypaktivität.

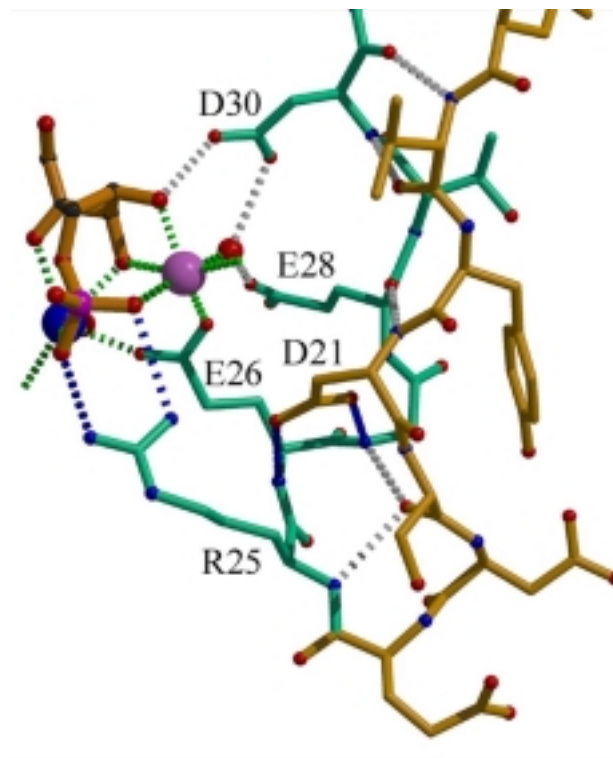


Abb. 53: Der polare Loop der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.

Die Aminosäuren Arginin 25 und 161 binden über ihre Guanidiniumgruppe an die Phosphatgruppe des Substrates. Threonin 165 ist ebenso an der Stabilisierung der Phosphatgruppe von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat beteiligt (Abb. 54). Die Mutanten

R161S bzw. T165A und T165S besitzen eine spezifische Aktivität von 10 %, 50 % bzw. 36 % des Wildtyps. Die Mutante T165S weist einen K_M -Wert auf, der um den Faktor 2 geringer ist als beim Wildtyp. R25E und R25K zeigen eine starke Aktivitätsverminderung auf 2 % bzw. unter 1 % im Vergleich zum Wildtyp. Die stärkere Abnahme an Aktivität bei einem Austausch der Aminosäure Arginin 25 gegenüber von Arginin 161 bzw. Threonin 165 lässt sich dadurch erklären, dass Arginin 25 nicht nur zur Phosphatgruppenstabilisierung dient, sondern auch den polaren Loop stabilisiert.

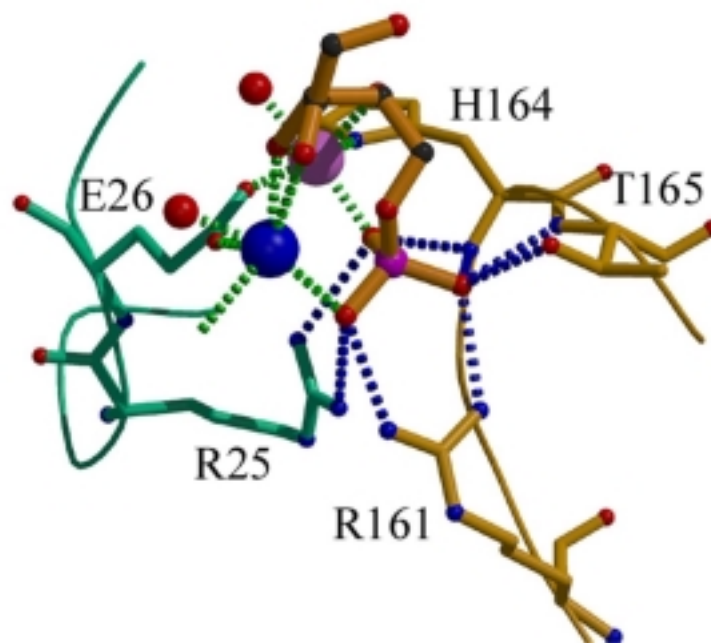


Abb. 54: Die Phosphatbindestellen des DHBP.

Die Aminosäuren Threonin 112, 115 und 122, Aspartat 118 und Arginin 119 die entsprechend der NMR-Daten (Kelly *et al.*, 2001) an der Substratbindung beteiligt sein sollten, sind nicht in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert. Die Mutanten T112A, T115A, D118S, R119S und T122A weisen eine spezifische Aktivität von 2 %, 26 %, 28 %, 11 % bzw. 41 % im Vergleich zum Wildtyp auf.

3.4.10 Der hypothetische Reaktionsmechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

Durch die Auswertung der kinetischen Daten der Mutanten und der Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse des aktiven Zentrums können den Aminosäuren und den beiden Metallionen des aktiven Zentrums potentielle Funktionen am Reaktionsmechanismus zugeteilt werden (Abb. 55). Zusätzlich wurden noch Daten aus NMR-Experimenten, die von W. Römisch durchgeführt wurden, mit einbezogen. Durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurde die Bildung von Formiat aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ribulose-5-phosphat}$ gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Mutante D21E Phosphorglycerat bildet.

Es wird angenommen, dass im aktiven Zentrum bei der Katalyse Magnesiumionen und nicht Zink- bzw. Calciumionen vorliegen. Die magnesiumabhängig DS ist inaktiv, wenn statt Magnesium Zink eingesetzt wird. Die Metalle im Kristall sind auf den zink- und calciumhaltigen Puffer beim Kristallisieren zurückzuführen.

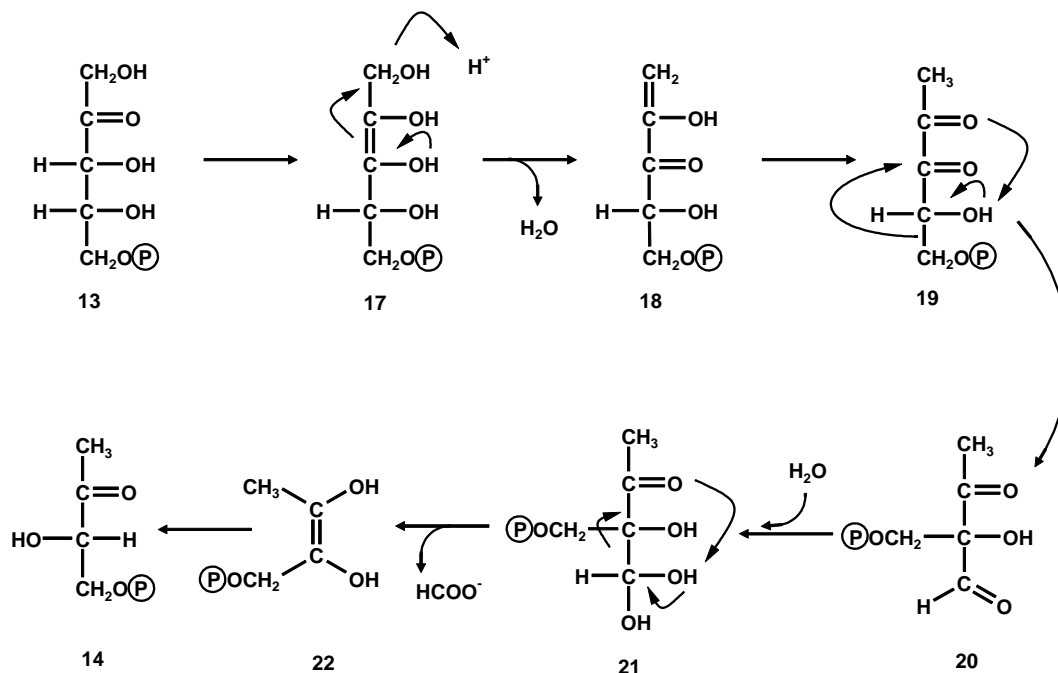


Abb. 55: Der postulierte Reaktionsmechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.

Die Reaktion beginnt vermutlich mit der Enolisierung von Ribulose-5-phosphat (Abb. 55). Das Endiol 17 bildet sich durch die Abstraktion des Protons an C-3 und der Protonierung der Ketogruppe von C-2. Ein analoges Verhalten zeigen die Triosephosphatisomerase (TIM) und die D-Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase (Rubisco). Die beiden Enzyme katalysieren Reaktionen, die ebenfalls durch eine Enolisierung eingeleitet werden. Die TIM

setzt Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Dihydroxyaceton-phosphat um (Abb. 56). Die Reaktion läuft über eine endiolische Zwischenstufe. Dabei erfolgt die Abstraktion des Protons durch die Carboxylatgruppe eines Glutamats und die Protonierung der Carbonylgruppe des Aldehyds durch ein Histidin (Knowles 1991). Die Aminosäuren Glutamat 26 und Histidin 164 könnten in der DS diese Protonentransferfunktionen übernehmen. Die magnesiumabhängige Rubisco, die Ribulose-1,5-bisphosphat zu 3-Phosphoglycerat umsetzt, katalysiert im ersten Schritt eine Enolisierung (Abb. 56). Es wird vermutet, dass der Protonentransfer von der Carbamatgruppe eines Lysins unterstützt wird. Die Carbamatgruppe ist mit einem Sauerstoff an das Magnesium koordiniert, um die negative Ladung zu stabilisieren. Der andere Sauerstoff der Carbamatfunktion kann C-3 deprotonieren und das Proton auf die Carbonylgruppe übertragen (Taylor *et al.*, 1997). Die Aminosäure Glutamat 26 könnte mit ihrer Carboxylatgruppe entsprechend der Carbamatfunktion des Lysins, die Aufgaben des Protonentransfers übernehmen.

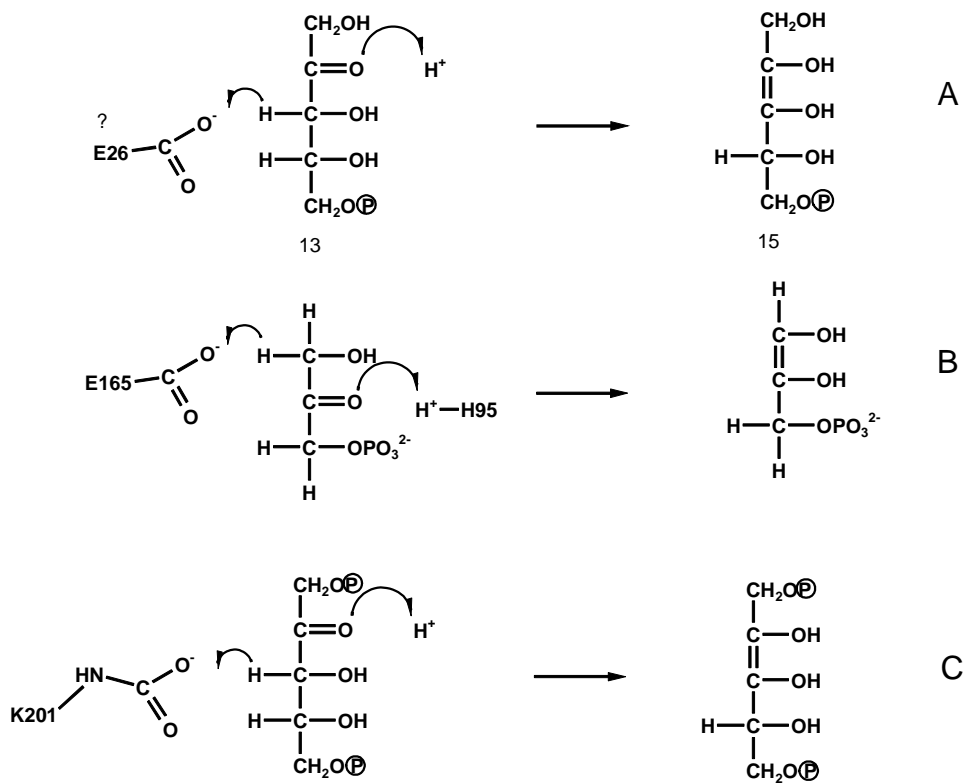


Abb. 56: Enolisierungsschritt der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (A), der Triosephosphatisomerase (B) und der Rubisco (C).

Den zweiten Schritt der Reaktion der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthese stellt die Enolbildung dar (Abb. 55). Ein intramolekularer Angriff der OH-Gruppe von C-1 an C-4 findet trotz des minimalen Abstandes von 2.6 Å nach der Enolisierung nicht statt. Dies konnte von W. Römisch (unveröffentlichte Ergebnisse) durch ein NMR-Experiment mit H₂¹⁸O nachgewiesen werden. Die Hydroxylgruppe des C-3 dürfte im deprotonierten Zustand vorliegen, da sie von beiden Metallen koordiniert wird. Dies würde die Wasserabspaltung erleichtern.

Das Enol 18 wird durch Tautomerisierung in das Methyldiketon 19 umgewandelt (Abb. 55). Dabei wird die Hydroxylgruppe des C-2's deprotoniert, während C-1 ein Proton aus dem Lösungsmittel erhält (Volk *et al.*, 1988). Die Mutante D21E bildet Phosphorglycerat, das ein Spaltprodukt des Methyldiketons sein könnte.

Das verzweigte Intermediat 20 entsteht durch eine sigmatrope Umlagerung der Phosphormethylengruppe (Volk *et al.*, 1988), wobei die Hydroxylgruppe von C-4 deprotoniert wird, während die Carbonylgruppe des C-3 ein Proton erhält (Abb. 55). Ähnliche Reaktionen werden von der Ketolsäure Reduktoisomerase und der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase katalysiert (Abb. 57). Die Ketolsäure Reduktoisomerase setzt 2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoat zu Dihydroxyvalerat um (Biou *et al.*, 1997). Die Ketolsäure Reduktoisomerase, die im aktiven Zentrum zwei Magnesiumionen besitzt, katalysiert eine Alkylwanderung, die mit der sigmatropen Umlagerung der DS vergleichbar ist. Die Aufgabe der Magnesiumionen ist die Stabilisierung der negativen Ladungen der Sauerstoffe bei der Alkylwanderung. Diese Funktion könnten die Magnesiumionen auch im Fall der DS übernehmen. Die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (DXR) setzt 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphat um, indem sie eine intramolekulare Umlagerung und eine Reduzierung katalysiert (Abb. 57) (Reuter *et al.*, 2002). Die DXR benötigt zweiwertige Metallionen, welche vermutlich von streng konservierten sauren Aminosäuren des aktiven Zentrums koordiniert werden.

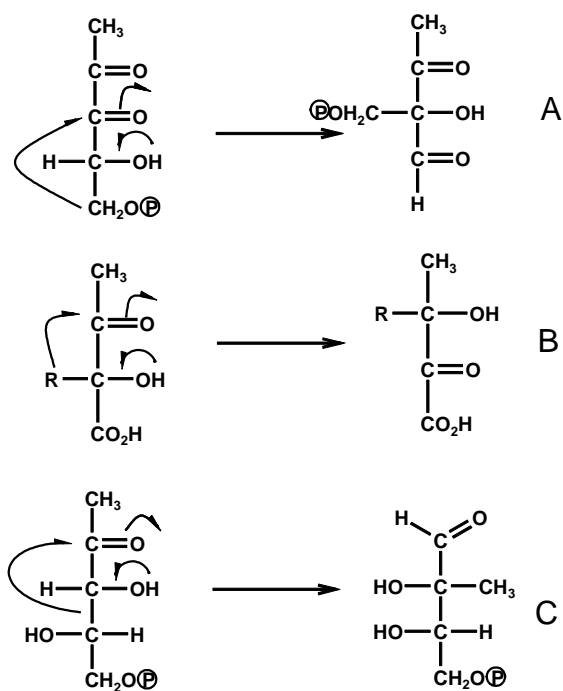


Abb. 57: Intramolekulare Umlagerung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (A), der Ketolsäure Reduktoisomerase (B) und der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase.

Durch Anlagerung eines Wassermoleküls, das eventuell durch die Bindung an ein Magnesiumion aktiviert ist, entsteht das Intermediat 21 (Abb. 55). Die Formiatabsplaltung (Volk *et al.*, 1988) begleitet von einem Protonentransfer führt zu dem Endiol 22. Die Keto-Enol-Tautomerisierung bildet dann unter Aufnahme eines Protons aus dem Lösungsmittel (Volk *et al.*, 1988) 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (14).

Für die Reaktion sind zahlreiche Protonenübertragungsreaktionen notwendig, die durch metallionen-aktivierte Wassermoleküle erleichtert werden könnten. Zudem können die Aminosäuren Glutamat 185 und Aspartat 30 bei der Katalyse Säure/Base-Funktionen übernehmen, da sie über Wassermoleküle an die Metallionen koordinieren. Die Magnesiumionen können Carbonylgruppen polarisieren und damit eine Protonierung erleichtern. Außerdem dienen die Magnesiumionen zur Stabilisierung von Übergangszuständen, bei denen negative Ladungen an einem Sauerstoff auftreten.

4. Zusammenfassung

Die Reaktion der GTP Cyclohydrolase I stellt den ersten Schritt der Biosynthese von Tetrahydrobiopterin in Vertebraten und von Tetrahydrofolat in Bakterien und Pflanzen dar. Die GTP Cyclohydrolase I katalysiert die hydrolytische Spaltung des Imidazolrings von GTP unter Formiatabsplattung. Das GTP Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein (GFRP) reguliert *in vivo* die Biosynthese von Tetrahydrobiopterin über die Aktivität der GTP Cyclohydrolase I in Abhängigkeit des intrazellulären Spiegels von Phenylalanin und Tetrahydrobiopterin. Das GFRP bildet mit der GTP Cyclohydrolase I und Phenylalanin einen aktivierenden Komplex, während es die GTP Cyclohydrolase I in Anwesenheit von BH_4 und GTP inhibiert. Die vorliegende Arbeit beschreibt Struktur-Wirkungsbeziehungen des GFRP und Untersuchungen bezüglich der Komplexbildungseigenschaften zwischen dem GFRP und der GTP Cyclohydrolase I. Zusätzlich wurde das Gen des GFRP's aus Huhn kloniert.

Das GFRP aus Ratte wurde in *E. coli* überexprimiert und gereinigt. Die Kristallstruktur des GFRP konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von R. Huber gelöst werden. Das GFRP weist ebenso wie die GTP Cyclohydrolase I eine pentamere Struktur auf. Die spezifische Aktivität der humanen GTP Cyclohydrolase I liegt bei $135 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Der inhibierende Komplex bestehend aus humaner GTP Cyclohydrolase I, GFRP aus Ratte und BH_4 weist eine spezifische Aktivität von $3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ auf.

Das GFRP aus Ratte und das humane GFRP sind zu 95 % identisch. Das humane GFRP-Gen wurde synthetisch hergestellt, in *E. coli* überexprimiert und gereinigt. Das humane GFRP reguliert die Aktivität der humanen GTP Cyclohydrolase I auf $3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Durch gezielte Mutation einzelner Aminosäuren wurde der Komplex aus humaner GTP Cyclohydrolase I und GFRP aus Ratte untersucht. Die Struktur der humanen GTP Cyclohydrolase I zeigt, dass Glutamat 236 an der Kontaktstelle der beiden Proteine liegt. Durch gerichtete Mutagenese wurden die Punktmutanten E236A, E236D und E236Q generiert. Die Punktmutanten verhielten sich wie der Wildtyp hinsichtlich der Reprimierung. Die Aminosäure 236 hat also keinen Einfluss auf die Komplexbildung.

Die humane GTP Cyclohydrolase I besteht aus zwei assoziierten Pentameren. Zusammen mit zwei pentameren GFRP bildet die GTP Cyclohydrolase I einen sandwichartigen Komplex. Durch die Konstruktion eines Fusionsproteins konnte gezeigt werden, dass das GFRP mit seiner konkaven Seite an die GTP Cyclohydrolase I bindet, was auch mit den elektrostatischen Potentialen der beiden aufeinandertreffenden Enzymoberflächen übereinstimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es das bis dahin unbekannte Gen des GFRP's aus Huhn zu klonieren. Die Aminosäuresequenz des GFRP's aus Huhn zeigt etwa 84% Homologie zum humanen Protein.

Die GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* katalysiert den ersten Schritt in der Biosynthese von Tetrahydrofolat. Zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurden Mutanten der GTP Cyclohydrolase I durch gerichtete Mutagenese erzeugt. Einige Mutanten reicherten das Zwischenprodukt 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat an. Durch Zufallsmutagenese wurden weitere Mutanten, die eine erhöhte Fließgleichgewichtskonzentration von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat aufweisen, erzeugt. Die mutierten Proteine wurden in einem *in vivo* Test überprüft, in wie weit sie 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat anreichern. Die erfolgreichste Strategie der Zufallsmutagenese stellte die PCR dar. Bei den generierten Mutanten waren neben neuen Aminosäuren auch bekannte Aminosäuren ausgetauscht. Von den neuen Mutanten war jedoch keine in der Lage, mehr 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat herzustellen, als die bislang bekannten.

Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (DS) katalysiert einen der beiden Eingangsschritte in der Biosynthese von Riboflavin. Die DS setzt Ribulose-5-phosphat zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat um. Die Strukturaufklärung und Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der DS waren Ziel dieser Arbeit.

Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii* wurde exprimiert und durch Ammoniumsulfatfällung, Phenyl Sepharose und Hydroxylapatit Chromatographie gereinigt. Die spezifische Aktivität der magnesiumabhängigen 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase liegt bei $148 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Das Produkt der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii* weist L-Konfiguration auf.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von R. Huber wurde die Röntgenstruktur gelöst. Die Lage des aktiven Zentrums der DS wurde durch die Bestimmung der Struktur der inaktiven Punktmutante H147S in Gegenwart des Substrates identifiziert. Im aktiven Zentrum der homodimeren 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase befindet sich ein Zink- und ein Calciumion. Der Kofaktor Magnesium kann bedingt durch Mangan aber nicht durch Cadmium oder Zink ersetzt werden. Während der Katalyse sind die beiden Metallplätze von Magnesiumionen belegt. Das aktive Zentrum ist zum größten Teil in einem Monomer lokalisiert, da nur die Aminosäure Histidin 147 von dem anderen Monomer stammt. Am bemerkenswertesten ist ein Loop (21-30), bestehend aus polaren konservierten Aminosäuren, der einen Teil des aktiven Zentrums darstellt. Durch gezielte Mutation einzelner Reste des

aktiven Zentrums konnten teil- und inaktive Mutanten der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase hergestellt und die Funktionen einzelner Aminosäuren untersucht werden. Es zeigte sich, dass die Aminosäuren Aspartat 21 und 30, Arginin 25, Glutamat 26, 28 und 185 und Histidin 147 und 164 für die Katalyse essentiell sind.

5. Literaturverzeichnis

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 pteridins and brain neurotransmitters. *EMBO J.* **16**, 7219-7230.

Auerbach, G., Hermann, 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 human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13567-13572.

Bacher, A. and Lingens, F. (1970), Biosynthesis of riboflavin. Formation of 2,5-diamino-6-hydroxy-4-(1⁻D-ribitylamino)pyrimidine in a riboflavin auxotroph. *J. Biol. Chem.* **245**, 4647-4652.

Bacher, A. and Mailänder, B. (1973), Biosynthesis of riboflavin. The structure of the purine precursor. *J. Biol. Chem.* **248**, 6227-6231.

Bacher, A. and Mailänder, B. (1976), Biosynthesis of riboflavin. Structure of the purine precursor and origin of the ribityl side chain. In: *Flavins and Flavinproteins*. Singer, T.P. (ed.), Biological and Medical Press, Amsterdam, 733-736.

Bacher, A., LeVan, Q., Bühler, M., Keller, P. J., Eimicke, V. and Floss, H. G. (1982), Biosynthesis of Riboflavin. Incorporation of D-(1-¹³C)-ribose. *J. Amer. Chem. Soc.* **104**, 3754-3755.

Bacher, A., LeVan, Q., Keller, P. J. and Floss, H. G. (1983), Biosynthesis of Riboflavin. Incorporation of ¹³C-Labeled Precursor into the Xylene Ring, *J. Biol. Chem.* **258**, 13431-13437.

Bacher, A., LeVan, Q., Bühler, M., Keller, P. J. and Floss, H. G. (1983a), Biosynthesis of Riboflavin. The Origin of the Xylene Ring. In: *Chemistry and Biology of Pteridines*. Blair, J. A. (ed.), Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 699-703.

Bacher, A., LeVan, Q., Keller, P. J. and Floss, H. G. (1985), Biosynthesis of Riboflavin. Incorporation of multiply ^{13}C -Labeled Precursor into the Xylene Ring, *J. Amer. Chem. Soc.* **107**, 6380-6385.

Bacher, A. (1986), Heavy riboflavin synthase from *B. subtilis*. *Methods Enzymol.* **122**, 192-199.

Bacher, A. (1991), Biosynthesis of flavins. In: Chemistry and Biochemistry of Flavoproteins, Müller, F. (ed.), CRC Press, Boca Ration, Fl, **1**, 349-370.

Bacher, A., Eberhardt, S. and Richter, G. (1996), Biosynthesis of riboflavin. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt, F. C. *et al.* (eds.), American Society for Microbiology, Washington DC, **2**, 657-664.

Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. and Richter, G. (2000), Biosynthesis of vitamin B₂ (riboflavin). *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 153-167.

Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., Illarionov, B., Kis, K. and Richter, G. (2001), Biosynthesis of riboflavin. *Vitamins and Hormones* **61**, 1-44.

Baugh, G. M. and Krumdiek, C. L. (1969), Biosynthesis of riboflavine in *Corynebacterium* species: The purine precursor. *J. Bacteriol.* **98**, 1114-1119.

Biou, V., Dumas, R., Cohen-Addad, C., Douce, R., Job, D. and Pebay-Peyroula, E. (1997), the crystal structure of plant acetohydroxy acid isomeroreductase complexed with NADPH, two magnesium ions and a herbicidal transition state analog determined at 1,65 Å resolution. *EMBO J.* **16**,3405-3415.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979), a rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA, *Nucl. Acids. Res.* **7**, 1512-1522.

Blau, N., Joller, P., and Atares, M. (1985), *Clin. Chim. Acta.* **148**, 47-52.

Blau, N., Barnes, I. and Dhondt, J. L. (1996), International database of tetrahydrobiopterin deficiencies, *J. Inherit. Metab. Dis.* **19**, 8-14.

Bracher A. (1998), Struktur und Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase I. *Doktorarbeit*, Technische Universität München.

Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., Götze, E., Herrmann, A., Gütlich, 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.

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.

Bradford M. (1976), A rapid and selective method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Briggs, W. E. and Huala, E. (1999), Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **15**, 33-62.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M. (1987), XL-1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -Galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.

Burrows, R. B. and Brown, G. M. (1978), Presence in *Escherichia coli* of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J. Bacteriol.* **136**, 657-667.

Compton, S. J. and Jones, C. G. (1985), Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay. *Anal. Biochem.* **151**, 369-374.

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.

Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988), High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation, *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.

Fischer, M. (1997), Effiziente Methoden zur in vitro Mutagenese: Untersuchungen zum Mechanismus von Lumazinsynthase und GTP-Cyclohydrolase I. *Doktorarbeit*, Technische Universität München.

Floss, H. G., LeVan, Q., Keller, P. J. and Bacher, A. (1983), Biosynthesis of Riboflavin. An Unusual Rearrangement in the Formation of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine. *J. Amer. Chem. Soc.* **105**, 2493-2494.

Foor, F. and Brown, G. M. (1975), Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**, 3545-3551.

Foor, F. and Brown, G. M. (1980), GTP-cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. In: *Methods in Enzymology*. McCormick, D. B. and Wright, L. D. (eds.), Academic Press, New York, **66**, 303-307.

Foy, H. and Mbaya, V. (1977), Riboflavin. *Prog. Food Nutr. Sci.* **2**, 256-262.

Fromant, M., Blanquet, S. and Plateau P. (1995), Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **224**, 347-353.

Gabb, H. A., Jackson, R. M. and Sternberg, M. J. E. (1997), Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* **272**, 106-120.

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. USA* **88**, 7091-7095.

Götze, E., Kis, K., Eisenreich, W., Yamauchi, N., Kakinuma, K. and Bacher, A. (1998), Biosynthesis of riboflavin. Stereochemistry of 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase reaction. *J. Org. Chem.* **63**, 6456-6457.

Greener, A., Callahan, M. and Jerpseth, B. (1996), An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Methods Mol Biol.* **57**, 375-385.

Hanahan, D. (1983), Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol Biol.* **166**, 557-580.

Harada, T., Kagamiyama, H. and Hatakeyama, K. (1993), Feedback Regulation Mechanism for the Control of GTP Cyclohydrolase I Activity. *Science* **260**, 1507-1510.

Harvey, R. A. and Plaut, G. W. E. (1966), Riboflavin synthase from yeast: Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin. *J. Biol. Chem.* **241**, 2120-2136.

Harzer, B., Rokos, H., Otto, M. K., Bacher, A. and Ghisla, S. (1978). Biosynthesis of riboflavin. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine 5'-phosphate is not a substrate for riboflavin synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **540**, 48-54.

Herrmann A. (1999), Rekombinante Expression, in vitro-Mutagenese und Reaktionsmechanismus von Enzymen der Tetrahydrobiopterin-Biosynthese aus Säugetieren. *Doktorarbeit*, Technische Universität München.

Holmes, D. S. and Quigley, M. (1981), A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.

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.

Ichinose, H., Ohye, T., Takahashi, E., Seki, N., Hori, T., Segawa, M., Nomura, Y., Endo, K., Tanaka, H., Tsuji, S., Fujita, K. and Nagatsu, T. (1994), Hereditary Progressive Dystonia with

Marked Diurnal Fluctuation Caused by Mutations in the GTP Cyclohydrolase I Gene. *Nature Gen.* **8**, 236-242.

Kapatos, G., Hirayama, K., Shimoji, M. and Milstien, S. (1999), GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein is expressed in serotonin neurons and regulates tetrahydrobiopterin biosynthesis. *J Neurochem.* **72**, 669-675.

Kaufman, S. and Fischer, D. B. (1962), In: *Oxygenases*. Academic Press, New York, 285-337.

Kaufman, S. (1967), Metabolism of the phenylalanine hydroxylation cofactor. *J. Biol. Chem.* **242**, 3934-3943.

Kaufman, S. (1967), Pteridine Cofactors. *Ann. Rev. Biochem.* **36**, 171-184.

Kaufman, S., Pollock, R. J., Summer, G. K., Das, A. K. and Hajra, A. K. (1990), Dependence of an alkyl glycerol ether monooxygenase activity upon tetrahydropterins. *Biochem. Biophys. Acta* **1040**, 19-27.

Kelly, M. J. S., Ball, L. J., Krieger, C., Yu, Y., Fischer, M., Schiffmann, S., Schmieder, P., Kühne, P., Bermel, W., Bacher, A., Richter, G. and Oschkinat, H. (2001), The NMR Structure of the 47 kD Dimeric Enzyme 3,4-Dihydroxy-2-Butanone-4-Phosphat-Synthase and Ligand Binding Studies Reveal the Location of the Active Site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13025-13030.

Keller, P. J., LeVan, Q., Bacher, A. and Floss, H. G. (1983), Biosynthesis of Riboflavin. ¹³C-NMR Techniques for the Analysis of Multiply ¹³C-Labeled Riboflavins. *Tetrahedron* **39**, 3471-3481.

Keller, P. J., LeVan, Q., Bacher, A., Kozlowski, J. F. and Floss, H. G. (1983a), Biosynthesis of Riboflavin. Analysis of Biosynthetically ¹³C-Labeled Riboflavin by Double-Quantum and 2-Dimensional NMR. *J. Amer. Chem. Soc.* **105**, 2505-2507.

Kis, K. and Bacher, A. (1995), Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J. Biol Chem.* **270**, 16788-16795.

Kis, K., Volk, R. and Bacher, A. (1995), Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry* **34**, 2883-2892.

Knowles, J. R. (1991), Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **350**, 121-124.

Kuhn, R., György, P. and Wagner-Jauregg, T. (1933), Über Lactoflavin, den Farbstoff der Molke. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **66**, 1034-1038.

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. Bio. Chem.* **264**, 20496-20501.

Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of Structural Proteins During the Assambly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lee, J. (1985), In: Chemi- and bioluminescence. Burr, J. G. (ed.), Marcel Dekker, New York, 401-437.

Lee J. *et al.* (1991), In: Chemistry and Biochemistry of Flavins and Flvoenzymes. Müller, F. (ed.), CRC Press, Orlando, **2**, 109-151.

LeVan, Q., Keller, P. J., Bown, D. H., Floss, H. G. and Bacher, A. (1985), Biosynthesis of riboflavin in *Bacillus subtilis*. Origin of the 4-carbon moiety. *J. Bacteriol.* **162**, 1280-1284.

Liao, D. I., Calabrese, J. C., Wawrzak, Z., Viitanen, P. V. and Jordan, D. B. (2001), Crystal structure of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of riboflavin biosynthesis. *Structure* **9**, 11-16.

Liao, D. I., Zheng, Y. J., Viitanen, P. V. and Jordan, D. B. (2002), Structural definition of the active site and catalytic mechanism of 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate Synthase. *Biochem.* **41**, 1795-1806.

Maita, N., Okada, K., Hatakeyama, K. and Hakoshima, T. (2002), crystal structure of the stimulatory complex of GTP Cyclohydrolase I and its feedback regulatory protein GFRP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1212-1217.

Mann, M. and Wilm, M. (1995), Elektrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 219-224.

De Marynoff, 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.

Masako, M., Katoh, S., Akino, M. and Kaufman, S. (1966); Sepiapterin reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 202-212.

Marti, T. M, Kunz, C. and Fleck, O. (2002), DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol.* **191**,28-41.

Meighen, E. A. (1991), Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev.* **55**, 123-142.

Meighen, E. A. (1993), Bacterial bioluminescence: organization, regulation and application of the lux genes. *FASEB J.* **7**, 1016-1022.

Milstien, S. and Bonner, T. I. (1997), Cloning of Rat cDNA and the human Gene for GTP Cyclohydrolase I Feedback regulatory Protein, GFRP. In: Chemistry and Biology of Pteridines and Folates. Pfeleiderer, W., Rokos, H., (eds.), Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin-Viena, 547-552.

Müller, F., Ghisla, S. and Bacher, A. (1988), Vitamin B₂ und natürliche Flavine. In: Vitamine II; Wasserlösliche Vitamine. Isler, O. *et al.* (eds.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 50-159.

Müller, F. (1992), Nuclear magnetic resonance studies on flavoproteins. In: Chemistry and biochemistry of flavoenzymes. Müller, F. (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, **3**, 557-595.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Ehrlich, H. (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp.* **51**, 263-273.

Nar, H., Huber, R., Heizmann, C. W., Thöny, B. and Bürgisser, D. B. (1994), Three dimensional structure of 6-pyruvoylpterin synthase, an enzyme involved in tetrahydrobiopterin biosynthesis. *EMBO J.* **13**, 1255-1262.

Nar, H., Huber, R., Meining, W., Schmid, C., Weinkauff, S. and Bacher, A. (1995), Atomic Structure of GTP cyclohydrolase I. *Structure* **3**, 459-466.

Nar, H., Huber, R., Auerbach, G., Fischer, M., Hösl, 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 USA* **92**, 12120-12125.

Neuberger, G. and Bacher, A. (1986), Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1111-1116.

Nichol, C. A., Smith, G. K. and Duch, D. S. (1985), Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annal. Rev. Biochem.* **54**, 729-764.

Niederwieser, A., Blau, N., Wang, M., Joller, P., Atarés, M. and Cardesa-Garcia., J. (1984), GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenylalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine and serotonin deficiencies and muscular hypotonia. *Eur. J. Pediatr.* **141**, 208-214.

Nielsen, P. and Bacher, A. (1981), Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the product of the deaminase. *Biochim. Biophys. Acta* **662**, 312-317.

O'Kane, D. J. and Prasher, D. C. (1992), Evolutionary origins of bacterial bioluminescence. *Mol Microbiol.* **6**, 443-449.

Okayama, H. and Berg, P. (1982), High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 161-170.

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.

Oppliger, T., Thöny, B., Nar, H., Bürgisser, D., Huber, R., Heizmann, C. W. and Blau, N. (1995), Structural and Functional Consequences of Mutations in 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase causing Hyperphenylalaninemia in Humans. Phosphorylation is a Requirement for *in vivo* Activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 29498-29506.

Pfleiderer, W. (1985), In: *Folates and Pterins*. Blakely, R. L. and Benkovic, S.J., (eds.), John Wiley & Son, New York, **2**, 43-114

Plaut, G. W. E. (1960), Studies on the stoichiometry of the enzymic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.* **235**, 41-42.

Plaut, G. W. E. (1963), Studies on the nature of the enzymic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.* **238**, 2225-2243.

Plaut, G. W. E., Beach, R. L. and Aogaichi, T. (1970), Studies on the mechanism of elimination of protons from the methyl groups of 6,7-dimethyl-6-ribityllumazine by riboflavin synthetase. *Biochemistry* **9**, 771-785.

Plaut, G. W. E. (1971), Metabolism of water-soluble vitamins: The biosynthesis of riboflavin. In: *Comprehensive Biochemistry*. Florkin, M. and Stotz, E. H. (eds.), Elsevier, Amsterdam, **21**, 11-45.

Plaut, G. W. E. and Harvey, R. A. (1971), The enzymic synthesis of riboflavin. In: *Methods in Enzymology*. McCormick, D. B. and Wright, L. D. (eds.), Academic Press, New York, **18B**, 515-538.

Radomski, M. W., Palmer, R. M. and Moncada, S. (1990), An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5193-5197.

Read, S. M and Northcote, D. H. (1981), Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dyebinding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**, 53-64.

Reuter, K., Sanderbrand, S., Hassan, J., Wiesner, J., Steinbrecher, I., Beck, E., Hintz, M., Klebe, G. and Stubbs, T. M. (2002), Crystal structure of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 5378-5384.

Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H. W., Rothlisberger, U. and Bacher, A. (1992), Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 4050-4056.

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 of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 4045-4051.

Richter, G. (1995), Klonierung und Expression von Genen der Riboflavinbiosynthese aus *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. *Doktorarbeit*, Technische Universität München.

Richter, G., Krieger, C., Volk, R., Kis, K., Ritz, H., Götze, E. and Bacher, A. (1997), Biosynthesis of riboflavin: 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Methods Enzymol.* **280**, 374-382.

Sancar, A. (1994), Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**, 2-9.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977), DNA sequencing with chain termination inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Schallreuter, K., Wood, J., Pittelkow, M., Gütlich, M., Lemke, K., Rodl, W., Swanson, N., Hitzemann, K. and Ziegler I. (1994), Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **263**, 1444-1446.

Scheuermann, R. H. and Echols, H. (1984), A separate editing exonuclease for DNA replication: the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**, 7747-7751.

Schiffmann, S. (1998), Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase I aus *Escherichia coli*, *Diplomarbeit*, Technische Universität München.

Schoedon, G., Troppmair, J., Fontana, A., Huber, C., Curtius, H. C. and Niederwieser, A. (1987), Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse. *Eur J Biochem.* **166**, 303-310.

Schramek, N. (2001), Kinetische Untersuchungen von Enzymen der Tetrahydrobiopterin-, Riboflavin- und Folsäure-Biosynthesewege. *Dissertation*, Technische Universität München.

Sedlmaier, H., Müller, F., Keller P. J. and Bacher, A. (1987), Enzymatic synthesis of riboflavin and FMN specifically labeled with ¹³C in the xylene ring. *Z. Naturforsch.* **42c**, 425-429.

Sgamarella, V., van de Sande, J. H. and Khorana, H. G. (1979), Studies on the polynukleotides, C. A novel joining reaction catalysed by the T4-polynukleotide-ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* **67**, 1468-1475.

Shiman, R. (1985), In: Folates and Pterins. Blakely, R. L. and Benkovic, S. J. (eds.), John Wiley & Sons, New York, 179-249.

Stüber, D., Matile, H. and Garotta, G. (1990), System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping,

preparation of antibodies and structure-function analysis. In: Immunological Methods IV. Lefkovits, I. and Pernis, P. (eds.), 121-152.

Tanaka, K., Kaufmann, S. and Milstien, S. (1989), Tetrahydrobiopterin, the cofactor for aromatic amino acid hydroxylases, is synthesized by and regulates proliferation of erythroid cell. *Pro. Natl Acad Sci USA* **86**, 5864-5867.

Taylor, T. C. and Andersson, I. (1997), The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J. Mol. Biol.* **265**, 432-444.

Thöny, B., Auerbach, G. and Blau, N. (2000), Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J.* **347**, 1-16.

Volk, R. and Bacher, A. (1988), Biosynthesis of riboflavin. The structure of the 4-carbon precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3651-3653.

Volk, R. and Bacher, A. (1990), Studies on the four carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **265**, 19479-19485.

Volk, R. and Bacher, A. (1991), Biosynthesis of riboflavin: studies on the mechanism of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate Synthase. *J. Biol. Chem.* **266**, 20610-20618.

Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H. and Plaut, G. W. E. (1964), 4-(1'-D-ribityl-amino)-5-amino-2,6-dihydroxypyrimidine, the second product of the riboflavin synthase reaction. *J. Biol. Chem.* **239**, 3493-3497.

Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Yim, J. J. and Wachter, H. (1991), Impact of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on tetrahydrobiopterin synthesis in murine fibroblasts and macrophages. *Biochem J.* **280**, 709-714.

Weygand, F., Simon, H., Dahms, G., Waldschmidt, M., Schliep, H. J. and Wacker, H. (1961), Über die Biogenese des Leucopterins, *Angew. Chem.* **73**, 402-407.

Wolf, W. A. and Brown, G. M. (1969), The Biosynthesis of Folic Acid. X. Evidence for an Amadori Rearrangement in the Enzymatic formation of dihydroneopterin Triphosphate from GTP. *Biochim. Biophys. Acta* **192**, 468-478.

Woodward, R. B. and Hoffmann, R. (1970), Die Einhaltung der Orbitalsymmetrie. *Verlag Chemie*, Weinheim.

Yoneyama, T., Brewer, J. M. and Hatakeyama, K. (1997), GTP Cyclohydrolase I Feedback Regulatory Protein is a Pentamer of identical Subunits; Purification, cDNA Cloning and bacterial Expression, *J. Biol. Chem.* **272**, 9690-9696.

Yoneyama, T. and Hatakeyama, K. (1998), Decameric GTP Cyclohydrolase I forms Complexes with Two Pentameric GTP Cyclohydrolase I Feedback Regulatory Proteins in the Presence of Phenylalanine or of a Combination of Tetrahydrobiopterin and GTP. *J. Biol. Chem.* **273**, 20102 – 20108.

Zamenhof, P. J. and Villarejo, M. (1972), Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting λ -complementation of β -galactosidase fragments in vivo, *J. Bacteriol.* **110**, 171-178.

Ziegler, I., Schott, K., Lubbert, M., Herrmann, F., Schwulera, U. and Bacher, A. (1990), Control of tetrahydrobiopterin synthesis in T lymphocytes by synergistic action of interferon-gamma and interleukin-2. *J. Biol. Chem.* **265**, 17026-17030.

6. Anhang

Bezeichnung	Primersequenz
pNCO -180	5' TGC CAC CTG ACG TCT AAG AAA CC 3'
PNCO -100	5' CTT TCG TCT TCA CCT CGA GAA ATC 3'
PNCO +80	5' ACC GAG CGT TCT GAA CAA ATC C 3'
UniEcoRI	5' CAA TTT GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG 3'
Uni ohne EcoRI	5' CAC AGA TCA CAT TAA AGA GGA GAA ATT AAC TAT G 3'
mRNA 5	5' CTC CAT TTT AGC TTC CTT AGC TCC TG 3'

Tab. 12: Universalprimer.

Bezeichnung	Primersequenz
GFRP-Huhn-wobble-1	5' ATG CCN TAY CTN CTN ATH AGY ACN C 3'
GFRP-Huhn-wobble-2	5' ATG GAR GTN GGN CCN ACN ATG GTN GG 3'
GFRP-Huhn-wobble-3	5' CAR TCN GAY CCN GAR YTN ATG CAR C 3'
GFRP-Huhn-wobble-4	5' TCN ACR TAR TAY TCR TAR AAR TTR TTN CC 3'
GFRP-Huhn-wobble-5	5' RCA CCA NAC NAR NGT YTG NCC NAC NCC 3'
GFRP-Huhn-wobble-6	5' TCA YTC YTT RTG NAR RCA CCA NAC 3'
GFRP-Huhn-KpnI-r	5' CAT ACT CAC CAC CCG GTA CCG AAG CTC 3'
GFRP-Huhn-SacI-f	5' TGG TGG GAG ATG AGC TCT CGG ATC CC 3'
GFRP-Huhn-EcoRI-f	5' ATA ATA GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG CCT TAC CTT CTG ATC AGC ACT CAG ATC CGC ATG G 3'

Tab. 13: Primer zur Amplifizierung der GFRP cDNA aus Huhn.

Bezeichnung	Primersequenz
GFRP-R-BclI-T8V	5' AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG CCC TAC CTG <u>CTG ATC AGC GTT</u> CAG ATC 3'
GFRP-R-MluI-K36E/R37E	5' CC CAG <u>GAC GCG TTC CTC</u> GGA GGC CCC CAA C 3'
GFRP-R-MluI-K36E	5' CC CAG <u>GAC GCG TCT CTC</u> GGA GGC CCC CAA C 3'
GFRP-R-MluI-R37E	5' CC CAG <u>GAC GCG TTC CTT</u> GGA GGC CCC CAA C 3'

Tab. 14: Mutationsprimer für GFRP aus Ratte. Die Mutation ist fett unterlegt und die Erkennungssequenz der Detektionsschnittstelle ist unterstrichen.

Bezeichnung	Primersequenz
GFRP-H-ATG-f	5' GAG GAG AAA TTA ACT ATG CCC TAC CTG CTC ATC AGC ACC 3'
GFRP-H-PstI-r	5' GTC TGC ACT GCA GCA TGA GAA GGT CAC TCC TTG TGC 3'
HSGFRP-1	5' CGG ACC CAG AGC TGA TGC AGC ATC TGG GTG CTT CAA AGC GTC GCG CCC TGG GTA ACA ACT TTT ATG AAT AC 3'
HSGFRP-2	5' CCA GCT TGT CCA GGA CGA TGC GGG GAG GGT CAT CGA CAT AGT ATT CAT AAA AGT TGT TAC CCA GGG CGC G 3'
HSGFRP-3	5' ACC CAG ATC CGC ATG GAG GTG GGC CCT ACT ATG GTG GGC GAT GAA CAG TCG GAC CCA GAG CTG ATG CAG CAT CTG 3'
HSGFRP-4	5' CTG GCC CAC ACC CGT CAT GCT CAG CAC ACG GAA GCC ACG GCG TTC CAG CTT GTC CAG GAC GAT GCG GGG 3'
HSGFRP-5	5' ATA ATA GGA TCC GGT GGT GGC GGT TCT CCT TAC CTG CTC ATC TCT ACC CAG ATC CGC ATG GAG GTG GGC 3'
HSGFRP-6	5' TAT TAT TAT AAG CTT ACT CCT TGT GCA GAC ACC ACA CCA GCG TCT GGC CCA CAC CCG TCA TGC TCA G 3'
HSGFRP-RBS-EcoRI-7	5' ATA ATA GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG CCT TAC CTG CTC ATC TCT ACC CAG 3'

Tab. 15: Synthesepriemer für humanes GFRP.

Bezeichnung	Primersequenz
CH-H-Δ42	5' GAG GAG AAA TTA ACT ATG CCG GAA GCG AAG AGC GCG CAG CCC 3'
Δ42His	5' GAG GAG AAA TTA ACT ATG CAC CAT CAC CAT CAC CAT CCG GAA GCG AAG AGC GCG CAG 3'
Human-CHI-E236A	5' T ATT ATT ATA AGC TTA GCT CCT AAT GAG AGT CAG GAA CTC <u>TTC GCG AGT</u> CTT TGG ATC CGC CCG GAA CAC 3'
Human-CHI-E236D	5' T ATT ATT ATA AGC TTA GCT CCT AAT GAG AGT CAG GAA CTC <u>TTC ACG CGT</u> CTT TGG ATC GTC CCG GAA CAC 3'
Human-CHI-E236Q	5' T ATT ATT ATA AGC TTA GCT CCT AAT GAG AGT CAG GAA CTC <u>TTC CCT AGT</u> CTT TGG ATC CTG CCG GAA CAC 3'
Ec-Cy-Hi	5' TAT TAT TAT GGA TCC TCA GTT GTG ATG ACG CAC AG 3'

Tab. 16: Primer für die GTP Cyclohydrolase I. Die Mutation ist fett unterlegt und die Erkennungssequenz der Detektionsschnittstelle ist unterstrichen.

Bezeichnung	Primersequenz
MJM1	5` GACATTCCTTATGATGAAAAATCATCTTTCTCAATTACAA TTAACACCGTAAGACATTTACTGGTATTACAG 3`
MJM3	5` GCATCTCAAAAATTTAAAGTATTGCGTGAGCTTTATCCAA ATGACATTCCTTATGATGAAAAATCATC 3`
MJM5	5` ATCTGCAATAAACTCGGTATTCCATTCATGGTTGATATCTT AGAATTTGCATCTCAAAAATTTAAAGTATTG 3`
MJM7	5` AAAGACGCTGGTGGCCTCATTTGCACAGCTCTTCATCCGG ATATCTGCAATAAACTCGGTATTCCATTC 3`
MJM9	5` GTTGCCTCCCAATTTATCACTCCAGAGCATATTCGTATCAT GCGTAAAGACGCTGGTGGCCTCATTTGC 3`
MJM11	5` TTAGTTTATGACTCAGATGAGCGTGAAGGTGAAACGGAC ATGGTTGTTGCCTCCCAATTTATCACTCCAG 3`
MJM13	5` AATGTAGAAAAAGCCATTGAAGCACTCAAAAAAGGTGAA ATCATTTTAGTTTATGACTCAGATGAGCGTG 3`
MJM15	5` ATAATAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA ACTATGAAT AATGTAGAAAAAGCATTGAAGCAC 3`
MJM2	5` CAGCCAATTTTTTGATAGTAAATGCACGATCATTATCTGT AATACCAGTAAATGTCTTACGGTGGTTAATTG 3`
MJM4	5` CCTTACCAAAGTCATTA AAAACGGCCTTCTTAACCAATTC AGCCAATTTTTTGATAGTAAATGC 3`
MJM6	5` CTGCTGCGCGCAAGAGAGTTACATGGCCAGGAGAACGAA ATTCCTTACCAAAGTCATTA AAAACGGCC 3`
MJM8	5` ACAGTCATTT CAGTGTGACCTTGACGATTTTTAACAAGAC CTTCTGCTGCGCGCAAGAGAGTTACATG 3`
MJM10	5` TTCACAAATTGTGGTGATAGGCACGAGATTGGCCAGCTCT GCCAGAGCTACAGTCATTT CAGTGTGACCTTGAC 3`
MJM12	5` AACGTTTTGTTTCATTTTTAGACATAGCATTGCCATCATCG CCCATCATTT CACAAATTGTGGTGATAGGCAC 3`
MJM14	5` GATCTCTTACCAGAGAGATAAATGAGATTATGTTTTTCA GCATAACGTTTTGTTTCATTTTTAGACATAG 3`
MJM16	5` TATTATGGATCCTTAATCTTTGAGATATTTATCCAAATAAT AGTTAATGATCTCTTACCAGAGAGATAAATGAG 3`

Tab. 17: Synthesepriemer für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *M. jannaschii*.

Bezeichnung	Primersequenz
MJM-D21E-f	5` AAT GTA GAA AAA GCC ATT GAA GCA CTC AAA AAA GGT GAA ATC ATT TTA GTG <u>TAC</u> GAA TCA GAT GAG CGT G 3`
MJM-D21N-f	5` AAT GTA GAA AAA GCC ATT GAA GCA CTC AAA AAA GGT GAA ATC ATT TTA GTG <u>TAC</u> AAC TCA GAT GAG CGT G 3`
MJM-D21S-f	5` AAT GTA GAA AAA GCC ATT GAA GCA CTC AAA AAA GGT GAA ATC ATT TTA GTG <u>TAC</u> TCG TCA GAT GAG CGT G 3`
MJM-S22A-f	5` AAT GTA GAA AAA GCC ATT GAA GCA CTC AAA AAA GGT GAA ATC ATT TTA GTT TAT <u>GAC</u> <u>GCG</u> GAT GAG CGT G 3`

MJM-D23S-f	5` AAT GTA GAA AAA GCC ATT GAA GCA CTC AAA AAA GGT GAA ATC ATT TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA TCT GAG CGT G 3`
MJM-R25E-f	5` AAT GTA GAA AAA GCC ATT GAA GCA CTC AAA AAA GGT GAA ATC ATT TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG GAG GAA GGT GAA 3`
MJM-R25K-f	5` AAT GTA GAA AAA GCC ATT GAA GCA CTC AAA AAA GGT GAA ATC ATT TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG AAA GAA GGT GAA 3`
MJM-E26D-1	5` TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT GAC GGT GAA ACG GAC ATG GTT GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA G 3`
MJM-E26Q-1	5` TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT CAA GGT GAA ACG GAC ATG GTT GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA G 3`
MJM-E26S-1	5` TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT TCA GGT GAA ACG GAC ATG GTT GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA G 3`
MJM-E26S-2	5` AAT GTA GAA AAA GCC ATT GAA GCA CTC AAA AAA GGT GAA ATC ATT TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT TCA GGT G 3`
MJM-E28D-f	5` TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT GAA GGT GAC ACG GAC ATG GTT GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA G 3`
MJM-E28Q-f	5` TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT GAA GGT CAA ACG GAC ATG GTT GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA G 3`
MJM-E28S-f	5` TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT GAA GGT TCG ACG GAC ATG GTT GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA G 3`
MJM-D30E-f	5` TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT GAA GGT GAA ACG GAA ATG GTT GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA G 3`
MJM-D30N-f	5` TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT GAA GGT GAA ACG AAC ATG GTT GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA G 3`
MJM-D30S-f	5` TTA <u>GTG TAC</u> GAC TCA GAT GAG CGT GAA GGT GAA ACG TCG ATG GTT GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA G 3`
MJM-C55G-1-f	5` ATT CGT ATC ATG CGT AAA GAC GCT GGT GGC CTC ATT GGT ACA GCT CTT C 3`
MJM-C55G-2-f	5` GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA GAG CAT ATT CGT ATC ATG CGT AAA GAC GCT 3`
MJM-C55S-f	5` GTT GCC TCC CAA TTT ATC ACT CCA GAG CAT <u>ATT</u> <u>CGA ATC</u> ATG CGT AAA GAC GCT GGT GGC CTC ATT TCG ACA GCT CTT C
MJM-T112A-r	5` CAG CCA ATT TTT TGA TAG TAA ATG CAC GAT CAT TAT CTG TAA <u>TGC CGG</u> CAA ATG TCT 3`
MJM-T115A-r	5` CAG CCA ATT TTT TGA TAG TAA ATG CAC GAT CAT TAT CAG CTA TAC CAG T 3`
MJM-D118S-r	5` CAG CCA ATT TTT TGA TAG TAA ATG <u>CAC GTG</u> AAT

	TAT CTG T 3`
MJM-R119S-r	5` CAG CCA ATT TTT TGA TAG TAA ATG CGG AAT CAT T 3`
MJM-T122A-r	5` CCT TAC CAA AGT CAT TAA AAC GGC CTT CTT TAA CCA ATT CAG CCA ATT TTT TGA <u>TCG CGA</u> ATG C 3`
MJM-H147S-r	5` TCT CCT GGC TCG GTA ACC CTC TTG CGC GCA TAA TAA TA 3`
MJM-R161S-f	5` ATA ATA ATA GCG CGC AGC AGA AGG <u>TCT AGT</u> TAA AAA TTC TCA AGG TCA C 3`
MJM-H164N-f	5` ATA ATA ATA GCG CGC AGC AGA AGG TCT TGT TAA AAA TCG TCA AGG TAA CAC TGA <u>GAT</u> GAC 3`
MJM-H164S-f	5` ATA ATA ATA GCG CGC AGC AGA AGG TCT TGT TAA AAA TCG TCA AGG GTC GAC TGA AAT GAC 3`
MJM-T165A-f	5` ATA ATA ATA GCG CGC AGC AGA AGG <u>TCT AGT</u> TAA AAA TCG TCA AGG TCA CGC TGA AAT GAC T 3`
MJM-T165S-f	5` ATA ATA ATA GCG CGC AGC AGA AGG <u>TCT AGT</u> TAA AAA TCG TCA AGG TCA CTC TGA AAT GAC T 3`
MJM-E166S-f	5` ATA ATA ATA GCG CGC AGC AGA AGG <u>TCT AGT</u> TAA AAA TCG TCA AGG TCA CAC TTC TAT GAC TGT A 3`
MJM-E185D-f	5` G TTT TTC AGC ATA ACG TTT TGT TTC ATT TTT AGA CAT AGC ATT GCC ATC ATC GCC CAT <u>CAT</u> GTC ACA AAT TG 3`
MJM-E185Q-f	5` G TTT TTC AGC ATA ACG TTT TGT TTC ATT TTT AGA CAT AGC ATT GCC ATC ATC GCC CAT CAT TTG <u>ACA</u> TAT <u>GGT</u> GGT 3`
MJM-E185S-1	5` GTT TTT CAG CAT AAC GTT TTG TTT CAT TTT TAG ACA <u>TAG</u> <u>CAT</u> <u>TCC</u> CAT CAT CGC CCA TCA TTG AAC AAA TTG 3`
MJM-E185S-2	5` AAT AGT TAA TGA TCT CTT CAC CAG AGA GAT AAA TTA AAT TAT GTT TTT CAG CAT AAC GTT TTG TTT C 3`

Tab. 18: Primer zur Veränderung der Gensequenz der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthese aus *M. jannaschii*. Die Mutation ist fett unterlegt und die Erkennungssequenz der Detektionsschnittstelle ist unterstrichen.