

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Analyse der strukturellen Grundlagen
der Wechselwirkungen zwischen der
Phenylalaninhydroxylase und
ihrem natürlichen Kofaktor Tetrahydrobiopterin**

Dunja Reiß,
geb. Messing

aus

Münster, Deutschland

2018

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Frau Prof. Dr. med. Ania C. Muntau betreut und von Herrn Prof. Horst Domdey von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 25.7.2018

Dunja Reiss

.....

Dissertation eingereicht am: 26.01.2018

1. Gutachter Prof. Dr. Horst Domdey

2. Gutachterin Prof. Dr. Ania C. Muntau

Mündliche Prüfung am: 14.06.2018

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür,
daß dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe
erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden:
Die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck

*Für meinen Mann, meine Söhne, meine Eltern.
Fabian, Julius, Lukas, Ančica, Wilhelm, Ingrid, Herbert.*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS PHENYLALANINHYDROXYLASE SYSTEM	1
1.2	STRUKTURANALYSE DER PHENYLALANINHYDROXYLASE	3
1.3	DIE FUNKTION DER PAH - BINDUNG VON EISEN, SUBSTRAT UND KOFAKTOR.....	5
1.4	DER KATALYTISCHE MECHANISMUS	7
1.5	REGULATIONSMECHANISMEN.....	9
1.6	DIE PHENYLKETONURIE	11
1.7	PROTEINFALTUNGSERKRANKUNGEN UND NEUE THERAPIEANSÄTZE	14
1.8	BH ₄ – EIN PHARMAKOLOGISCHES CHAPERON	16
2	ZIELE DER ARBEIT	18
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	EINGESETZTE MATERIALIEN	20
3.1.1	Chemikalien.....	20
3.1.2	Organismen, Plasmide und Enzyme	21
3.1.3	Zellkulturmaterialien	22
3.1.4	Größenstandards und Kits.....	23
3.1.5	Antikörper	23
3.1.6	Nährmedien und Antibiotika	23
3.1.7	Verwendete Puffer	24
3.1.8	Sonstige Materialien	26
3.1.9	Laborgeräte und Chromatographiesäulen	26
3.1.10	Software.....	27
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	28
3.2.1	Methoden der <i>Gateway</i> [®] -Technologie.....	28
3.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion zur Generierung des <i>attB</i> -PCR Produkts.....	29
3.2.1.2	BP Rekombinationsreaktion zur Generierung des <i>PAH Entry Clones</i>	30
3.2.1.3	LR-Rekombinationsreaktion zur Generierung der <i>PAH</i> -Expressionskonstrukte	31
3.2.2	Ortsspezifische Mutagenese – <i>site directed mutagenesis</i> (SDM)	32
3.2.3	Sequenzierung.....	34
3.2.4	Analytischer Restriktionsenzymverdau von Plasmid-DNA	34
3.2.5	Kultivierung von <i>E. coli</i>	34
3.2.6	Konservierung von <i>E. coli</i>	35
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.2.8	Herstellung calciumkompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	35
3.2.9	Transformation calciumkompetenter <i>E. coli</i> Zellen	35

3.2.10	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
3.2.11	Photometrische Messung der DNA-Konzentration	36
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	36
3.3.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss	36
3.3.2	Reinigung der Enzyme aus <i>E. coli</i>	37
3.3.2.1	Affinitätschromatographie	37
3.3.2.2	Größenausschlusschromatographie	38
3.3.2.3	Abspaltung des MBP-Fusionspartners durch Faktor Xa oder TEV Protease	38
3.3.2.4	Rechromatographie zur Isolierung der funktionellen PAH-Tetramere	38
3.3.2.5	Kalibrierung der Gelfiltrationssäulen	39
3.3.3	Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine durch UV-Absorption	39
3.3.4	SDS-PAGE	40
3.3.5	Coomassie-Färbung der Gele nach SDS-PAGE	40
3.3.6	Native PAGE	41
3.3.7	Western Blot	41
3.3.8	Immundetektion	42
3.3.9	Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine nach Bradford	43
3.4	ZELLKULTUR	43
3.4.1	Transiente Expression in COS-7 Zellen	43
3.4.2	Zellernte und Lyse der transfizierten Zellen	43
3.5	AKTIVITÄT UND INHIBIERUNG	44
3.5.1	Aktivitätsassay	44
3.5.1.1	Aktivitätsassay nach prokaryoter Expression	44
3.5.1.2	Aktivitätsassay nach eukaryoter Expression	45
3.5.2	Activity Landscape	45
3.5.3	Inhibierungsassay	45
3.6	SPEKTROSKOPIE	46
3.6.1	Intrinsische Fluoreszenz	46
3.6.2	DSF-Assay	48
3.6.3	ANS-Fluoreszenz-Kinetiken	52
3.6.4	CD-Spektroskopie	54
3.6.5	DLS-Messungen	55
3.7	MST-MESSUNGEN	56
3.8	MOLECULAR MODELING	57
4	ERGEBNISSE	58
4.1	KLONIERUNG VON PAH-WILDTYP UND AUSGEWÄHLTEN PAH-VARIANTEN	58
4.2	BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DES PAH-WILDTYP	59
4.2.1	Der PAH-Wildtyp lässt sich als stabiles Tetramer aufreinigen	59

4.2.2	Die Enzymaktivität wird von Substrat- und Kofaktorkonzentration bestimmt	60
4.2.3	Das CD-Spektrum des Wildtyps weist auf α -helikale Sekundärstrukturelemente hin	62
4.2.4	Etablierung eines <i>DSF</i> -Assays zur Analyse der thermischen Stabilität	62
4.2.5	Durch DLS lässt sich der hydrodynamische Radius des Wildtyps analysieren	64
4.2.6	Tryptophanfluoreszenzspektren zeigen lokale Änderungen am N-Terminus der PAH	64
4.2.7	Kinetische und thermodynamische Analysen erlauben die Quantifizierung des Entfaltungsprozesses	65
4.3	BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DES PAH-WILDTYP IM KOMPLEX MIT BH_4 UND DEN BH_4 -DERIVATEN BH_2 , SEPIAPTERIN UND 6-MPH ₄	67
4.3.1	BH_4 und die BH_4 -Derivate unterscheiden sich in wichtigen strukturellen Details	67
4.3.2	Bindungsstudien zeigen unterschiedliche Wechselwirkungen der Liganden	68
4.3.3	Messung der Bindungskonstanten der PAH-Liganden mittels MST	71
4.3.4	Die Enzymaktivität des Wildtyps mit 6-MPH ₄ zeigt einen breiten Aktivitätsbereich	72
4.3.5	BH_2 und Sepiapterin inhibieren die Enzymaktivität des PAH-Wildtyps	73
4.3.6	BH_4 stabilisiert den PAH-Wildtyp gegenüber Hitzestress	75
4.3.7	Bindung der Liganden reduziert den hydrodynamischen Radius des PAH-Wildtyps	76
4.3.8	Tryptophanfluoreszenzspektren zeigen konformative Änderungen nach Bindung der Liganden auf	77
4.3.9	BH_4 , BH_2 und Sepiapterin erhöhen die Aktivierungsenergie des PAH-Wildtyps	78
4.4	BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DER PAH-VARIANTEN R68S, R261Q UND Y417H	81
4.4.1	Die drei PAH-Varianten lassen sich als stabile Tetramere aufreinigen	82
4.4.2	PAH-Varianten sind empfindlich gegenüber Hitzestress	83
4.4.3	Der hydrodynamische Radius von R261Q ist im Vergleich zum Wildtyp kleiner	84
4.4.4	Mutationsbedingte konformative Änderungen führen zu Präaktivierung von R68S	85
4.4.5	Die Aktivierungsenergien von Wildtyp und Varianten unterscheiden sich deutlich	86
4.5	BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DER VARIANTEN IM KOMPLEX MIT BH_4 UND DEN BH_4 -DERIVATEN BH_2 , SEPIAPTERIN UND 6-MPH ₄	88
4.5.1	Die Bindung von BH_4 stabilisiert alle Varianten gegenüber Hitzestress	89
4.5.2	Die Liganden haben unterschiedliche Einflüsse auf den hydrodynamischen Radius	91
4.5.3	Intrinsische Tryptophanfluoreszenzspektren zeigen lokale Effekte der Liganden	92
4.5.4	Die Bindung von BH_4 stabilisiert den nativen Grundzustand aller Varianten	94
4.6	DER EINFLUSS VON VIER NEUEN PHARMAKOLOGISCHEN CHAPERONEN AUF DEN WILDTYP	96
4.6.1	Drei der vier Liganden binden im aktiven Zentrum der PAH	98
4.6.2	Bindungs- und Inhibierungskonstanten für drei der vier Liganden	100
4.6.3	Etablierung eines neuen Hochdurchsatz- <i>DSF</i> -Assays	102
4.6.4	Biophysikalische Charakterisierung der vier Liganden	104
4.7	EINFLUSS VON 4,5-DIAMINOPYRIMIDIN AUF DEN PAH-WILDTYP	106
4.7.1	Für 4,5-Diaminopyrimidin können Bindungs- und Inhibierungskonstanten gemessen werden ...	107

4.7.2	Biophysikalische Charakterisierung von 4,5-Diaminopyrimidin	108
4.8	ANALYSE DES EFFEKTS ALLER NEUN LIGANDEN AUF EXPRESSION UND AKTIVITÄT DES PAH-WILDTYPS UND DER VARIANTE I65T IN ZELLKULTUR	109
4.9	HOCHDURCHSATZ- <i>SCREEN</i> ZUR IDENTIFIKATION NEUER PHARMAKOLOGISCHER CHAPERONE	111
4.9.1	Auswahl von geeigneten <i>PAH</i> -Mutationen für den <i>Screen</i>	113
4.9.2	Expression von Wildtyp und Varianten im Expressionsvektor pMAL-c2X DEST_TEV.....	113
4.9.3	Virtueller Screen zur Identifikation niedermolekularer Substanzen	114
4.9.4	DSF- <i>Screen</i>	115
4.9.4.1	Planung des DSF- <i>Screens</i>	115
4.9.4.2	Durchführung des DSF-Assays und Berechnung der Umschlagpunkte.....	116
4.9.4.3	Bioinformatische Analyse der DSF-Daten.....	117
4.9.5	Messung der Bindungskonstanten von 74 Kandidatensubstanzen	121
4.9.6	Ergebnis des <i>Screens</i> nach neuen pharmakologischen Chaperonen	122
5	DISKUSSION	124
6	ZUSAMMENFASSUNG	132
7	ABKÜRZUNGEN.....	134
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	137
9	TABELLENVERZEICHNIS	139
10	LITERATURVERZEICHNIS	140
11	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	147
12	DANKSAGUNG	149

1 Einleitung

1.1 Das Phenylalaninhydroxylase System

Die Phenylalaninhydroxylase (PAH, Phenylalanin 4-Monooxygenase, EC 1.14.16.1) ist ein zytosolisches Enzym, das überwiegend in der Leber und in geringen Mengen auch in der Niere exprimiert wird. Es katalysiert die para-Hydroxylierung der essentiellen Aminosäure L-Phenylalanin (L-Phe) zu L-Tyrosin (L-Tyr) in Gegenwart ihres natürlichen Kofaktors (6R)-2-Amino-6-[(1R,2S)-1,2-dihydroxypropyl]-5,6,7,8-tetrahydropteridin-4(1H)-on (Tetrahydrobiopterin, BH₄) und molekularem Sauerstoff als Ko-Substrat (Abbildung 1). Das Hydroxylierungsprodukt L-Tyrosin ist eine wichtige Vorstufe von Dopamin, den Katecholaminen Noradrenalin und Adrenalin sowie des Hautpigments Melanin. Die durch die PAH katalysierte enzymatische Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im L-Phenylalaninkatabolismus. Geschätzte 75 % des durch die Nahrung aufgenommenen sowie des durch Proteolyse freigesetzten L-Phenylalanins werden unter physiologischen Bedingungen durch die PAH verstoffwechselt (Scriver 2001). Während der Umsetzung von L-Phenylalanin zu L-Tyrosin wird der natürliche Kofaktor BH₄ zur quinoiden Form des 2-Amino-6-(1,2-dihydroxypropyl)-6,7-dihydro-1H-pteridin-4-on (q-BH₂) oxidiert und muss im Anschluss an die Reaktion durch das Zusammenspiel von Pterin-4a-Carbinolamin-Dehydratase (PCD) und Dihydropteridin-Reduktase (DHPR) zu seiner funktionellen Tetrahydroform regeneriert werden. Die PCD katalysiert dabei die Wasserabspaltung aus 4a-Hydroxy-Tetrahydrobiopterin (4-OH-BH₄) zur quinoiden Form von BH₂, welches anschließend durch das NADH/H⁺-abhängige Enzym DHPR zu BH₄ reduziert wird (Abbildung 1). Bei unzureichender DHPR-Aktivität erfolgt eine nicht-enzymatische Umlagerung von q-BH₂ zu 2-Amino-6-(1,2-dihydroxypropyl)-7,8-dihydro-1H-pteridin-4-on (Dihydrobiopterin, BH₂), das anschließend durch die Dihydrofolat-Reduktase zu BH₄ reduziert wird.

Die intrazelluläre BH₄-Konzentration wird neben der Regeneration aus q-BH₂ zusätzlich durch die *de novo* Synthese des Kofaktors aufrechterhalten. Die Biosynthese von BH₄ aus Guanosintriphosphat (GTP) in Hepatozyten erfolgt in drei Schritten und unterliegt einer strengen Regulation durch die intrazellulären L-Phenylalanin- und BH₄-Konzentrationen. Während nicht gebundenes L-Phenylalanin die *de novo* Synthese von BH₄ stimuliert, wirkt sich das Endprodukt BH₄ hemmend auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der durch die GTPCH katalysierten Reaktion aus (Abbildung 1). Der Begriff des Phenylalaninhydroxylase-Systems umfasst daher neben der PAH auch die BH₄ regenerierenden beziehungsweise synthetisierenden Enzyme. Genetisch bedingte Defekte in einem der enzymatischen Schritte dieses komplexen Systems sind Ursache der Hyperphenylalaninämie (HPA), einer heterogenen Gruppe angeborener Erkrankungen des Phenylalaninstoffwechsels. Kürzlich wurde eine weitere Ursache einer HPA durch Mutation in der Unterklasse C12 der 40-kDa-Hitzeschockproteine beschrieben (Anikster *et al.* 2017). Durch *whole exome sequencing* konnten in der Studie sechs Patienten identifiziert werden,

die biallelischen Mutationen auf dem Gen *DNAJC12* trugen, welches für das Hitzeschockprotein DnaJC12 kodiert. DnaJC12 interagiert sowohl mit der Phenylalanin-, als auch mit der Tyrosin- und Tryptophanhydroxylase. Das Vorliegen einer *DNAJC12* Mutation führte nachweislich zur Reduktion der Enzymaktivität der Phenylalaninhydroxylase. Zukünftig sollte daher bei unklarer Ursache einer diagnostizierten HPA auch eine Sequenzierung des *DNAJC12*-Gens in Betracht gezogen werden.

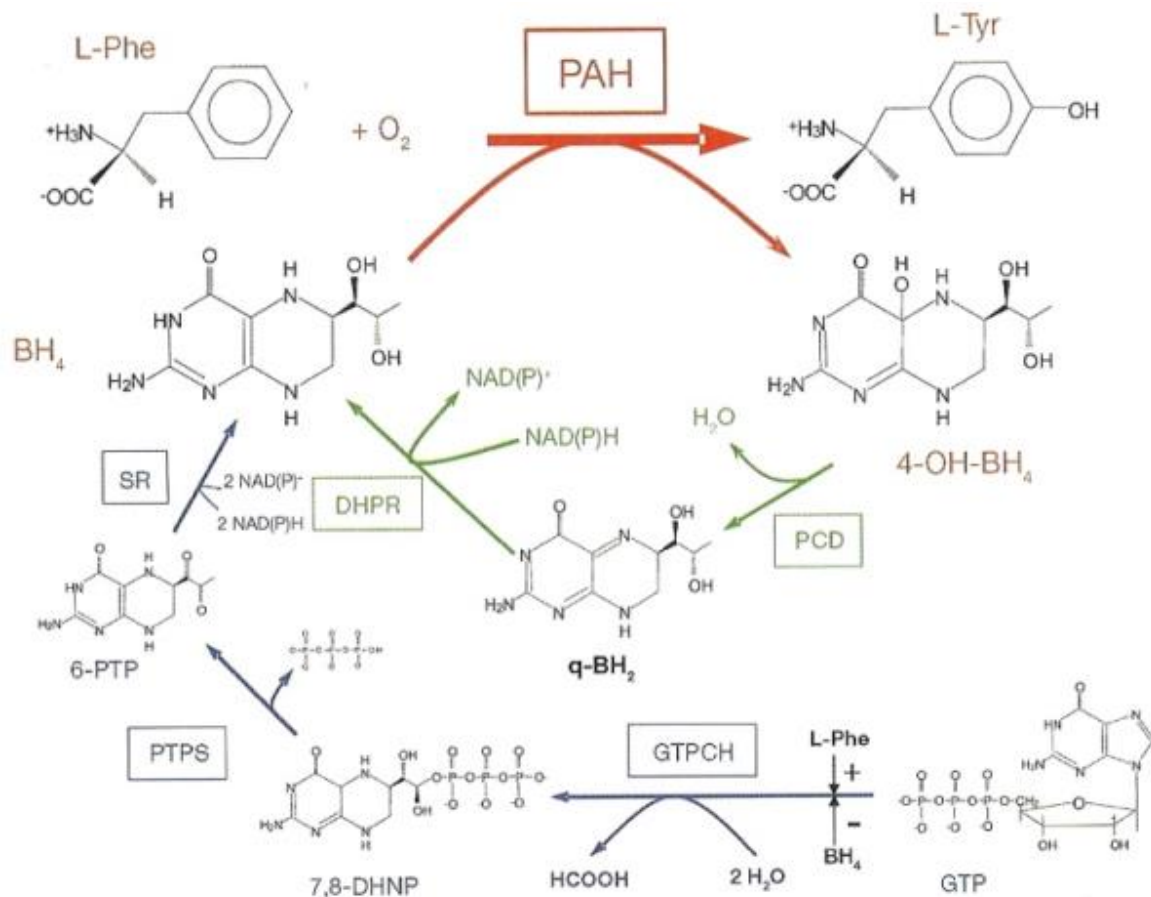


Abbildung 1. Das Phenylalaninhydroxylase System

Die Para-Hydroxylierung von L-Phenylalanin (L-Phe) zu L-Tyrosin (L-Tyr) wird durch die Phenylalaninhydroxylase (PAH) katalysiert. Der natürliche Kofaktor der PAH (6R)-L-erythro-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄) wird während der Reaktion über 4a-Hydroxy-Tetrahydrobiopterin (4-OH-BH₄) zur quinoiden Form des 6,7-Dihydrobiopterin (q-BH₂) oxidiert, katalysiert durch die Pterin-4a-Carbinolamin-Dehydratase (PCD). Die Reduktion von q-BH₂ zu BH₄ erfolgt durch die NADH/H⁺ abhängige Dihydropteridin-Reduktase (DHPR). Die *de novo* Synthese erfolgt aus Guanosinatriphosphat (GTP) über 7,8-Dihydroneopterin-Triphosphat (7,8-DHNP) und 6-Pyruvoyl-5,6,7,8-Tetrahydropterin (6-PTP). Katalysiert werden die Schritte durch die GTP Cyclohydrolase I (GTPCH), die 6-Pyruvoyl-5,6,7,8-Tetrahydropterin-Synthase (PTPS) sowie die Sepiapterin Reduktase (SR) (Pey 2006).

1.2 Strukturanalyse der Phenylalaninhydroxylase

Die humane PAH liegt im Zytosol der Zelle hauptsächlich als funktionelles Homotetramer, einem Dimer zweier Dimere vor (Abbildung 2), die asymmetrisch über das α -helikale Tetramerisierungsmotiv durch ein *coiled-coil* Strukturmotiv miteinander verbunden sind (Kaufman 1993). Homotetramere und Homodimere der PAH stehen miteinander im Fließgleichgewicht (Kappock *et al.* 1995), welches durch Zugabe von L-Phenylalanin in Richtung Tetramere verschoben wird (Martinez *et al.* 1995).

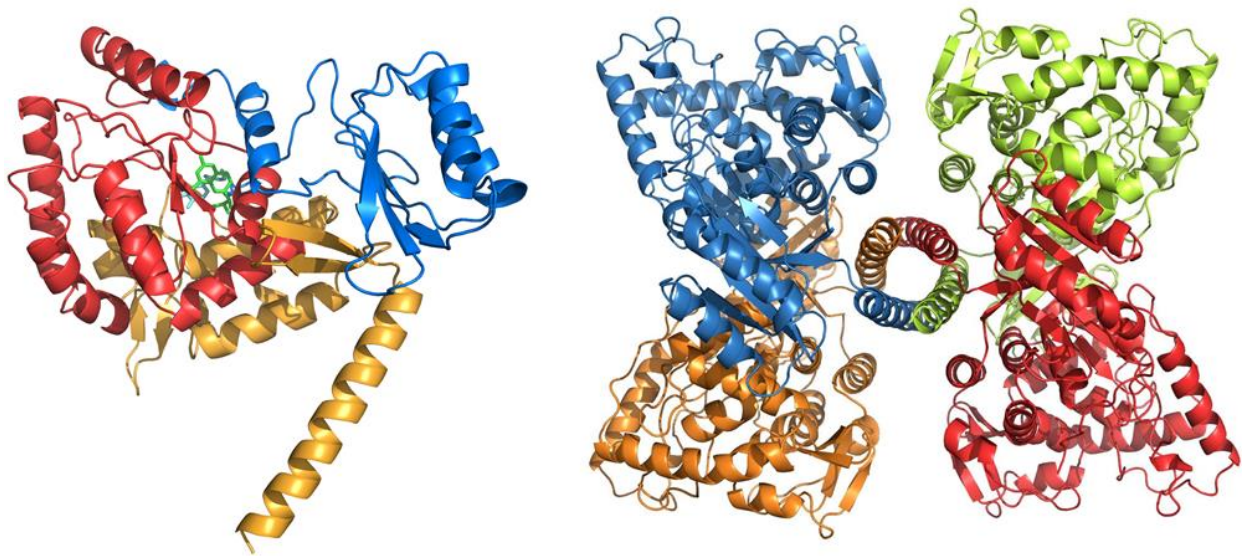


Abbildung 2. Struktur des PAH Monomers und des funktionellen Tetramers

Das PAH Monomer (linke Struktur) setzt sich aus drei Domänen zusammen. Einer N-terminalen regulatorischen Domäne (Aminosäuren 1-117, blau) einer katalytischen Domäne (Aminosäuren 118-410, rot) mit den Bindungsstellen für Eisen, L-Phenylalanin (türkis) und BH_4 (hellgrün) sowie einer C-terminalen Oligomerisierungsdomäne (Aminosäuren 411-452, ocker) (Arturo *et al.* 2016). Das funktionelle PAH Tetramer (rechte Struktur) ist aus vier PAH-Monomeren zusammengesetzt und stellt sich als Dimer zweier Dimere dar (blau/ocker sowie grün/rot).

Das PAH Monomer ist ein 52 kDa-Protein, das sich strukturell und funktionell in drei Domänen einteilen lässt. Eine N-terminale regulatorische Domäne (Aminosäuren 1-117), eine mittlere katalytische Domäne (Aminosäuren 118-410) und eine C-terminale Oligomerisierungsdomäne (Aminosäuren 411-452) (Arturo *et al.* 2016) (Abbildung 3). Charakteristisch für die regulatorische Domäne ist ein α - β Sandwichmotiv, bestehend aus einem viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt, welches auf einer Seite durch zwei kurze α -Helices und auf der anderen Seite durch die katalytische Domäne flankiert ist. Die regulatorische Domäne beinhaltet die intrinsische autoregulatorische Sequenz (IARS, Aminosäuren 1-32) sowie eine für viele metabolische Enzyme charakteristische ACT Domäne (Aminosäuren 33-117). Zudem wird S16 am N-Terminus der regulatorischen Domäne durch cAMP-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert. Die katalytische Domäne der PAH setzt sich aus 14 α -Helices und acht β -Strängen zusammen und beinhaltet das aktive Zentrum mit dem Eisenatom sowie den Bindungsstellen für L-Phenylalanin und BH_4 . Die C-terminale Oligomerisierungsdomäne besteht aus zwei antiparallelen β -Strängen und

einer 40 Å langen α -Helix, deren coiled-coil Motiv (Aminosäuren 428-452) für die Tetramerisierung unerlässlich ist (Erlandsen and Stevens 1999). Das aktive Zentrum beinhaltet das katalytische Eisenatom und besteht aus einer 13 Å tiefen und 10 Å weiten Höhle (Erlandsen *et al.* 1997), die durch einen schmalen Tunnel mit dem umgebenden Zytosol verbunden ist. Der Eingang zum aktiven Zentrum ist in der Struktur des PAH Apoenzym durch die autoregulatorische Sequenz verdeckt (Kobe *et al.* 1999). Teilstrukturen der PAH im Komplex mit L-Phenylalanin, Substratanaloga, Inhibitoren und Pterinkofaktoren wurden durch Röntgenstrukturanalyse, NMR-Spektroskopie und *molecular modeling* analysiert (Erlandsen *et al.* 1998, Teigen *et al.* 1999, Erlandsen *et al.* 2000, Andersen *et al.* 2002). Diese Strukturanalysen haben entscheidend dazu beigetragen, den Mechanismus der durch die PAH katalysierten Reaktion aufzuklären (Bassan *et al.* 2003, Fitzpatrick 2003, Solomon *et al.* 2003) und den regulatorischen Einfluss von Substrat, Kofaktor sowie Phosphorylierung auf die PAH zu verstehen (Miranda *et al.* 2002, Thorolfsson *et al.* 2002, Teigen and Martinez 2003, Pey *et al.* 2004b, Stokka *et al.* 2004). Die Strukturmodelle haben zwischen den einzelnen Untereinheiten und Domänen eine Vielzahl an Interaktionen aufgezeigt (Erlandsen *et al.* 1997, Fusetti *et al.* 1998, Kobe *et al.* 1999) und wurden auch dazu genutzt, den Effekt der Mutationen im *PAH*-Gen auf die Stabilität des Proteins sowie dessen katalytische und regulatorische Eigenschaften besser zu verstehen. Nach wie vor werden die strukturellen Aussagen bezüglich der humanen PAH auf der Basis eines zusammengesetzten Strukturmodells getroffen, da die Kristallisation des PAH-Volllänge-Proteins u.a. wegen der flexiblen N-terminalen regulatorischen Domäne trotz langjähriger Bemühungen von Forschergruppen weltweit nicht in ausreichender Auflösung gelungen war. Kürzlich wurde in einer Arbeitsgruppe in den USA die erste Kristallstruktur der nicht aktivierten PAH aus der Ratte in Volllänge mit einer Auflösung von 2,9 Å gelöst (Arturo *et al.* 2016). Es ist jedoch noch nicht gelungen, die Kristallstruktur der aktivierten PAH in Volllänge mit gebundenem L-Phenylalanin zu kristallisieren, was notwendig wäre, um die Genotyp-Phänotyp-Korrelation der Erkrankung noch besser zu verstehen.



Abbildung 3. Schema eines Phenylalaninhydroxylase-Monomers

Das PAH-Monomer setzt sich aus drei Domänen zusammen. N-terminal ist die regulatorische Domäne (RD, Aminosäuren 1-117) mit intrinsischer autoregulatorischer Sequenz (IARS) und der ACT-Domäne lokalisiert. Die roten Bereiche begrenzen die katalytische Domäne (KD, Aminosäuren 118-409) einschließlich des aktiven Zentrums (AZ). Der ockerfarbene Bereich stellt die Oligomerisierungsdomäne (OD, Aminosäuren 410-452) einschließlich Dimerisierungs- (DM) und Tetramerisierungsmotiv (TM) dar. Modifiziert nach Arturo *et al.* (Arturo *et al.* 2016).

1.3 Die Funktion der PAH - Bindung von Eisen, Substrat und Kofaktor

Die PAH ist ein eisenabhängiges Enzym, wobei das katalytische Eisenatom nicht an einen heterozyklischen Porphyrinring gebunden ist, wie es beispielsweise bei der Komplexverbindung Häm im Hämoglobin der Fall ist. Das Metall liegt im aktiven Zentrum der humanen PAH sechsfach koordiniert vor und bindet drei Moleküle Wasser sowie die Aminosäuren H286, H290 und E330, wobei die Ausrichtung der Liganden in oktaedrischer Symmetrie erfolgt (Erlandsen *et al.* 1997). Die drei das Eisenatom koordinierenden Aminosäurereste der PAH bilden ein 2-His-1-carboxyl *facial triad* Motiv aus (Abbildung 4), welches bereits kristallographisch in aktiven Zentren unterschiedlicher Enzymfamilien nachgewiesen wurde, in denen ein Nicht-Häm-Eisen (II) Atom zur Katalyse der Reaktion unerlässlich ist (Hegg and Que 1997, Costas *et al.* 2004). Dieses verbreitete Motiv aus drei Aminosäureresten arretiert das Eisenatom im aktiven Zentrum der jeweiligen Enzyme und ermöglicht es endogenen wie exogenen Liganden, an die zusätzlichen *cis*-orientierten Koordinationsstellen im Metall zu binden. Zudem erlaubt das Motiv durch die Bindung von bis zu maximal drei exogenen Liganden wie beispielsweise Sauerstoff, Substrat und Kofaktor eine höhere Flexibilität in seiner katalytischen Funktion. Diese Eigenschaft hebt es von Hämhaltigen Oxygenasen ab, die nur eine koordinative Position zur Bindung und Aktivierung von Sauerstoff aufweisen, wodurch das Substrat gezwungen ist, an einem benachbarten Aminosäurerest im aktiven Zentrum zu binden (Hegg and Que 1997).

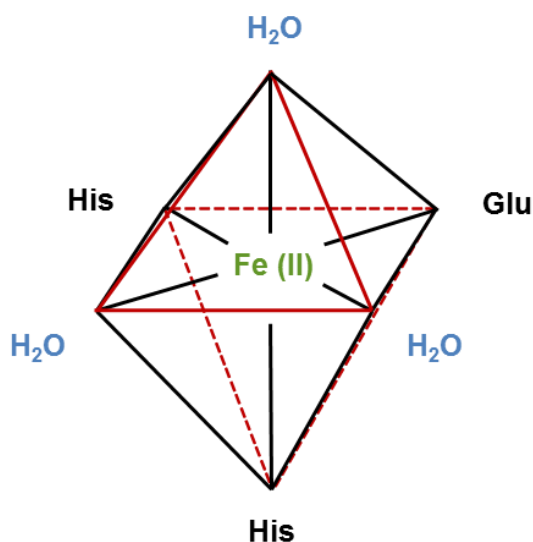


Abbildung 4. Schematische Darstellung des 2-His-1-carboxyl *facial triad* Motivs

Hierbei handelt es sich um ein gängiges Motiv in aktiven Zentren von Enzymfamilien, in denen ein Nicht-Häm-Eisen (II) Atom zur Katalyse der Reaktion unerlässlich ist und das von zwei Histidinresten und einer Carboxyl-Gruppe im aktiven Zentrum arretiert wird. Da sich jeweils drei Liganden als Fläche gegenüberstehen, ist eine faciale (von lat. *Facies* = Gesicht) Anordnung der Liganden gegeben.

Im PAH-Apoenzym sind die *cis*-orientierten Bindungsstellen durch drei Moleküle Wasser abgesättigt (Erlandsen *et al.* 1997) und das Metall reagiert in dieser Konfiguration nicht auf

molekularen Sauerstoff (Costas *et al.* 2004). Bei Vorliegen von Substrat und Kofaktor im aktiven Zentrum der PAH werden die drei Wassermoleküle aus der Koordinationssphäre des Metalls verdrängt, was die Bindung von molekularem Sauerstoff an das Eisenatom ermöglicht und es aktiviert. Das Vorliegen der beiden das Eisenatom koordinierenden Histidinliganden ist für die Hydroxylierung von L-Phenylalanin unerlässlich und konnte durch gezielte Mutagenese experimentell bestätigt werden (Gibbs *et al.* 1993).

Das Substrat L-Phenylalanin bindet im Vergleich zu BH_4 mit geringerer Affinität von 72-145 μM an die humane PAH (Thorolfsson *et al.* 2002, Stokka and Flatmark 2003). Die Bindung erfolgt über eine Salzbrücke mit R270, Wasserstoffbrücken mit Y277, T278 und S349 sowie Van der Waals-Wechselwirkungen mit W326 und F331 (Teigen *et al.* 1999, Andersen *et al.* 2002). Neben ihrer substratbindenden Rolle sind R270 und S349 in ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken und ionischen Wechselwirkungen mit anderen Aminosäureresten der PAH eingebunden, die wichtig für die vollständige Ausbildung des Tetramers sind. Wie erwartet zeigten daher Expressionsanalysen der varianten Proteine S349P, S349T und R270S eine starke Beeinträchtigung dieses Netzwerks, die zur Destabilisierung der Varianten im Vergleich zum Wildtyp führte (Scriver *et al.* 2003). Der Aminosäurerest Y277 ist für die katalytische Funktion der PAH von besonderer Bedeutung, denn die PKU-Variante Y277D kann zwar als Tetramer gereinigt werden, zeigt allerdings keine Enzymrestaktivität (Pey *et al.* 2003). W326 ist nicht nur für die L-Phenylalanin-Bindung zuständig, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Substratspezifität (McKinney *et al.* 2001, Daubner *et al.* 2002). Die Substratbindung induziert globale konformative Änderungen in der PAH wie beispielsweise die Neuorientierung der Aminosäurereste des Loops 131-155 sowie die Umlagerung der Y138-Hydroxylgruppe von der Oberfläche des Enzyms in eine partiell im aktiven Zentrum versteckte Position. Innerhalb des Tetramers werden die konformativen Änderungen, die zur Aktivierung des Enzyms führen, über *hinge-bending motions* kommuniziert (Andersen *et al.* 2002, Andersen *et al.* 2003, Stokka *et al.* 2004). Diese globale konformative Flexibilität ist Voraussetzung für die substratabhängige Aktivierung der PAH.

Die Bindung des natürlichen Kofaktors der PAH wird durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben und erfolgt nicht kooperativ, wobei die Affinität von BH_4 im Bereich von 8-10 μM liegt (Shiman 1985, Kaufman 1993, Knappskog *et al.* 1996). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich der Bindungsmechanismus ändert, sobald das Enzym durch L-Phenylalanin präaktiviert wird. Die BH_4 -Bindung wird kooperativ und folgt einer Hill-Kinetik (Gersting *et al.* 2010). Das Vorliegen eines reduzierten Pyrimidopyrazin-Ringsystems des Kofaktors ist für die durch die PAH katalysierte Reaktion unerlässlich. Neben BH_4 sind auch andere Kofektoranaloga wie z.B. 6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (6-MPH₄) und 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (DMPH₄) in der Lage, den natürlichen Kofaktor in der Hydroxylierungsreaktion zu ersetzen, allerdings binden sie mit geringerer Affinität an die PAH (Shiman 1985, Martinez *et al.* 1995). Auch BH_4 -Analoga mit 6-Alkoxyethylsubstituenten (Bigham *et al.* 1987) sowie Pyrimidinderivate (Bailey and Ayling 1978) konnten in der durch die PAH katalysierte Hydroxylierungsreaktion als geeignete Kofaktoren dienen.

1.4 Der katalytische Mechanismus

Die PAH gehört zur Familie der Hydroxylasen aromatischer Aminosäuren, die neben der PAH auch zwei weitere Schlüsselenzyme des Aminosäurestoffwechsels, die Tyrosinhydroxylase (TH) und die Tryptophanhydroxylase (TPH), umfasst (Abbildung 5), deren Stoffwechselprodukte im weiteren Verlauf zur Biosynthese von Katecholaminen und Serotonin von besonderer Bedeutung sind (Kappock and Caradonna 1996, Flatmark and Stevens 1999, Fitzpatrick 2000). Alle drei Enzyme sind Monooxygenasen, die den Einbau eines Sauerstoffatoms in den aromatischen Ring ihres Substrats katalysieren. Die drei humanen Aminosäurehydroxylasen zeigen strukturell und funktionell große Ähnlichkeiten. Die Sequenzhomologie ihrer katalytischen Domänen beträgt 80 % und alle drei benötigen ein Eisenatom und BH_4 als Kofaktor zur Katalyse der Hydroxylierungsreaktion.

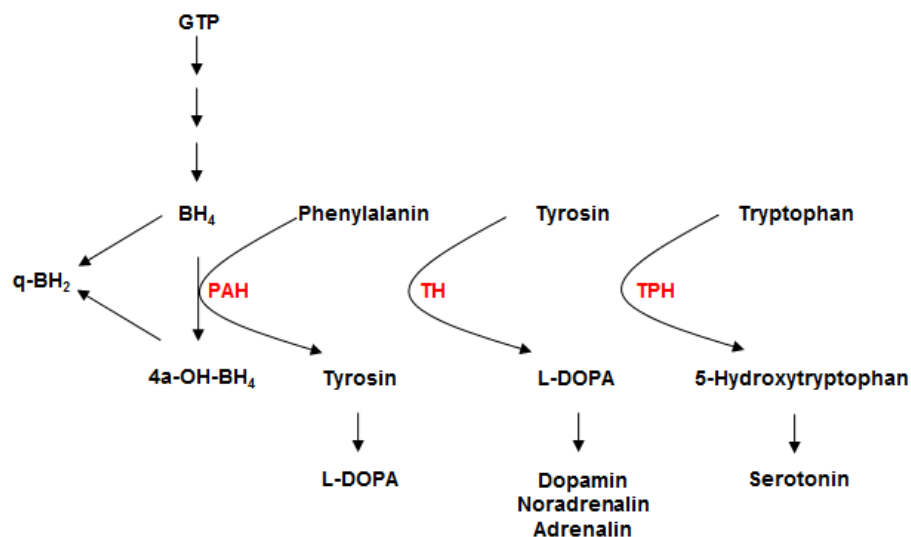


Abbildung 5. BH_4 -abhängige Aminosäurehydroxylasen

De novo Synthese von (6R)-L-erythro-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH_4) aus Guanosintriphosphat (GTP) und Regenerierung von 4a-Hydroxy-Tetrahydrobiopterin ($4a\text{-OH-BH}_4$) über die quinoide Form von 6,7-Dihydrobiopterin ($q\text{-BH}_2$) sowie Darstellung der durch BH_4 katalysierten Reaktionen der drei Hydroxylasen aromatischer Aminosäuren Phenylalaninhydroxylase (PAH), Tyrosinhydroxylase (TH) und Tryptophanhydroxylase (TPH) (Blau 2006).

Für die Reaktionen der Aminosäurehydroxylasen wird ein ähnlicher katalytischer Mechanismus postuliert, der noch nicht bis ins Detail verstanden ist (Fitzpatrick 2003). Noch herrscht beispielsweise Unklarheit darüber, in welcher Reihenfolge L-Phenylalanin, molekularer Sauerstoff und BH_4 während des katalytischen Zyklus an die PAH binden, um den quaternären Komplex ($\text{PAH}\cdot\text{L-Phe}\cdot\text{BH}_4\cdot\text{O}_2$) auszubilden. Mit CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Bindung von L-Phenylalanin und BH_4 notwendig ist, um die Koordinationssphäre des Eisenatoms im aktiven Zentrum zu verändern (Kemsley 1999). Die Bindung von Substrat und Kofaktor induziert die Freisetzung der drei das Eisenatom koordinierenden Wassermoleküle und führt zur Veränderung der elektronischen Struktur des Eisens, was die Bindung von molekularem Sauerstoff erlaubt (Costas *et al.* 2004). Es resultiert die Ausbildung des katalytisch aktiven quaternären Komplexes ($\text{PAH}\cdot\text{L-}$

Phe·BH₄·O₂) (Spezies A in Abbildung 6). Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurde ein Reaktionsmechanismus für die durch die PAH katalysierte Reaktion postuliert, der auf experimentellen Studien sowie quantenmechanischen Berechnungen basiert (Andersen *et al.* 2002, Bassan *et al.* 2003, Fitzpatrick 2003, Solomon *et al.* 2003, Costas *et al.* 2004). Der übereinstimmende Mechanismus für den katalytischen Zyklus ist in Abbildung 6 dargestellt. Sobald Spezies A ausgebildet wurde, greift molekularer Sauerstoff an der C4a-Position des Pterinrings an und bildet ein Eisen-peroxy-Pterin (Intermediat B). Dies führt zum Aufbrechen der Sauerstoffbindung und der Ausbildung des Pterin-4a-carbinolamins, welches als Zwischenprodukt im katalytischen Zyklus nachgewiesen werden kann. Gleichzeitig entsteht vermutlich ein bisher noch nicht nachgewiesener Fe^{IV} oxo-Komplex (Intermediat C), der in einem nächsten Schritt einen elektrophilen Angriff auf die C4-Position des aromatischen Phenylalaninrings ausführt (Intermediat D). Die Freisetzung des Reaktionsprodukts L-Tyrosin schließt den katalytischen Zyklus ab.

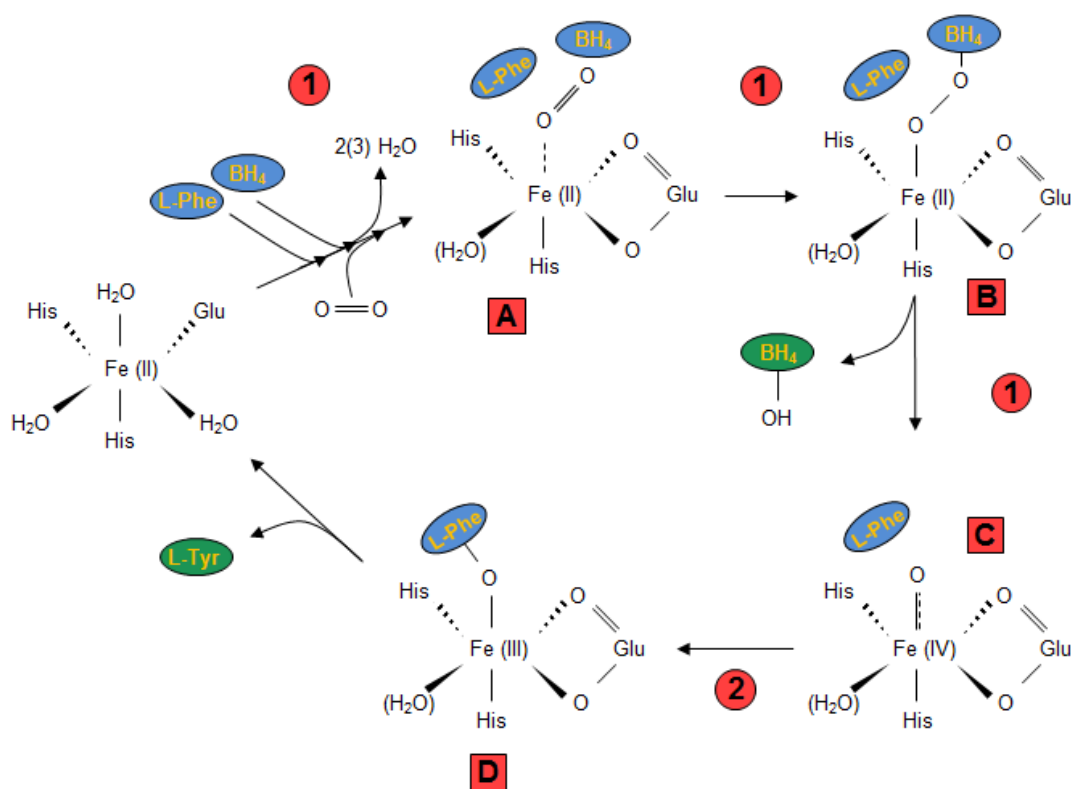


Abbildung 6. Schema für die durch die PAH katalysierte Reaktion

Vereinfachend lässt sich der Reaktionsmechanismus in zwei Schritte untergliedern 1.) Bindung des molekularen Sauerstoff an das Eisenatom unter Ausbildung des hydroxylierenden Intermediats (Fe^{IV}=O) und 2.) Übertragung des aktivierten Sauerstoffatoms auf L-Phenylalanin (Pey 2006).

Die Oxidation von BH₄ ist während der Reaktion mit L-Phenylalanin als Substrat eng an die Bildung von L-Tyrosin gekoppelt. Die Verwendung alternativer Substrate oder Kofaktoranaloga führt in der Regel zur Entkopplung von Kofaktor-Oxidation und L-Tyrosin-Synthese, nachgewiesen durch den Verbrauch von Elektronen pro Substrathydroxylierung (Kappock and Caradonna 1996). Die partielle Entkopplung der Reaktionen führt sowohl zur

Reduktion der spezifischen Enzymaktivität als auch zum vermehrten Auftreten von H_2O_2 , da die überschüssigen Elektronen nicht vollständig zur Produktbildung eingesetzt werden können (Kappock and Caradonna 1996, Kemsley *et al.* 2003).

1.5 Regulationsmechanismen

In Säugetieren ist die Leber das Organ mit der höchsten Aktivität der PAH (der PAH-Anteil an den Gesamtproteinen in der Leber beträgt 0,1–0,3 %) und verantwortlich für die L-Phenylalaninhomeostase (Kappock and Caradonna 1996), wobei die PAH in Hepatozyten zu 20 % phosphoryliert vorliegt (Doskeland *et al.* 1992). Auch in der humanen Niere konnte eine relativ hohe PAH-Aktivität gemessen werden, die 20 % (Ayling *et al.* 1975) bis 45 % (Lichter-Konecki *et al.* 1999) der PAH-Aktivität in der Leber erreicht. Zusätzlich liegen geringe Mengen an PAH mRNA, Protein oder Proteinaktivität im Hirn, im Pankreas und in Melanozyten vor (Schallreuter *et al.* 1994, Kappock and Caradonna 1996, Lichter-Konecki *et al.* 1999). Die PAH-Aktivität in Melanozyten ist wichtig, da die Hydroxylierungsreaktion das für die Melaninsynthese notwendige L-Tyrosin zu Verfügung stellt (Lichter-Konecki *et al.* 1999). Um die L-Phenylalaninhomeostase *in vivo* aufrecht zu erhalten, muss die PAH-Aktivität streng reguliert werden, denn in der Leber liegt ausreichend PAH-Aktivität vor, um die Plasmaphenylalaninkonzentration innerhalb von Minuten zu erschöpfen, sobald das Enzym über eine bestimmte Zeit aktiv ist (Kappock and Caradonna 1996). Eine besonders starke regulatorische Wirkung auf die PAH zeigen Substrat, Kofaktor und Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung an S16 (Scriver 2001). Die regulatorischen Effekte, die über das gesamte Enzym hinweg kommuniziert werden, können durch Änderungen in der Tertiär- und Quartärstruktur der PAH erklärt werden, da sie die Wechselwirkungen zwischen den Domänen einer Untereinheit, der beiden Untereinheiten im Dimer sowie der Dimere im Tetramer verändern (Kaufman 1993, Kappock and Caradonna 1996, Miranda *et al.* 2002, Teigen and Martinez 2003, Thorolfsson *et al.* 2003, Stokka *et al.* 2004). Beispielsweise induziert die Bindung von L-Phenylalanin im aktiven Zentrum der PAH die Umlagerung der IARS und löst eine Serie konformativer Änderungen aus, die zur weiteren Kommunikation des aktivierenden Prozesses zur angrenzenden Untereinheit im Dimer und schließlich durch den Kontakt über die Oligomerisierungsdomänen in das zweite Dimer führen (Thorolfsson *et al.* 2003). Die Präinkubation der rekombinant exprimierten und gereinigten humanen PAH mit L-Phenylalanin vor der eigentlichen Hydroxylierungsreaktion führt zur 3-5 fachen Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität (Martinez *et al.* 1995, Stokka *et al.* 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Bindung von L-Phenylalanin kooperativ ist und einer Hill-Kinetik folgt (Hill-Koeffizient, $h \sim 2$). Aktivierung und Kooperativität lassen sich auf konformative Änderungen im Enzym zurückführen, die durch Substratbindung ausgelöst werden und durch Änderungen der spektroskopischen Eigenschaften der PAH (Knappskog and Haavik 1995, Kappock and Caradonna 1996, Thorolfsson *et al.* 2003) sowie eine Zunahme des hydrodynamischen Radius (Kappock *et al.* 1995, Kleppe *et al.* 1999) nachgewiesen werden können.

Im Fokus der Diskussion um die Regulation der PAH durch das Substrat L-Phenylalanin lag seit Jahren die Anzahl der Substratbindestellen pro Enzymuntereinheit. Ging man bereits früh davon aus, dass die Aktivierung der PAH durch kooperative Bindung von L-Phenylalanin an einer regulatorischen Bindungsstelle außerhalb des katalytischen Zentrums erfolgt (Shiman 1980, Kaufman and Mason 1982, Gjetting *et al.* 2001), postulierte die Forschergruppe um Prof. Martinez das Vorhandensein von nur einer Substratbindestelle pro Enzymuntereinheit, die sich im katalytischen Zentrum der PAH befindet (Thorolfsson *et al.* 2002). Ist jedoch eine einzelne Bindungsstelle im aktiven Zentrum der PAH in der Lage, die beobachteten starken konformativen Umlagerungen auszulösen? Wahrscheinlicher ist das Vorliegen einer zweiten regulatorischen Substratbindestelle außerhalb des katalytischen Zentrums. Tatsächlich gelang es kürzlich, die Kristallstruktur der regulatorischen Domäne der humanen Phenylalaninhydroxylase im Komplex mit L-Phenylalanin in einer Auflösung von 1.8 Å zu lösen (Patel *et al.* 2016) und damit eine weitere allosterische Bindestelle für L-Phenylalanin außerhalb des aktiven Zentrums zu belegen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Bindung von L-Phenylalanin in der allosterischen Bindestelle die Dimerisierung zweier regulatorischen Domänen der PAH induziert (Patel *et al.* 2016), ein Vorgang der vermutlich zur weiteren Aktivierung des funktionellen Tetramers notwendig ist. Während L-Phenylalanin zur Aktivierung der PAH führt, wirkt BH₄ als allosterischer Inhibitor, der das Enzym in einem Zustand mit niedriger Aktivität arretiert und die durch Substratbindung ausgelösten konformativen Änderungen blockiert (Kaufman 1993). Die BH₄-Bindung überführt das Enzym in eine stabilere Konformation, die es besser gegen proteolytische Degradation durch α -Chymotrypsin (Iwaki *et al.* 1986) sowie vor Ubiquitinierung mit darauf folgendem Abbau durch das Proteasom und thermalem Stress schützt (Thorolfsson 2000). BH₄ induziert diesen ruhenden Zustand mit niedriger Enzymaktivität durch spezifische Wechselwirkungen zwischen der Dihydroxypropylseitenkette mit Aminosäuren in der regulatorischen und katalytischen Domäne der PAH. Die O1' und O2' Atome der Seitenkette bilden dabei eine Wasserstoffbrückenbindung zum Backbone-Carbonylsauerstoff von S251 und dem Hydroxylsauerstoff von S23 und erleichtern somit die konformativen Änderungen, die durch BH₄-Bindung ausgelöst werden (Teigen and Martinez 2003, Pey *et al.* 2004b). Auch die hohe Bindungsaffinität von BH₄ sowie die Inhibierung der Enzymaktivität durch das 6*R*-Enantiomer des Kofaktors (Bailey *et al.* 1991, Kappock and Caradonna 1996) sind durch diese Wechselwirkungen erklärbar. Die konformativen Änderungen in der N-terminalen Domäne führen in letzter Konsequenz zum Verschließen des Zugangs zum aktiven Zentrum durch die IARS (Teigen and Martinez 2003, Pey *et al.* 2004b). Obwohl der PAH-BH₄-Komplex einen ruhenden Zustand (Teigen and Martinez 2003) mit niedriger Enzymaktivität darstellt, kann das Enzym bei Anstieg der intra- oder extrazellulären L-Phenylalaninkonzentration schnell aktiviert werden (Mitnaul and Shiman 1995).

Die Phosphorylierung der PAH erfolgt an S16 in der regulatorischen Domäne und wird *in vitro* und *in vivo* durch cAMP und Ca²⁺/Calmodulin abhängige Proteinkinasen vermittelt (Kaufman 1993). Diese posttranslationale Modifikation führt zum Anstieg der Enzymaktivität sowie einer erhöhten Affinität gegenüber dem Substrat (Doskeland *et al.* 1996, Miranda *et al.*

2002). *In vitro* wird ein Anstieg der Phosphorylierungsrate in Gegenwart von L-Phenylalanin beobachtet, während die Anwesenheit des natürlichen Kofaktors zur Verringerung des prozentualen Anteils an phosphoryliertem Enzym führt (Kaufman 1993, Doskeland *et al.* 1996). Die Phosphorylierung *in vivo* wird durch verschiedene Mechanismen moduliert, wozu die L-Phenylalaninkonzentration im Plasma, sowie unterschiedliche Hormone wie z. B. Glucagon und Insulin gehören (Kaufman 1993, Guerin *et al.* 1998). Auf molekularer Ebene löst die Phosphorylierung an S16 eine Änderung unterschiedlicher elektrostatischer Wechselwirkungen in der Enzymstruktur aus, die sich sowohl innerhalb einer Untereinheit als auch zwischen den einzelnen Domänen abspielen und zur Reorganisation der regulatorischen Domäne führen (Miranda *et al.* 2002). Diese konformativen Änderungen induzieren einen verbesserten Zugang zum aktiven Zentrum der PAH, eine lokale Stabilisierung des Enzyms in der Umgebung von S16 und mit hoher Wahrscheinlichkeit beeinflussen sie auch die Reaktivität des katalytischen Eisenatoms (Miranda *et al.* 2002, Miranda *et al.* 2004).

1.6 Die Phenylketonurie

Der erste Hinweis auf die heute als Phenylketonurie (PKU; OMIM #261600) bekannte Stoffwechselerkrankung basierend auf einer Störung im L-Phenylalaninkatabolismus stammt aus dem Jahr 1934. Der norwegische Arzt Dr. Asbjørn Følling konnte damals bei Geschwistern mit mentaler Entwicklungsretardierung die vermehrte Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure (Phenylpyruvat) im Urin mittels Eisen(III)-chlorid nachweisen, welches durch das spezifische Ausscheidungsprodukt zu grünlichem Eisen(II) reduziert wurde (Folling 1934). Alles deutete bereits damals darauf hin, dass die Erkrankung auf einem autosomal rezessiven Erbgang beruht und schon kurze Zeit später erfolgte die Einordnung der PKU in das damals neue Feld der angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Erst 20 Jahre später konnte dann gezeigt werden, dass PKU-Patienten über eine unzureichende Aktivität der PAH in Leberzellen verfügen (Jervis 1953). Damit war der eigentliche krankheitsauslösende Defekt in der Hydroxylierungsreaktion der essentiellen Aminosäure L-Phenylalanin identifiziert. Die Symptome der unbehandelten PKU sind neben heller Haut und blondem Haar durch den sekundären Melaninmangel eine progressive Entwicklungsverzögerung, epileptische Anfälle, Autoaggression, Stereotypien, Hautekzeme und vor allem, ein hochgradiger progredienter Verlust der Intelligenz (Muntau 2000). Der nächste wichtige Schritt in der Geschichte der PKU war 1952 die Einführung einer L-phenylalaninarmen Diät durch den deutschen Kinderarzt Dr. Horst Bickel. Er konnte am Beispiel eines 17 Monate alten Mädchens mit PKU überraschenderweise zeigen, dass eine Reduktion der diätetischen L-Phenylalaninzufuhr zu einer deutlichen Verbesserung der schwerwiegenden neurologischen Symptomatik und der psychomotorischen Entwicklung führt (Bickel *et al.* 1953, Bickel *et al.* 1954). Hierbei handelte es sich um den ersten Nachweis einer erfolgreichen diätetischen Behandlung einer Erbkrankheit mit Beteiligung des Zentralnervensystems. Diese Erkenntnis war der entscheidende Anstoß zur Entwicklung

eines Laborschnelltests für Neugeborene zur frühzeitigen Diagnose der Phenylketonurie, die zehn Jahre später durch den amerikanischen Mikrobiologen Dr. Robert Guthrie umgesetzt wurde (Guthrie and Susi 1963). Es handelte sich dabei um einen bakteriellen Hemmtest, der den Nachweis einer erhöhten L-Phenylalaninkonzentration im Blut der Patienten ermöglicht und durch seine einfache Handhabung als Massenscreening-taugliches Verfahren eingesetzt werden konnte.

Die flächendeckende Untersuchung aller Neugeborenen in den ersten Lebenstagen und der frühzeitige Therapiebeginn ermöglicht diesen Patienten seit der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts eine nahezu altersentsprechende neurologische und intellektuelle Entwicklung und somit ein weitgehend normales Leben. In den 1980er Jahren wurde schließlich das Gen der humanen *PAH* identifiziert und die entsprechende cDNA kloniert (Woo *et al.* 1983). Dies ebnete den Weg zu weltweiten Mutationsanalysen des *PAH*-Gens und zur Entdeckung komplexer allelischer Heterogenität bei PKU-Patienten, die eine Dekade später im Aufbau einer der ersten online Mutations-Datenbanken mündete (Scriver *et al.* 2003). Die Entdeckung einer behandelbaren genetischen Erkrankung am Beispiel der PKU führte in den 1960er und 1970er Jahren zum Umdenken in der Medizin. Bisher galten genetische Erkrankungen als nicht therapierbar, die Behandlung von PKU-Patienten überzeugte jedoch vom Gegenteil und neue Therapieansätze für weitere genetische Erkrankungen wurden entwickelt.

Heute weiß man, dass die genetischen Grundlagen einer HPA bzw. PKU entweder Mutationen im *PAH*-Gen oder in Genen für Enzyme des BH_4 *de novo* pathways bzw. des Regenerationspathways aus BH_2 sind. Nur bei 2 % der Neugeborenen mit Hyperphenylalaninämie liegt ursächlich ein Defekt im BH_4 -Stoffwechsel zugrunde (atypische Phenylketonurie) (Thony *et al.* 2000, Scriver 2001). Bei 98 % der Patienten ist die L-Phenylalaninerhöhung eine Folge von Mutationen im *PAH*-Gen, die eine veränderte Aktivität der PAH zur Folge haben. Heute sind über 950 pathogene Mutationen im *PAH*-Gen bekannt (www.pahdb.mcgill.ca) und 80 % davon sind *missense* Mutationen, also Mutationen mit Austausch einer einzelnen Aminosäure oder kleine Deletionen/Insertionen. Zusätzlich wurden aber auch größere Deletionen oder Insertionen, Splicing Varianten, Stop-Mutationen und Intron-Mutationen identifiziert. Basierend auf der prätherapeutischen L-Phenylalaninkonzentration im Blut wurden bisher drei klinische Phänotypen der HPA unterschieden (Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselerkrankungen [APS]). i) die klassische Phenylketonurie ($> 1200 \mu\text{mol/l}$) ii) die milde Phenylketonurie ($600\text{-}1200 \mu\text{mol/l}$) sowie iii) die milde Hyperphenylalaninämie ($120\text{-}600 \mu\text{mol/l}$). Erweitert wurde die bestehende Klassifizierung dann um die Kategorie des BH_4 -responsiven Defekts der PAH. Dieser wurde erstmalig bei vier HPA Patienten ohne BH_4 -Mangel beschrieben, die auf die Gabe pharmakologischer Dosen des natürlichen Kofaktors BH_4 eine Reduktion der L-Phenylalaninkonzentration im Blut zeigten (Kure *et al.* 1999). Im Rahmen einer systematischen klinischen Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte dann gezeigt werden, dass die Gabe von BH_4 bei mehr als 80 % der Patienten mit milden Phänotypen zur Reduktion der L-Phenylalaninkonzentration im Blut, zu einer Normalisierung der PAH-Enzymaktivität *in vivo* und zu einer deutlichen Erhöhung der diätetischen L-

Phenylalanintoleranz der Patienten führt (Muntau *et al.* 2002). Die entscheidende Voraussetzung für das Ansprechen der Patienten auf eine BH₄-Therapie ist eine enzymatische PAH-Restaktivität (Kure *et al.* 1999, Spaapen and Rubio-Gozalbo 2003, Blau and Erlandsen 2004, Zurfluh *et al.* 2008, Dobrowolski *et al.* 2011). Folgerichtig konnte bisher bei keinem Patienten mit Nachweis von zwei Nullmutationen eine BH₄-Responsivität beobachtet werden (Erlandsen 2006). Die bisherige Einteilung in die unterschiedlichen Phänotypen einschließlich der anzuwendenden Therapieoptionen war zwar weit verbreitet, trotzdem existierten europaweit unterschiedlichste lokale und nationale Leitlinien. Um europaweit standardisierte Behandlungsrichtlinien für PKU-Patienten festzulegen, die sich v. a. an therapeutischen Kriterien zum Wohl der Patienten orientieren, haben kürzlich 19 Experten aus verschiedenen europäischen Ländern eine neue Leitlinien für die Diagnose und Therapie von PKU-Patienten erarbeitet (van Spronsen *et al.* 2017). Ab sofort entscheidet der Schwellenwert von 360 µmol/L L-Phenylalanin im Blut über das weitere Vorgehen. Liegt die L-Phenylalaninkonzentration von unbehandelten Patienten unter 360 µmol/L, ist keine Therapie erforderlich. Bei Werten über 360 µmol/L besteht Handlungsbedarf. Basiert der Grund für die erhöhten L-Phenylalaninwerte der Patienten auf einem Defekt im BH₄-Stoffwechsel, ist eine Therapie mit Sapropterindihydrochlorid - der synthetischen Form von BH₄ - möglich. Auch Patienten mit einem BH₄-responsiven Defekt der PAH profitieren von einer entsprechenden Kofaktorthherapie. Patienten mit L-Phenylalaninwerten über 360 µmol/L die nicht BH₄-responsiv sind, erhalten eine phenylalaninarme Diät.

Trotz umfassender Mutationsanalysen bei Neugeborenen ist es nach wie vor nicht möglich, auf Grundlage des Genotyps zuverlässig den resultierenden Phänotyp eines Patienten abzuleiten. Zwar sind *missense* Mutationen krankheitsverursachend, die phänotypische Erscheinungsform ist jedoch sehr vielschichtig. Es existiert beispielsweise keine enge Korrelation zwischen IQ und *PAH*-Genotyp bei unbehandelten PKU-Patienten (Ramus *et al.* 1993), denn metabolische Phänotypen und *PAH*-Genotypen zeigen in einer signifikanten Anzahl an Patienten deutlich unterschiedliche Ausprägungen (Kayaalp *et al.* 1997, Guldborg *et al.* 1998). Ein Parameter, der zudem die phänotypische Ausprägung beeinflusst, ist die Transaminierung von L-Phenylalanin. Ein weiterer ist der Transport von L-Phenylalanin über die Blut-Hirn Schranke, der den Transport anderer essentieller Aminosäuren in das Zentralnervensystem behindert. Die resultierenden PKU-Phänotypen sind somit das Ergebnis eines Zusammenspiels mehrerer Faktoren, die die Auswirkungen des Genotyps beeinflussen (Scriver and Waters 1999).

Heute ist die Phenylketonurie als Prototyp einer therapierbaren genetischen Erkrankung anzusehen (Muntau and Gersting 2010). Sie ist mit einer Inzidenz von 1:5.062 (Nennstiel-Ratzel *et al.* 2010) die häufigste Aminosäure-Stoffwechselstörung in Populationen mit europäischen Wurzeln (Zschocke 2003). Im Rahmen erweiterter Neugeborenen-Screeningprogramme erfolgt die Untersuchung inzwischen vermehrt unter Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie. Auch für Patienten mit schweren, nicht BH₄-responsiven Erkrankungsformen werden derzeit alternative Therapiestrategien entwickelt. Hierzu gehört beispielsweise die Enzymsubstitution mit PEGylierter Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) (MacDonald and D'Cunha 2007, Sarkissian *et al.* 2008, Sarkissian *et al.* 2011), die L-

Phenylalanin unter Freisetzung von Ammoniak zu Zimtsäure verstoffwechselt. In Phase 1 bis 3 Studien konnte inzwischen gezeigt werden, dass die subkutane Injektion von PEG-PAL die L-Phenylalaninkonzentration in PKU-Patienten signifikant reduziert (Longo *et al.* 2014). Weitere Therapieansätze sind gentherapeutische Strategien (Ding *et al.* 2006, Thony 2010, Yagi *et al.* 2011), auch unter Einsatz der CRISPR/Cas9-Technologie (Pan *et al.* 2016), sowie die Verwendung von großen, neutralen Aminosäuren, die mit L-Phenylalanin um die Überwindung der Blut-Hirn Schranke und damit den Transport in das Zentralnervensystem konkurrieren (Pietz *et al.* 1999, Matalon *et al.* 2007). Hierzu erschien kürzlich eine vielversprechende Studie am PKU-Mausmodell (Pah ENU2), die den Einsatz von großen, neutralen Aminosäuren als Alternative zu L-phenylalaninarmen Diät postuliert, um die neurokognitiven Folgen in PKU-Patienten zu verbessern (van Vliet *et al.* 2016). Die Forschung zur Entwicklung neuer Therapieansätze für PKU-Patienten ist somit nach wie vor hoch aktuell.

1.7 Proteinfaltungserkrankungen und neue Therapieansätze

In den vergangenen zehn Jahren kristallisierte sich immer mehr heraus, dass Proteinfehlfaltung auf Basis von *missense* Mutationen und die darauf folgende Degradation des fehlgefalteten Proteins durch das Proteasom oder Lysosom der grundlegende molekulare Mechanismus bei einer stetig steigenden Anzahl an angeborenen Stoffwechselerkrankungen ist (Ulloa-Aguirre *et al.* 2004, Gregersen 2006, Gersting *et al.* 2008, Mu *et al.* 2008, Parenti *et al.* 2013). Die Phenylketonurie gilt hierbei inzwischen als Prototyp einer Fehlfaltungserkrankung eines zytosolischen Proteins. Vor allem große Proteine mit komplexen Strukturen, wie es auch bei der PAH der Fall ist, sind anfällig für Fehlfaltung, denn sie tendieren dazu, während des Faltungsprozesses hydrophobe Gruppen an der Proteinoberfläche zu exponieren, die mit anderen hydrophoben Gruppen interagieren und daraufhin aggregieren (Kim *et al.* 2013). Zudem erfolgt die Proteinfaltung nicht in einem Schritt, sondern durchschreitet unterschiedlichste konformelle Intermediate innerhalb eines *folding energy landscapes* auf dem Weg zur nativen Konformation (Kim *et al.* 2013) (Abbildung 7), was jede naszierende Polypeptidkette vor eine große Herausforderung stellt, auch wenn die Information der richtigen Faltung bereits in der Aminosäuresequenz hinterlegt ist (Anfinsen 1973).

Um Proteinfehlfaltung und Aggregation in der Zelle zu verhindern, existiert daher eine Vielzahl unterschiedlicher molekularer Chaperone, die in die Regulierung des Faltungsmechanismus involviert sind, die *de novo* Faltung unterstützen, das Protein in seiner nativen Konformation stabilisieren oder die Degradation fehlgefalteter Proteine regulieren. Das immer tiefere Verständnis der Proteostase (Balch *et al.* 2008) sowie der Proteinqualitätskontrolle innerhalb der Zelle, der auch die Proteinsynthese unterliegt, erlaubt aber inzwischen zunehmend die Entwicklung neuer Therapieansätze basierend auf dem Einsatz von *small molecular weight (SMW) compounds* (<500 Da) die als pharmakologische Chaperone in der Zelle tätig werden. Sie sind in der Lage, die Proteinfehlfaltung zu

korrigieren und können aufgrund ihrer Wirkungsweisen in die drei unterschiedlichen Kategorien von chemischen und pharmakologischen Chaperonen sowie Regulatoren der Proteostase eingeteilt werden (Muntau *et al.* 2014).

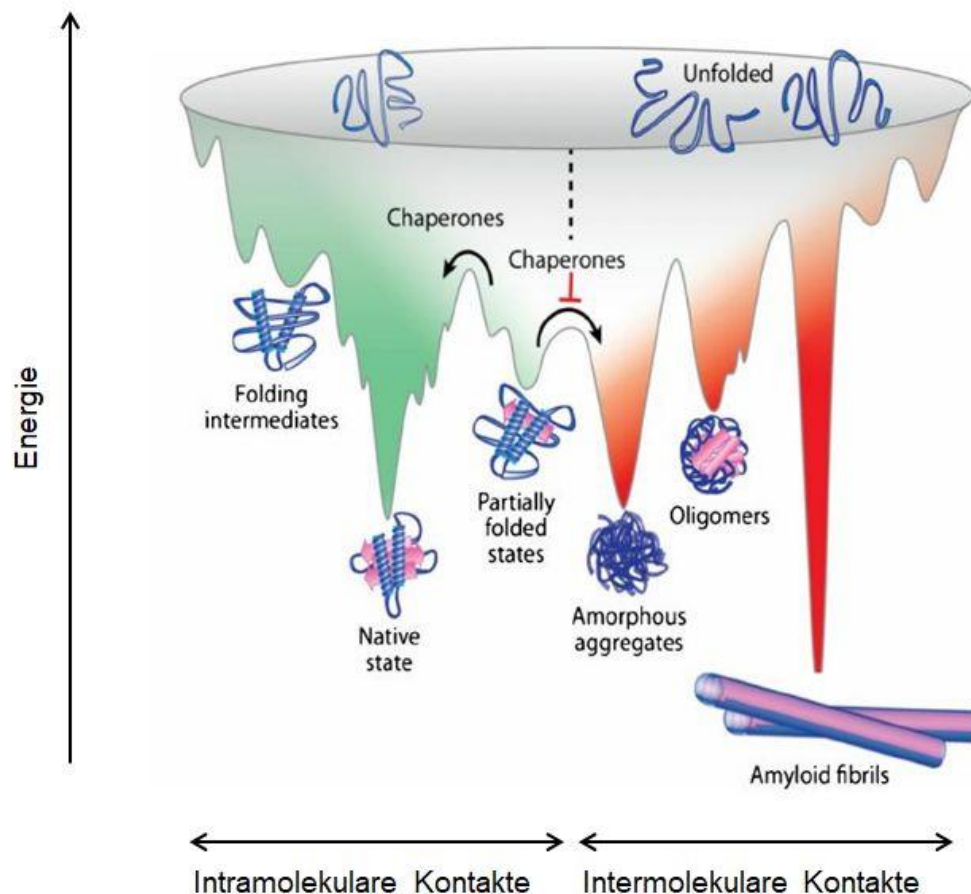


Abbildung 7. Energiediagramm für Proteinfaltung und Fehlfaltung

Während der Faltung einer naszierenden Polypeptidkette in die richtige native Konformation sind Faltung und Aggregation konkurrierende Prozesse. Hierbei sind energetisch begünstigte intramolekulare Wechselwirkungen (grün) assoziiert mit einem Anstieg der konformellen Stabilität. Dies führt gleichzeitig zur Absenkung der Gesamtenergie des Systems hin zur nativen Konformation. Während dieses Prozesses können Proteine energetisch begünstigte, jedoch nicht native Konformationen annehmen, die zu Populationen von kinetisch gefangenen Zuständen führen die in sog. *low-energy-wells* lokalisiert sind. Zudem sind diese Zustände anfällig für die Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen (rot), die zu Proteinaggregation führen können. Chaperone helfen dabei, die Grenzen der freien Energie zu überwinden, unterbinden intermolekulare Wechselwirkungen und begünstigen dadurch die Faltung des Proteins in die native Konformation (Kim *et al.* 2013).

Zu chemischen Chaperonen gehören beispielsweise Polyole wie Glycerol, Aminosäuren, Methylamine oder auch Dimethylsulfoxid und 4-Phenylbutyrat. Man geht davon aus, dass chemische Chaperone die Hydrathülle des Proteins verändern, wodurch die Beweglichkeit einzelner Proteindomänen eingeschränkt und das Protein in seiner Gesamtheit stabilisiert wird (Leandro and Gomes 2008, Rajan *et al.* 2011). Chemische Chaperone wirken somit im Unterschied zu pharmakologischen Chaperonen unspezifisch auf die Proteinkonformation, indem sie die Kompaktheit des Zielproteins erhöhen, ohne dabei direkt an das Target zu

binden. Trotzdem ist der Einsatz chemischer Chaperone in der Medizin schwierig, denn die Konzentrationen, die für eine Behandlung notwendig wären, sind u. U. toxisch oder zeigen schädliche *off target* Effekte. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist notwendig.

Pharmakologische Chaperone binden spezifisch und reversibel an fehlgefaltete Proteine und verhindern durch konformelle Stabilisierung den Funktionsverlust des entsprechenden Enzyms durch Degradation (Bernier *et al.* 2004) und erhöhen somit den Anteil an funktionellem Protein in der Zelle (Leandro and Gomes 2008, Powers *et al.* 2009, Muntau and Gersting 2010). Effektive pharmakologische Chaperone - einschließlich BH₄ – sind in der Regel Liganden des aktiven Zentrums (Fan 2003, Fan and Ishii 2007, Tropak *et al.* 2007, Shanmuganathan and Britz-McKibbin 2011) und wirken oft auch als milde Inhibitoren der Enzyme (Fan *et al.* 1999), welche sie stabilisieren (Pey *et al.* 2008, Santos-Sierra *et al.* 2012). Daher ist der durch pharmakologische Chaperontherapie korrigierte biochemische Phänotyp meist ein Kompromiss aus verbesserter Enzymstabilität und reduzierter Aktivität. Die Voraussetzung für die Wirkung pharmakologischer Chaperone ist das Vorliegen von Enzymrestaktivität (Fan 2008). Zudem sollten sie eine hohe Affinität zu ihrem Zielprotein aufweisen, damit ihre Verwendung in niedrigen Konzentrationen erfolgen kann. Heute sind bereits drei pharmakologische Chaperone als Therapeutikum zugelassen; i) Seit 2008 europaweit Sapropterindihydrochlorid zur Behandlung von Hyperphenylalaninämien ii) Seit 2011 europaweit Tafamidis zur Therapie von familiärer Amyloid-Polyneuropathie vom Transthyretin-Typ (TTR-FAP) iii) seit Mai 2016 europaweit Migalastat zur Therapie der lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Fabry (Germain *et al.* 2016).

Bei der letzten zu erwähnenden Klasse der *SMW compounds* handelt es sich um Regulatoren der Proteostase. Dies sind Substanzen, die die Proteinfaltung unterstützen und den Abbau fehlgefalteter Proteinspezies verstärken, indem sie Funktion und Verfügbarkeit von molekularen Chaperonen erhöhen und/oder die Proteinqualitätskontrolle aktivieren (Balch *et al.* 2008, Mu *et al.* 2008).

1.8 BH₄ – ein pharmakologisches Chaperon

Bis vor fünfzehn Jahren wurden alle PKU-Patienten mit einer sehr belastenden, L-phenylalaninarmen Diät therapiert, die mit unerwünschten Begleiterscheinungen wie Fehlernährung und psychosozialen Komplikationen assoziiert ist (Smith and Knowles 2000, Enns *et al.* 2010). Erst die Entdeckung der BH₄-Responsivität bei Patienten mit mildereren Formen der PAH-Defizienz um die Jahrtausendwende (Kure *et al.* 1999, Muntau *et al.* 2002) führte zum Paradigmenwechsel auf dem Gebiet der behandelbaren, angeborenen Stoffwechselstörungen. Plötzlich schien die Behandlung genetischer Erkrankungen im Rahmen einer pharmakologischen Kofaktorthherapie in greifbare Nähe zu rücken. Nach erfolgreichem Abschluss klinischer Studien zur Überprüfung der Wirksamkeit und Sicherheit von BH₄ (Levy *et al.* 2007, Lee *et al.* 2008, Trefz *et al.* 2009) wurde Sapropterindihydrochlorid 2007 in den USA (FDA) und 2008 in Europa (EMA) als *orphan drug* zugelassen. Zum Zeitpunkt der Zulassung des neuen Medikaments Kuvan[®] war der

Wirkmechanismus jedoch unklar. Eine naheliegende Hypothese war, dass die beim Patienten nachgewiesene Wirkung von BH_4 auf der Kompensation einer reduzierten Bindungsaffinität der varianten Proteine gegenüber dem Kofaktor beruht (Kure *et al.* 1999). Erste experimentelle Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen wiesen jedoch in eine andere Richtung. Es konnte gezeigt werden, dass *PAH*-Mutationen zu gestörter Oligomerisierung des funktionellen Enzyms mit erhöhter Neigung zu Aggregation (Eiken *et al.* 1996, Bjorgo *et al.* 1998, Waters *et al.* 1998, Pey *et al.* 2003), sowie zu vermehrter Proteindegradation führten (Waters *et al.* 1998, Waters *et al.* 2000, Pey *et al.* 2004a) und die Ausbildung des stabilen PAH-BH_4 Komplexes einen gleichzeitigen Schutz vor Degradation der *PAH* durch das Proteasom bot (Doskeland and Flatmark 1996). Daraus entstand die Hypothese, dass Mutationen im *PAH*-Gen zu einer Störung der Proteinfaltung mit Funktionsverlust der *PAH* durch vermehrte Degradation führen und dass BH_4 die Proteinefehlfaltung korrigiert. Damit wäre BH_4 als pharmakologisches Chaperon zu klassifizieren.

2 Ziele der Arbeit

Die pharmazeutische Produktentwicklung von Sapropterindihydrochlorid zur Therapie von Patienten mit Phenylketonurie durch Funktionsverlust der PAH verlief ungewöhnlich. Zwar handelte es sich bei dem im Rahmen klinischer Studien verabreichten Wirkstoff um den körpereigenen natürlichen Kofaktor der PAH, dennoch war erstaunlich, dass die molekularen Mechanismen, die der BH_4 -Sensitivität zugrunde liegen, zum Zeitpunkt der Zulassung des Präparates Kuvan[®] durch die FDA und die EMA nicht bekannt waren. Die Grundlagenforschung auf diesem Gebiet war daher das zentrale Thema der hier vorliegenden Promotionsarbeit.

Im Rahmen der Dissertation sollte nach erfolgreicher rekombinanter Expression und Reinigung des PAH-Wildtyps aus *E. coli* zunächst die biophysikalische Charakterisierung des Enzyms erfolgen. Hierfür war die Etablierung der entsprechenden Assays zur Analyse des Circular dichroismus, der thermischen Stabilität (*Differential Scanning Fluorimetry* (DSF)-Assay) und Hydrophobizität, der dynamischen Lichtstreuung (DLS) und der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz erforderlich. Darüber hinaus sollten Erkenntnisse zur Aktivierungsenergie sowie über thermodynamische Parameter der Proteindenaturierung des PAH-Wildtyps gewonnen werden, wofür die Etablierung von Entfaltungskinetiken erforderlich war. In einem nächsten Schritt sollte das Verhalten des PAH-Wildtyps im Komplex mit BH_4 und den drei Kofaktoranaloga BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄ analysiert werden, die sich spezifisch entweder am Ring oder in der Seitenkette von BH_4 unterscheiden. Ziel war es, die Struktur-Funktionsbeziehung von BH_4 zu untersuchen und eine Aussage darüber zu treffen, welches strukturelle Element des BH_4 -Moleküls – das kondensierte Pyrimidopyrazin-Ringsystem oder die 1,2-Dihydroxypropylseitenkette – den mit einer Inhibierung einhergehenden stabilisierenden Einfluss auf die PAH ausübt. Die zusätzliche Charakterisierung der Bindungseigenschaften der vier Liganden erforderte die Etablierung eines auf der Mikroskalierten Thermophorese (MST) basierenden Bindungsassays. Zur im nächsten Schritt erfolgenden Untersuchung der molekularen Auswirkungen von Mutationen im PAH-Gen auf Struktur und Funktion des rekombinanten PAH-Proteins war geplant, die drei PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H aus *E. coli* zu reinigen und mit den bereits etablierten Assays ohne und mit Zugabe von BH_4 und den drei Derivaten vergleichend zum PAH-Wildtyp zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte der Effekt des pharmakologischen Chaperons BH_4 mit vier in der Literatur beschriebenen potentiellen Wirkstoffkandidaten sowie 4,5-Diaminopyrimidin – einer von unserer Arbeitsgruppe vorgeschlagenen Substanz – auf den PAH-Wildtyp verglichen werden. Hierfür und auch für die weiteren noch geplanten Versuche zur Identifikation von Liganden mit einem stabilisierenden Effekt auf die PAH sollte die Etablierung des DSF-Assays an einem Gerät für *Real-Time*-quantitative PCR erfolgen. Nach umfassender *in vitro* Analyse des Einflusses von insgesamt neun Liganden auf den PAH-Wildtyp sowie drei ausgewählten Varianten sollte in einem nächsten Schritt die Etablierung der Proteinexpression des PAH-Wildtyps und der PAH-Variante I65T *in vivo* im Expressionssystem von COS-7 Zellen erfolgen. Geplant war hierbei, den Einfluss der neun Liganden auf die Restproteinmenge sowie die Enzymrestaktivität von Wildtyp und I65T zu

analysieren. Abschließend sollten unabhängig von den bisherigen Ergebnissen in einem breit angelegten *in vitro* und *in vivo* Hochdurchsatz-Screen neue, vielversprechende Wirkstoffkandidaten für die PAH identifiziert und validiert werden.

Alle Teilergebnisse der Promotionsarbeit sollten in ihrer Gesamtheit dazu beitragen, die molekularen Auswirkungen von Mutationen im *PAH*-Gen auf Struktur und Funktion des rekombinanten PAH-Proteins besser zu verstehen und zur Aufklärung des Wirkmechanismus von BH₄ beizutragen, um das zu Grunde liegende biologische Prinzip langfristig auch auf andere Proteinfaltungserkrankungen zu übertragen.

3 Material und Methoden

Bis auf die MST-Messungen zur Bestimmung von Bindungseigenschaften zwischen einzelnen Molekülen - die in Kooperation mit der Firma NanoTemper Technologies GmbH durchgeführt wurden - erfolgten alle experimentellen Arbeiten der Dissertation im Kubus-Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

3.1 Eingesetzte Materialien

3.1.1 Chemikalien

Name	Herkunft
3-Amino-2-benzyl-7-nitro-4-(2-quinolyl)-1,2-dihydroisoquinolin-1-on	MolPort, (LVA)
4,5-Diaminopyrimidin	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
5-Benzylhydantoin	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
5,6-Dimethyl-3-(4-methyl-2-pyridinyl)-2-thioxo-2,3-dihydrothieno[2,3-d]-pyrimidin-4(1H)-on	MolPort, (LVA)
6-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
6-Amino-5-benzylaminouracil	Iris-Biotech (D)
6-Methyltetrahydropterin (6-MPH ₄)	Schircks Laboratories (CH)
8-Anilino-1-naphtalensulfonsäure (ANS)	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen (D)
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche (D)
<i>Coomassie Brilliant Blue</i>	SERVA Electrophoresis GmbH (D)
Dihydrobiopterin (BH ₂)	Schircks Laboratories (CH)
Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Eisenammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Ethanol in aqua dest.	Apotheke der Universität München (D)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (D)
Flüssiger Stickstoff	Linde AG (D)
<i>Gel Loading Solution</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Glycerin ROTIPURAN® ≥99,5 %, p.a.,	Carl Roth GmbH (D)
<i>Yeast extract</i> SERVABACTER 24540	SERVA Electrophoresis GmbH (D)
Isopropanol	Apotheke der Universität München (D)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Scientific Inc. (USA)
Kaliumchlorid	Merck (D)
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (D)
Magnesiumchlorid	Merck (D)
Magnesiumsulfat	Merck (D)

Milchpulver <i>Blotting-Grade</i>	Carl Roth GmbH (D)
<i>NativePAGE™ Cathode Buffer Additive (20X)</i>	ThermoFisher Scientific (D)
<i>NativePAGE™ Running Buffer (20X)</i>	ThermoFisher Scientific (D)
Natriumchlorid	Merck (D)
NT™-647 NHS Fluoreszenzmarker	NanoTemper Technologies GmbH (D)
<i>NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)</i>	ThermoFisher Scientific (D)
<i>NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)</i>	ThermoFisher Scientific (D)
<i>Pierce™ ECL Western Blotting Substrate</i>	ThermoFisher Scientific (D)
Ponceau S	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Salzsäure	Merck (D)
Sepiapterin	Schircks Laboratories (CH)
<i>SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	ThermoFisher Scientific (D)
<i>SYPRO® Orange</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
TBE Puffer (10x)	Serva (D)
TE Puffer	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)
Tetrahydrobiopterin (BH ₄)	Schircks Laboratories (CH)
Trypton LP0042	Oxoid, ThermoFisher Scientific (D)
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)

Tabelle 1. Verwendete Chemikalien

3.1.2 Organismen, Plasmide und Enzyme

Organismen

Bakterienstämme	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA</i> -argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> -	ThermoFisher Scientific (D)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B F ⁻ dcm ompT <i>hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) galλ(DE3)	Agilent Technologies (USA)
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F ['] <i>proAB lacI^f</i> ZΔM15Tn10(Tet ^r)]	Agilent Technologies (USA)
<i>E. coli</i> One Shot® <i>ccdB</i> Survival™ 2 T1 ^R	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG fhuA::IS2</i>	ThermoFisher Scientific (D)

Tabelle 2. Verwendete *E. coli* Bakterienstämme

Plasmide

Vektor	Merkmal	Herkunft
Gateway [®] pDONR [™] 221	<i>attP</i> -Sites, <i>ccdB</i> -Kassette	ThermoFisher Scientific (D)
pMAL-c2X DEST ¹⁾	<i>attR</i> -Sites, <i>ccdB</i> -Kassette, MBP-Tag	Ursprünglich NEB (D)
Gateway [®] pEF- DEST51	<i>attR</i> -Sites, <i>ccdB</i> -Kassette, His Tag(6x), V5- Epitop	ThermoFisher Scientific (D)

Tabelle 3. Verwendete Vektoren

¹⁾ Der Zielvektor pMAL-c2X DEST basiert auf dem ursprünglichen NEB-Vektor pMAL-c2X der durch meine Kollegin Marta Danecka gatewaykompatibel verändert wurde, indem anschließend an das MBP-Gen und die Faktor Xa Schnittstelle die von den *attR*-Seiten flankierte *ccdB*-Kassette kloniert wurde.

Enzyme

Enzym	Anwendung	Herkunft
BP Clonase [™] II	BP-Reaktion	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)
Faktor Xa	Ile-(Glu/Asp)-Gly-Arg↓	Merck Millipore (D)
<i>FastDigest</i> Restriktionsendonucleasen	Klonierung	ThermoFisher Scientific (D) (ehem. Fermentas)
Glucose-Oxidase	MST-Messung	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Katalase	Aktivitätsassay	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
LR Clonase [™] II	LR-Reaktion	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)
<i>Pfu</i> Polymerase	Gateway-PCR	ThermoFisher Scientific (D)
Proteinase K	Inaktivierung der Gateway- Enzyme	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
TEV Protease	Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe- Gln↓Ser↓	Labor AG Muntau

Tabelle 4. Verwendete Enzyme

3.1.3 Zellkulturmaterialien

Name	Herkunft
<i>Antibiotic-Antimycotic Solution</i>	PAA (AUT)
Fötales Kalbsserum (FKS)	Lonza (Bel)
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH (D)
PBS-Puffer (10x)	PAA (AUT)
RPMI 1640 Kulturmedium mit L-Glutamin	PAA (AUT)
Trypsin EDTA (10x)	PAA (AUT)

Tabelle 5. Verwendete Zellkulturmaterialien

3.1.4 Größenstandards und Kits

Name	Verwendungszweck	Herkunft
1 kb DNA <i>ladder</i>	Agarosegelelektrophorese	ThermoFisher Scientific (D)
<i>Quick Start™ Bradford Protein Assay</i>	Konzentrationsbestimmung	Bio-RAD (D)
<i>Gel Filtration HMW Calibration Kit</i>	Gelfiltrationschromatographie	GE Healthcare Life Sciences (D)
<i>NativeMark™ Unstained Protein Standard</i>	Native Gelelektrophorese	ThermoFisher Scientific (D)
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	SDS-Gelelektrophorese	ThermoFisher Scientific (D)
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	Plasmid-Maxi-Präparation	Promega (D)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmid-Mini-Präparation	Qiagen, Hilden (D)
<i>QuikChange site-directed mutagenesis Kit</i>	Ortsspezifische Mutagenese	Agilent Technologies (USA)

Tabelle 6. Verwendete Kits und Größenstandards

3.1.5 Antikörper

Antikörper	Herkunft
Monoklonaler IgG-Antikörper gegen PAH (Maus)	Merck Millipore (D)
Monoklonaler IgG-Antikörper gegen GAPDH (Maus)	Meridian Life Sciences, Inc. (USA)
Ziege- α -Maus-IgG gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP)	St. Cruz Biotechnology, Inc. (USA)

Tabelle 7. Verwendete Antikörper

3.1.6 Nährmedien und Antibiotika

Alle Medien wurden mit entionisiertem und gefiltertem Wasser angesetzt (Millipore) und direkt nach Herstellung autoklaviert. Die längerfristige Lagerung erfolgte im Kühlraum (4 °C).

Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L H ₂ O mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
LB Agar-Platten	LB-Medium mit 2 % Agar versetzen
Selektive LB Agar-Platten	LB-Medium mit 2 % Agar versetzen. Nach Abkühlen unter 50 °C erfolgt Zugabe des entsprechenden Antibiotikums

Antibiotika

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Herkunft
Ampicillin	100 µg/ml	SERVA Electrophoresis GmbH (D)
Kanamycin	35 µg/ml	Carl Roth GmbH (D)
Chloramphenicol	25 µg/ml	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)

Tabelle 8. Eingesetzte Antibiotika

3.1.7 Verwendete Puffer

Alle Puffer wurden mit entionisiertem und gefiltertem Wasser angesetzt (Millipore) und direkt nach ihrer Herstellung filtriert und entgast. Die längerfristige Lagerung erfolgte im Kühlraum bei 4 °C.

Lösungen für molekularbiologische Methoden

Puffer-TFB1

Menge **1 M**-Lösungen für **500 ml Puffer**

100 mM RbCl	50 ml
50 mM MnCl ₂	25 ml
30 mM K-Acetat	15 ml
10 mM CaCl ₂	5 ml
15 % Glycerin	88 ml von 85 % Glycerin
dH ₂ O	auf 500 ml auffüllen (pH 5,8)

Puffer-TFB2

Menge **1 M**-Lösung für **500 ml Puffer**

10 mM MOPS	5 ml
10 mM RbCl	5 ml
75 mM CaCl ₂	37,5 ml
15 % Glycerin	88 ml von 85 % Glycerin
dH ₂ O	auf 500 ml auffüllen (pH 6,8)

Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Säulenpuffer

1 M Tris-HCl pH 7,4	40 ml
NaCl	23,4 g
0,5 M EDTA	4 ml
DTT	308 mg
dH ₂ O	auf 2000 ml auffüllen (pH 6,8)

Maltosepuffer

Maltose	1,71 g
Säulenpuffer	auf 500 ml auffüllen

Hepespuffer

NaHEPES	10,4 g
NaCl	23,37 g
dH ₂ O	auf 2000 ml auffüllen (pH 7,0)

Entfärberlösung

Methanol	300 ml
Eisessig	75 ml
dH ₂ O	auf 1000 ml auffüllen

Kathodenpuffer

1 M Tris-HCl pH 10,4	25 ml
6-Aminocaprinsäure	5,24 g
Methanol	200 ml
dH ₂ O	auf 1000 ml auffüllen (pH 9,4)

Anodenpuffer I

1 M Tris-HCl pH 10,4	25 ml
Methanol	200 ml
dH ₂ O	auf 1000 ml auffüllen (pH 10,4)

Anodenpuffer II

1 M Tris-HCl pH 10,4	300 ml
Methanol	200 ml
dH ₂ O	auf 1000 ml auffüllen (pH 10,4)

10x TBS-Puffer

500 mM TrisHCl	
1,5 M NaCl	
dH ₂ O	auf 1000 ml auffüllen (pH 7,5)

HPLC-Puffer

Ammoniak	15,7 ml
Essigsäure	20 ml
dH ₂ O	auf 1000 ml auffüllen (pH 4,6)

CD-Puffer

0,2 M KH_2PO_4	19,5 ml
0,2 M K_2HPO_4	30,5 ml
	auf 100 ml auffüllen (pH 7,0)
	→ Verdünnung auf 20 mM für die Messung

3.1.8 Sonstige Materialien

Name	Herkunft
<i>Amersham™ Hybond™</i> PVDF Membran	GE Healthcare Life Sciences (D)
<i>Amicon® Ultra 15 mL Centrifugal Filters</i>	Merck Millipore (D)
Filtropur S 0,2 µm und 0,45 µm	Sarstedt (D)
Fluoreszenz-Küvetten (16.100-F/Q/10/Z20 6)	Starna (D)
<i>Glow Writer</i>	Diversified Biotech (USA)
Küvettenreiniger Hellmanex-II	Hellma Analytics (D)
<i>NativePAGE™</i> 4-16 % Bis-Tris Protein Gel	ThermoFisher Scientific (D)
Nunc® CryoTubes®	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
<i>NuPAGE™</i> 10 % Bis-Tris Midi Protein Gel	ThermoFisher Scientific (D)
<i>NuPAGE™</i> 4-12 % Bis-Tris Midi Protein Gel	ThermoFisher Scientific (D)
96-well Platten (RT7900)	Applied Biosystems
Petrischalen 92x16 mm	Sarstedt (D)
Pipettenspitzen	Eppendorf (D) und Sarstedt (D)
Pipettierhilfe Eppendorf research	Eppendorf (D)
6-Well Flachboden-Kulturplatten	Greiner Bio-one (D)
<i>Whatman® cellulose chromatography papers</i> 3 mm	GE Healthcare Life Sciences (D)
1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt (D)
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (D)
50 ml Zentrifugenröhrchen	Corning (USA)

Tabelle 9. Verwendete Materialien

3.1.9 Laborgeräte und Chromatographiesäulen

Name	Herkunft
7900HT Fast Real-Time PCR System	ThermoFisher Scientific (D)
ÄKTApurifier Chromatographiesystem	GE Healthcare Life Sciences (D)
ÄKTExpress Chromatographiesystem	GE Healthcare Life Sciences (D)
Amaxa® Nucleofector®	Lonza (Bel)
Branson Digital Cell Disruptor	Branson, Emerson Industrial Automation (USA)
CARY Eclipse Fluoreszenz-Spektrophotometer	Varian, Agilent Technologies
Circular Dichroism Spectrometer J-1000	JASCO Germany GmbH (D)

DIANA III imaging system	Raytest (D)
DynaPro NanoStar	Wyatt Technology Europe GmbH (D)
FLUOStar Optima Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät	BMG Labtech GmbH (D)
HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade	GE Healthcare Life Sciences (D)
HiLoad 26/600 Superdex 200 prep grade	GE Healthcare Life Sciences (D)
Spherisorb ODS2 Säule, 10 µm, 4.6 mm X 150 mm	Waters (USA)
Küvettschleuder	ITS (D)
Mastercycler personal	Eppendorf (D)
MBPTrap HP, 1 x 5 ml	GE Healthcare Life Sciences (D)
Monolith NT.115	NanoTemper Technologies GmbH (D)
Nano Drop ND 1000	Thermo Scientific (USA)
Peltier-Thermostatted Multicell Holder	Varian, Agilent Technologies (USA)
pH-Meter	VWR International (USA)
Sartorius Extend Präzisionswaage	Sartorius (D)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific (USA)
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International (USA)
UltiMate 3000 HPLC	ThermoFisher Scientific (D)
Ultrospec 1000 UV/ Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech (USA)
Variomag Monotherm Magnetrührer	ThermoFisher Scientific (D)
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG (CH)
XCell SureLock® Mini und Midi-Cell	ThermoFisher Scientific (D)
XCell Sure Lock™ Mini-Cell Blot Module	ThermoFisher Scientific (D)
Zentrifuge Rotana 460 R	Hettich (D)
Zentrifuge Avanti	Beckman Coulter (D)

Tabelle 10. Verwendete Geräte

3.1.10 Software

Name	Anwendung	Herkunft
ABI 7900 Fast System SDS 2.3	Software für RT7900	ThermoFisher Scientific (D)
AIDA Image Analyzer	Densitometrische Auswertung der Western Blot Banden	Raytest (D)
Dionex™ Chromeleon™ 6.8	Software für HPLC	ThermoFisher Scientific (D)
Dynamics 7.1.9.	Software für DLS	Wyatt Technology Europe GmbH (D)
EndNote™	Literaturverwaltung	Clarivate Analytics (USA)
GOLD version 5.1	Molecular Modeling	Cambridge Crystallographic Data Centre (UK)

Microsoft Office 2010	Textbearbeitung und Tabellenkalkulation	Microsoft Deutschland GmbH (D)
NTAnalysis V1.5.49	Software für MST	NanoTemper Technologies GmbH (D)
Optima Software, V 2.20	Software für FLUOStar	BMG Labtech GmbH (D)
GraphPad Prism, V 5.0	Datenverarbeitung	GraphPad Software, Inc. (USA)
Serial Cloner, V 2.5	Molekularbiologische Software	http://www.serialbasics.com
Sequence Navigator™	Auswertung der Sequenzierungen	Thermo Scientific Inc. (USA)
Spectra Manager™II	Software für CD-Gerät	JASCO Germany GmbH (D)
UNICORN Control Software	Software für ÄKTApurifier und ÄKTExpress	GE Healthcare Life Sciences (D)

Tabelle 11. Verwendete Software

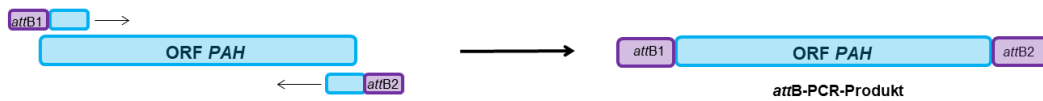
3.2 Molekularbiologische Methoden

Die Gefäße und Lösungen die zur Anzucht von Mikroorganismen sowie für molekularbiologische Arbeiten eingesetzt wurden, sind vor Gebrauch autoklaviert worden und waren somit steril.

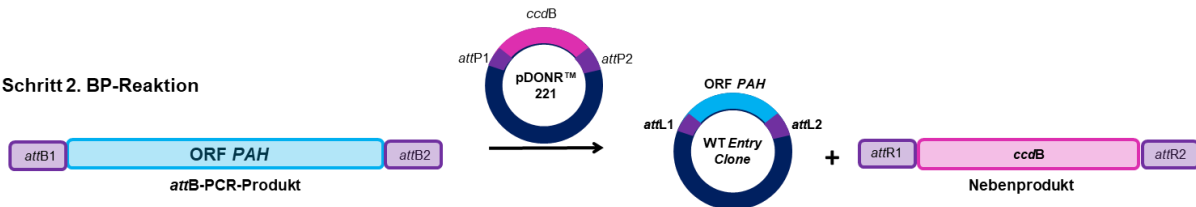
3.2.1 Methoden der Gateway®-Technologie

Die Gateway®-Technologie ist eine innovative Klonierungstechnologie basierend auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda (Landy 1989). Vorteil der Gateway-Klonierung gegenüber dem konventionellen Klonieren unter Einsatz von Restriktionsendonukleasen ist das schnelle und effiziente Klonieren einer kodierenden DNA-Sequenz in multiple Expressionsvektoren, die in unterschiedlichen Expressionssystemen eingesetzt werden können. Die Generierung eines Expressionsvektors gelingt in drei Schritten (Abbildung 8). Zunächst erfolgt die Modifikation der entsprechenden cDNA durch Addition der gatewayspezifischen *attB*-Sites im Rahmen einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Im zweiten Schritt wird das *attB*-PCR-Produkt durch eine BP-Rekombinationsreaktion in den entsprechenden pDONR-Vektor kloniert, wodurch ein *Entry-Clone* generiert wird. Im letzten Schritt werden durch eine LR-Rekombinationsreaktion zwischen *Entry-Clone* und *DEST*-Vektor die gewünschten Expressionskonstrukte erhalten.

Schritt 1. Gateway-PCR



Schritt 2. BP-Reaktion



Schritt 3. LR-Reaktion

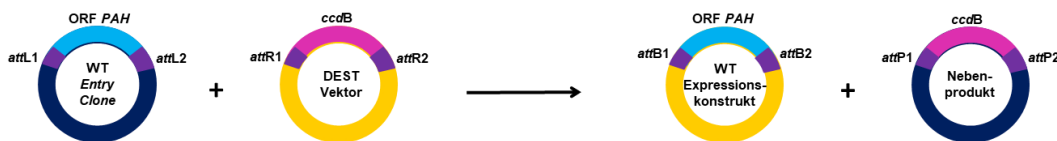


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Gateway®-Klonierung

Der erste Schritt der Gateway®-Klonierung ist eine Polymerasekettenreaktion (PCR), um das für die Phenylalaninhydroxylase (PAH) kodierende *PAH* Gen (*open reading frame*, ORF *PAH*) mit spezifischen Primern, die neben der *PAH*-Gensequenz auch die gateway-spezifischen *attB*-Sites enthalten, zu amplifizieren. Das *attB*-PCR-Produkt, welches die durch die *attB*-Sites flankierte *PAH*-Sequenz enthält, wurde als Edukt für die BP-Reaktion eingesetzt, die eine Rekombination des *attB*-PCR-Produkts mit dem Donor-Vektor pDONR™221 ist. Das im Donor-Vektor enthaltenen *ccdB*-Gen wurde gegen das *attB*-PCR-Produkt ausgetauscht und ein Wildtyp *PAH Entry Clone* generiert. Die abschließende LR-Reaktion ist eine Rekombination des durch die BP-Reaktion generierten Wildtyp *PAH Entry Clones* mit einem geeigneten Zielvektor (DEST Vektor), wodurch das im Zielvektor enthaltenen *ccdB*-Gen gegen das *PAH*-Gen ausgetauscht und ein Expressionsplasmid des Wildtyps generiert wird. Je nach verwendetem Zielvektor kann das generierte Expressionsplasmid im pro- oder eukaryoten System zur Expression der kodierenden Proteine eingesetzt werden.

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion zur Generierung des *attB*-PCR Produkts

Die PCR dient der Amplifizierung von DNA-Fragmenten *in vitro* (Mullis and Faloona 1987). Neben der entsprechenden cDNA werden eine thermostabile DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität (*proofreading*), ein passender Puffer, Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) und entsprechende Oligonucleotidprimer benötigt. Tabelle 12 zeigt die beiden Primer, die während der Gateway-PCR zur Generierung der *attB*-Sites für den *PAH*-Wildtyp verwendet wurden. Sie setzen sich aus den für das Annealing erforderlichen *PAH* Genabschnitten des Wildtyps und den von Herstellerseite vorgegebenen *attB*-Rekombinationsstellen zusammen. Diese bestehen aus 25 Nucleotiden (fett gedruckt), die von den an der Rekombination beteiligten Enzymen erkannt werden.

Name	Merkmal	Sequenz 5'-3'
PAH	<i>attB1</i> -Site	GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ACACCATGGCT
PAH	<i>attB2</i> -Site	GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTACTTTATT

Tabelle 12. Oligonucleotide zur Erzeugung eines *attB*-Gateway-PCR-Produkts

Ein Standard-*Gateway*-PCR-Ansatz hatte ein Volumen von 50 µl und setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen (Tabelle 13).

Komponente	Konzentration bzw. Volumen
DNA-Matrize	50 ng
10x Puffer	1x
PAH <i>forward</i> Primer	10 µM
PAH <i>reverse</i> Primer	10 µM
dNTP Mix	1,5 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	1 µl
H ₂ O bidest.	Auf 50 µl auffüllen

Tabelle 13. PCR-Pipettierschema zur Erzeugung einer *attB*-Site flankierten cDNA

Alle Komponenten für die *Gateway*-PCR wurden in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert und vermischt. Anschließend erfolgt in einem Thermocycler umgehend die Vervielfältigung der cDNA unter Auswahl eines spezifischen PCR-Programms (Tabelle 14) bestehend aus einem Denaturierungsschritt, einem Hybridisierungsschritt und einem Elongationsschritt. Nach Durchführung der PCR wurde die richtige Länge des finalen *attB*-PCR-Produkts des *PAH*-Wildtyps über ein Agarosegel verifiziert.

Schritte	Temperatur	Prozess	Dauer
1	95 °C	Initiale Denaturierung	5 Minuten
2	95 °C	Denaturierung	20 Sekunden
3	T _m	Hybridisierung	60 Sekunden
4	72 °C	Amplifikation	2 Minuten
Wiederholung der Schritte 2 - 4, 18x			
5	72 °C	Vervollständigung aller Stränge	10 Minuten
6	4 °C	Lagerung	unendlich

Tabelle 14. Thermocycler-Protokoll zur Generierung des *attB*-PCR-Produkts

3.2.1.2 BP Rekombinationsreaktion zur Generierung des *PAH Entry Clones*

Die BP-Rekombinationsreaktion diente der Erzeugung des *PAH*-Wildtyp *Entry-Clones* durch Rekombination zwischen dem *attB*-Sites flankierten *PAH*-Wildtyp PCR-Produkt und dem *attP*-Sites enthaltenden Donor-Vektor pDONR™221, wodurch das im Donor-Vektor enthaltene *ccdB*-Gen gegen das *attB*-PCR-Produkt ausgetauscht wurde. Als Nebenprodukt entsteht ein das Selbstmordgen *ccdB* tragendes Plasmid, welches im weiteren Verlauf dazu führt, dass die mit dem *ccdB* Plasmid transformierten Zellen zu Grunde gehen und nur die Transformanten die das gewünschte Expressionsplasmid tragen anwachsen.

Tabelle 15 zeigt den Reaktionsansatz für die BP-Reaktion. Die Komponenten wurden in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert, gemischt und in einem Thermocycler bei 25 °C inkubiert.

Nach 17 h erfolgte die Zugabe von 1 µl Proteinase K zum proteolytischen Verdau der BP Clonase (10 min, 37 °C).

Komponente	Konzentration bzw. Volumen
<i>attB</i> -PCR-Produkt	50 ng
pDONR™221	150 ng
BP Clonase™II	1 µl
TE Puffer	ad 5 µl

Tabelle 15. Pipettierschema für die BP-Rekombinationsreaktion

1 µl des BP-Reaktionsansatzes wurde für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen verwendet (Kapitel 3.2.9). Die Selektion der positiven Klone erfolgte auf kanamycinhaltigen Agarplatten. Da gleichzeitig das Genprodukt des *ccdB*-Gens auf konventionell im Labor verwendete Bakterienstämme toxisch wirkt, erhöhte diese zusätzliche Selektion die Wahrscheinlichkeit für positive Klone deutlich. Aus den gewachsenen Kolonien auf der Platte wurden vier in einer Übernachtskultur angezogen und die Plasmid-DNA daraus isoliert. Ein analytischer Restriktionsenzymverdau (Kapitel 3.2.4) einschließlich Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.7) diente dazu, eine erfolgreiche BP-Reaktion zu bestätigen. Die abschließende Sequenzierung (Kapitel 3.2.3) eines positiven *Entry Clones* konnte die richtige Sequenz des *PAH*-Wildtyps bestätigen. Dieser *Entry Clone* wurde für alle folgenden LR-Reaktionen eingesetzt und diente zudem als PCR-Matrize, um gezielt Punktmutationen im *PAH*-Gen mittels ortsspezifischer Mutagenese (Kapitel 3.2.2) zu generieren.

3.2.1.3 LR-Rekombinationsreaktion zur Generierung der *PAH*-Expressionskonstrukte

Die gatewayspezifische LR-Reaktion bezeichnet die Reaktion zwischen *Entry Clone* und Zielvektor zur Generierung der Expressionskonstrukte. Während der LR-Reaktion erfolgt der Austausch der *attL*-Sites flankierten cDNA des *PAH*-Wildtyp aus dem *Entry Clone* gegen das *attR*-Sites flankierte *ccdB*-Gen aus den entsprechenden DEST-Vektoren pMAL-c2X DEST und pEF DEST51. Auch während der LR-Reaktion entsteht ein das Selbstmordgen *ccdB* tragendes Plasmid als Nebenprodukt der Reaktion, welches die damit transformierten Zellen tötet und so die Chance auf positive Klone erhöht. Zur weiteren Selektion tragen die Expressionsvektoren eine andere Antibiotika-Resistenz als die *Entry Clones*.

Tabelle 16 zeigt den Reaktionsansatz für die LR-Reaktion. Die Komponenten wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert, gemischt und in einem Thermocycler bei 25 °C inkubiert. Nach 17 h erfolgte die Zugabe von 1 µl Proteinase K zum proteolytischen Verdau der LR Clonase (10 min, 37 °C). 1 µl des LR-Reaktionsansatzes wurde umgehend für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen verwendet. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf Agarplatten mit Ampicillinresistenz. Von den gewachsenen Kolonien auf den Platten des *PAH*-Wildtyps und der Varianten wurden jeweils vier Klone in einer Übernachtskultur angezogen und die Plasmid-DNA daraus isoliert. Eine erfolgreiche LR-Reaktion konnte

durch einen analytischen Restriktionsenzymverdau (Kapitel 3.2.4) und anschließende Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.2.7) bestätigt werden. Eine weitere Sequenzierung war aufgrund der durchgeführten Rekombinationsreaktion nicht notwendig. Für die Proteinexpression erfolgte die Transformation von BL21(DE3)-Zellen mit den positiven Expressionskonstrukten. Zur langfristigen Lagerung wurde jeder positive Klon auch als Glycerinkultur angelegt.

Komponente	Konzentration bzw. Volumen
PAH <i>Entry Clone</i>	50 ng
DEST-Vektor	150 ng
LR Clonase™II	2 µl
TE Puffer	ad 8 µl

Tabelle 16. Pipettierschema für die LR-Rekombinationsreaktion

3.2.2 Ortsspezifische Mutagenese – *site directed mutagenesis* (SDM)

Mittels ortsspezifischer Mutagenese konnten gezielt Punktmutationen in die cDNA des *PAH*-Wildtyps eingebaut werden. Bei der PCR-basierten Vorgehensweise diente der in Kapitel 3.2.1.2 generierte *PAH Entry Clone* als Matrize, woraus unter Verwendung der entsprechenden mutagenisierenden Primer (Tabelle 19), die jeweiligen *Entry Clones* für die *PAH*-Varianten I65T, R68S, R261Q, Y414C und Y417H generiert werden konnten. Die Tabelle 17 zeigt den Reaktionsansatz für die mutagenisierende PCR.

Komponente	Konzentration bzw. Volumen
DNA-Matrize	60 ng
5x GC-Puffer	1x
SDM <i>forward</i> Primer	10 µM
SDM <i>reverse</i> Primer	10 µM
dNTP Mix	150 µM
Kapa Hifi Hot Start-Polymerase	1 µl
H ₂ O bidest.	Auf 50 µl auffüllen

Tabelle 17. Pipettierschema für die SDM zur Erzeugung varianter *PAH Entry Clones*

Alle PCR-Komponenten wurden in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert, gemischt und der *Entry Clone* als Matrize in einem Thermocycler unter Auswahl eines spezifischen PCR-Programms vervielfältigt (Tabelle 18). Die richtige Länge der amplifizierten, noch linearen PCR-Produkte der *PAH*-Varianten, wurde umgehend über ein Agarosegel verifiziert. Durch Inkubation des PCR-Ansatzes mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I (10 U/µl, 37 °C, 30 min) konnte die methylierte Matrizen-DNA verdaut werden. *Dpn* I wurde im Anschluss hitzeinaktiviert (80 °C, 5 min) und ein Aliquot des Ansatzes umgehend für die Transformation von XL1-*blue* Zellen verwendet, die durch ihre Ligaseaktivität die offenen Enden der SDM-

Produkte zirkularisierten. Die Selektion der positiven Klone erfolgte auf kanamycinhaltigen Agarplatten. Aus den gewachsenen Kolonien wurden jeweils vier Stück in einer Übernachtskultur angezogen und die Plasmid-DNA daraus isoliert. Ein analytischer Restriktionsenzymverdau (Kapitel 3.2.4) einschließlich Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.7) diente dazu einen positiven Klon der *Entry Clones* von I65T, R68S, R261Q, Y414C und Y417H zu identifizieren, der durch Sequenzierung (Kapitel 3.2.3) bestätigt wurde.

Schritte	Temperatur	Prozess	Dauer
1	95 °C	Initiale Denaturierung	5 Minuten
2	98 °C	Denaturierung	20 Sekunden
3	60-78 °C	Hybridisierung	60 Sekunden
4	72 °C	Amplifikation	4 Minuten (ca. 1min/kb)
Wiederholung der Schritte 2 - 4, 18x			
5	72 °C	Vervollständigung aller Stränge	5 Minuten
6	4 °C	Lagerung	unendlich

Tabelle 18. Thermocycler-Protokoll zur Durchführung der ortsspezifischen Mutagenese

Tabelle 19 listet die mutagenisierenden Oligonukleotide auf, die während der ortsspezifischen Mutagenese zur Generierung der entsprechenden *PAH*-Varianten eingesetzt wurden. Die in den mutagenisierenden Primern ausgetauschten Nukleotide sind fett gedruckt. Die Annealingtemperatur für alle SDM-Primer betrug 78 °C. Die Ableitung der mutagenisierenden Primer erfolgte durch ein entsprechendes Tool auf der Homepage der Firma Agilent Technologies.

(http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp?toggle=uploadNow&mutate=true&_requestid=424022)

Name	Merkmal	Sequenz 5'- 3'
I65T for	T_194_C	5'-ATGATGTAAACCTGACCCACA CT GAATCTAGACCTTCTC-3'
I65T rev	T_194_C	5'-GAGAAGGTCTAGATTCAG T GTGGGTCAGGTTTACATCAT-3'
R68S for	A_204_C	5'-CTGACCCACATTGAATCTAG CC CTTCTCGTTTAAAGAAAGA-3'
R68S rev	A_204_C	5'-TCTTTCTTTAAACGAGAAGG G CTAGATTCAATGTGGGTCA-3'
R261Q for	G_782_A	5'-GGCCTGGCCTTCC AA GTCTTCCACTGC-3'
R261Q rev	G_782_A	5'-GCAGTGGAAGACT T GGAAGGCCAGGCC-3'
Y414C for	A_1241_	5'-GTATGGGTCG C AGCGAACTGAGAAGGGCC-3'
Y414C rev	A_1241_	5'-GGCCCTTCTCAGTTCGCT G CGACCCATAC-3'
Y417H for	T_1249_	5'-CTCAGTTCGCTACGACCC CA CACCCAAAGG-3'
Y417H rev	T_1249_	5'-CCTTTGGGTGT G TGGGTCTAGCGAACTGAG-3'

Tabelle 19. Oligonukleotide für die ortsspezifische Mutagenese

3.2.3 Sequenzierung

Die richtige Basenabfolge aller neu klonierten *Entry Clones* von *PAH*-Wildtyp und Varianten wurde durch Sequenzierung der entsprechenden Plasmide (Eurofins Genomics, Ebersberg) verifiziert. Alle Proben wurden gemäß den Anforderungen der Firma vorbereitet (30 µl Plasmid-DNA, Konzentration 50-100 ng/µl). Der Abgleich der Sequenzierungsergebnisse mit der tatsächlichen Basenabfolge erfolgte mit dem Programm Sequence Navigator™.

3.2.4 Analytischer Restriktionsenzymverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen je nach Spezifität vier bis acht palindrome Basenpaare in einem DNA-Doppelstrang und schneiden die zirkulären Plasmide exakt in dieser Zielsequenz, wodurch neu klonierte Plasmide überprüft werden können. Nach Inkubation (15 min, 37 °C) mit den entsprechenden Enzymen (*Fast Digest* Restriktionsendonukleasen, ehem. Fermentas) konnte die Größe der entstandenen linearen DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels UV-Licht visualisiert werden (Kapitel 3.2.7). Die erwartete Länge der Fragmente wurde zuvor mit dem Programm Serial Cloner berechnet. Alle Restriktionsansätze (Tabelle 20) wurden in den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Bei einem Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde der Puffer gewählt, der eine ausreichende Aktivität für beide Enzyme garantierte.

Komponente	Konzentration bzw. Volumen
Plasmid-DNA	1 µg
Restriktionsenzym	2-10 U
5x Restriktionspuffer	2 µl
H ₂ O bidest.	ad 10 µl

Tabelle 20. Pipettierschema für einen Restriktionsansatz

3.2.5 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Flüssigkulturen wurden bei 37 °C in LB-Medium angezogen. Die Vorkulturen wurden dabei entweder aus einer Einzelkolonie der jeweiligen Masterplatte, oder aus einer Glycerinkultur angeimpft. In Abhängigkeit des transformierten Plasmids wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte über Nacht in einem Umluftinkubator mit Schüttelfunktion (200 UpM). Nach 16 h wurden die Zellen entweder geerntet um das entsprechende Plasmid zu isolieren, oder es erfolgte das Überimpfen der Vorkultur in eine entsprechende Hauptkultur zur anschließenden Proteinexpression. Das Wachstum der Bakterien konnte dabei photometrisch bei 595 nm ($OD_{595}=1=ca. 8 \times 10^8$ Zellen/ml) beobachtet werden (Sambrook *et al.* 1989)

3.2.6 Konservierung von *E. coli*

LB-Agar-Platten wurden für maximal vier Wochen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die längerfristige Lagerung der Plasmide erfolgte als Glycerinkultur der jeweiligen Einzelkolonie bei -80 °C. Hierzu wurde eine entsprechende Vorkultur angezogen, diese nach 16 h Inkubation bei 37 °C abzentrifugiert, das Zellpellet umgehend in 1 ml einer sterilen Lösung aus 50 % (v/v) Glycerin und LB-Medium resuspendiert und anschließend eingelagert.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von DNA erfolgte in 0,9 %igen, horizontalen Agarose-Gelen (0,3-10 kb) in 1 x TBE-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 120 mA. Vor jedem Auftrag wurden die Proben mit 1/5 Volumen an Probenpuffer versetzt, um die Dichte der DNA-Lösung gegenüber der des Puffers zu erhöhen. Zur Visualisierung der aufgetragenen DNA enthielt jedes Gel 0,4 µg/ml Ethidiumbromid, dessen Interkalation durch UV-Licht nachgewiesen und dokumentiert werden konnte. Die Größe der DNA-Fragmente ließ sich anhand eines Längenstandards abschätzen, der bei jeder Gelelektrophorese mitgeführt wurde.

3.2.8 Herstellung calciumkompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung calciumkompetenter Zellen wurden 100 ml LB-Medium ohne Antibiotikum mit 1 ml Übernachtskultur des entsprechenden Stammes angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5 im Schüttelinkubator angezogen und anschließend umgehend für 5 min auf Eis gekühlt. Nach einem Zentrifugationsschritt (4.000 g, 10 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wurde das Zellpellet in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und in Aliquots von 100 µl schockgefroren. Die längerfristige Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

3.2.9 Transformation calciumkompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation calciumkompetenter Zellen (DH5α, BL21(DE3) und XL1-blue) mit Plasmid-DNA wurden ca. 200 ng DNA auf 50 µl Zellen gegeben und die Mischung für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden und ein sofortiges Kühlen der Zellen auf Eis für weitere 90 Sekunden. Der Transformationsansatz wurde umgehend in 800 µl LB Medium ohne Antibiotikum aufgenommen, für weitere 45 min bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator angezogen und abschließend auf LB-Platten mit entsprechender Antibiotikaselektion ausgestrichen. Die Anzucht der resistenten Klone erfolgte über 16 h in einem Brutschrank bei 37 °C. *One Shot ccdB Survival T1 Phage-Resistant* Zellen sind gegenüber dem toxischen Effekt des *ccdB*-Gens resistent und wurden daher für die Transformation der Gateway®-Leervektoren (pMal-c2X, pEF DEST51)

verwendet. Die Transformation erfolgte nach obigem Protokoll mit der Ausnahme, dass die Inkubation bei 42 °C nur für 30 Sekunden erfolgte. Die positiven Klone wurden auf LB-Agarplatten mit Doppelresistenz (Ampicillin und Chloramphenicol) angezogen.

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

Analytische Plasmidpräparationen (Mini-Prep) aus *E. coli* Kulturen wurden nach Herstellerangaben (Qiagen) unter Verwendung des QIAprepSpin Miniprep Kits durchgeführt. Die maximale Ausbeute an DNA aus einer 5 ml Bakterienkultur waren 20 µg.

Alle für die Zellkultur geplanten Transfektionen erforderten eine größere Menge an DNA, die zudem Endotoxinfrei sein sollte. Die entsprechende Plasmidgewinnung erfolgte aus einer 250 ml Bakterienkultur (Maxi-Prep) ebenfalls nach Herstellerangaben (Promega) mit Ausbeuten von bis zu 1 mg DNA.

3.2.11 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Nach jeder Plasmidpräparation erfolgte die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration am NanoDrop-Spektrophotometer durch Absorptionsmessung der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O_{Millipore} als Leerwert. Eine Absorption von 1,0 entspricht 50 µg/ml DNA. Die Reinheit der Probe wurde durch das Verhältnis der Absorptionen bei E_{260 nm} zu E_{280 nm} ermittelt. Reine DNA weist einen E_{260/280 nm} Wert von 1,8 auf. Ein höherer Quotient weist auf RNA-Kontaminationen hin, ein niedrigeres Verhältnis auf Proteinverunreinigung.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

Zur Expression des PAH-Wildtyps und der Varianten als MBP-Fusionsproteine in *E. coli* wurde die cDNA in den pMAL-c2X DEST Vektor kloniert (Kapitel 3.2.1) und die Plasmide umgehend in BL21 (DE3) Zellen transformiert. Die Anzucht der entsprechenden *E. coli*-Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium über Nacht in einem Umluftinkubator mit Schüttelfunktion (200 UpM). Nach 16 h wurde die Vorkultur in eine Hauptkultur mit einem Volumen von 2 Litern unter erneuter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums und 20 ml einer 20 %igen Glucoselösung überimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₅₉₅=0,5 kultiviert. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 0,3 mM IPTG (Gersting *et al.* 2008) und 0,2 mM Eisenammoniumsulfat (Martinez *et al.* 1995). Die Expression des PAH-Wildtyps und der PAH-Varianten gelang bei einer Postinduktionstemperatur von 28 °C über 20 h. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (5.000 UpM, 20 min, 4 °C). Nach einem Waschschriff mit 50 ml einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) wurden die Zellen nochmals wie beschrieben pelletiert und das Pellet anschließend in 50 ml Säulenpuffer unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (Complete Mini) resuspendiert. Das Aufschließen der Zellen erfolgte

mittels Ultraschall (45 Sekunden, 10 % Amplitude, 0,8 Sekunden Puls, 0,2 Sekunden Pause) in fünf Zyklen unter Kühlung der Zellsuspension in einem Ethanol-Eisbad. Unlösliche Proteine und Zellmembranbestandteile konnten bei 15.000 UpM (20 Minuten, 4 °C) von den löslichen, überexprimierten Proteinen abgetrennt werden. Der lösliche Überstand wurde durch eine 0,45 µm Micropormembran filtriert und umgehend zur Proteinreinigung eingesetzt.

3.3.2 Reinigung der Enzyme aus *E. coli*

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen chromatographischen Methoden dienten zur Aufreinigung des PAH-Wildtyps und der Varianten I65T, R68S, R261Q, Y414C und Y417H. Nach den einzelnen Reinigungsschritten wurden Gelproben eingefroren, die abschließend durch Sodiumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (Kapitel 3.3.4) die erfolgreiche Reinigung bestätigen konnten (Kapitel 4.2.1 und 4.4.1).

3.3.2.1 Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen individuellen, kovalent an eine Matrix gebundenen, immobilisierten Bindungspartner, dessen biospezifische Wechselwirkung genutzt wird um einen Liganden selektiv aus einer komplexen Mischung heraus zu adsorbieren. Die Elution des Zielmoleküls erfolgt dann entweder durch kompetitive Verdrängung aus der Bindung, oder durch einen Konformationswechsel aufgrund einer Änderung von pH-Wert oder Ionenstärke. Bei der Affinitätschromatographie handelt es sich um die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen (Lottspeich and Zorbas 1998).

Zur Isolierung der MBP-PAH Fusionsproteine wurde der lösliche Überstand (Kapitel 3.3.1) auf eine Amylose-Affinitätssäule (MBPTrap HP, 5 ml Säulenvolumen) aufgetragen, um die oligomeren Fusionsproteine vom bakteriellen Zellüberstand abzutrennen. Die Säule enthielt an Harz gekoppelte Amylosemoleküle als immobilisierten Bindungspartner, an welchen die MBP-Zielmoleküle mit hoher Affinität binden konnten, während alle anderen Bestandteile des Zellüberstandes durch Waschen der Säule mit fünffachen Säulenvolumen abgetrennt werden konnten. Die Elution der MBP-PAH Fusionsproteine erfolgte durch einen Puffer mit einem Anteil von 10 mM Maltose, welche mit höherer Affinität an die Amylosemoleküle bindet und die MBP-Fusionsproteine von der Säule verdrängt. Die Affinitätschromatographie wurde am automatisierten ÄKTexpress Chromatographiesystem durchgeführt, wodurch die eluierten Proteine direkt in einen am System angeschlossenen Loop geleitet wurden, aus welchem der unmittelbare Auftrag der Fusionsproteine auf die ebenfalls am gleichen System angeschlossene Gelfiltrationssäule erfolgte (Kapitel 3.3.2.2).

3.3.2.2 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Proteinen unterschiedlicher Größe aufgrund ihres hydrodynamischen Radius, durch unterschiedliche Verteilung der Proteine zwischen einem Trägermaterial und dem umgebenden Medium. Die Matrix der im Rahmen der Dissertation eingesetzten Gelfiltrationssäulen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk aus quervernetzter Agarose und Dextran mit definierter Porengröße. Die Porengröße ist für die Auftrennung entscheidend, denn nur die Proteine, deren hydrodynamischer Radius kleiner ist als die Porengröße, können in das Trägermaterial eindringen. Je kleiner das Protein ist, umso später wird es von der Säule eluiert. Proteine mit einem Molekulargewicht außerhalb der Ausschlussgrenze können nicht in die Gelporen eindringen und werden daher gemeinsam mit der Lösemittelfront eluiert (Lottspeich and Zorbas 1998). Als Laufpuffer sollten Puffer mit mittlerer Ionenstärke verwendet werden, um ionische Interaktionen zwischen den aufzutrennenden Proteinen und dem Trägermaterial zu verhindern und hydrophobe Wechselwirkungen zu minimieren.

Nach der Affinitätschromatographie (Kapitel 3.3.2.1) konnte die Oligomerisierung der MBP-PAH Fusionsproteine durch Größenausschlusschromatographie analysiert werden. Hierzu wurde die im Loop des ÄKTExpress Chromatographiesystem gesammelte Fraktion der MBP-PAH Fusionsproteine auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (HiLoad 26/60 Superdex 200pg), welche zuvor mit dem entsprechenden Laufpuffer equilibriert wurde (20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,0). Die MBP-PAH Tetramere wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min nach 146 ml eluiert. Die Fraktionen der entsprechenden Peaks wurden gesammelt, in einem Amicon® Ultra 15 ml Zentrifugationsfilter vereinigt und durch Zentrifugation (2000 UpM, 4 °C, 45 min) eingeeengt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte spektrophotometrisch (Kapitel 3.3.3). Anschließend wurden die Fusionsproteine entweder aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, oder umgehend mit Faktor Xa oder der Protease des Tobacco Etch Virus (TEV) inkubiert, um den MBP-Fusionspartner abzuspalten (Kapitel 3.3.2.3).

3.3.2.3 Abspaltung des MBP-Fusionspartners durch Faktor Xa oder TEV Protease

Die Abspaltung des MBP-Fusionspartners erfolgte durch Inkubation der gereinigten MBP-PAH Tetramere (Kapitel 3.3.2.2) mit Faktor Xa (1 mg MBP-PAH/50 U Faktor Xa) oder TEV (MBP-PAH:TEV = 100:1) bei 4 °C über 16 h. Faktor Xa gehört zur Familie der Serinproteasen und erkennt ein lineares Epitop der allgemeinen Form Ile-Glu-Gly-Arg und spaltet das Protein nach dem Arginin. Die TEV-Protease erkennt das lineare Epitop Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓ und spaltet das Protein nach Glutamin oder Serin.

3.3.2.4 Rechromatographie zur Isolierung der funktionellen PAH-Tetramere

Nach Abspaltung des MBP-Fusionspartners durch Faktor Xa oder TEV, war ein weiterer Gelfiltrationsschritt notwendig um die funktionellen PAH Tetramere (208 kDa) und das MBP

(43 kDa) zu separieren. Hierfür kam eine kleinere Gelfiltrationssäule am ÄKTApurifier Chromatographiesystem zum Einsatz (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg). Als Laufpuffer diente erneut der in Kapitel 3.3.2.2 verwendete Puffer, mit welchem die Säule vor ihrer Verwendung bereits equilibriert wurde. Die Auftrennung erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min. Die Elution der PAH-Tetramere konnte nach 71 ml nachgewiesen werden. Die Fraktionen des entsprechenden Peaks wurden gesammelt, in einem Amicon[®] Ultra 15 ml Zentrifugationsfilter vereinigt und durch Zentrifugation (2000 UpM, 4 °C, 45 min) eingeeengt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte spektrophotometrisch (Kapitel 3.3.3), bevor die PAH-Tetramere aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

3.3.2.5 Kalibrierung der Gelfiltrationssäulen

Zur Aufreinigung der MBP-PAH Fusionsproteine kam während der Promotionsarbeit eine HiLoad 26/60 Superdex 200 pg zum Einsatz, während für die Rechromatographie der geschnittenen Tetramere eine kleinere Säule verwendet wurde (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg). Beide Säulen mussten vor der ersten Aufreinigung mit Proteinen bekannter Größe (Thyroglobulin, 669 kDa; Ferritin, 440 kDa; Aldolase, 158 kDa; Ovalbumin, 43 kDa, Gel Filtration HMW Calibration Kit GE Healthcare) kalibriert werden. Durch Auftragen des Laufzeitvolumens gegen die Molekülmasse der Standardproteine, kann aus der resultierenden Eichgeraden der Stokes-Radius des zu analysierenden Proteins berechnet werden und eine Aussage über die Oligomerisierung gemacht werden. Zur Ermittlung des Ausschlussvolumens wurde jeweils Blue Dextran (>2.000 kDa) verwendet.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine durch UV-Absorption

Aufgrund der Absorptionseigenschaften der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und in geringerem Ausmaß auch Phenylalanin, können Proteine ultraviolettes Licht in einem Wellenlängenbereich zwischen 250 und 290 nm absorbieren. Daher nutzt man zur spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung von gereinigten Proteinen maßgeblich die Absorption von Tryptophan, mit einem Absorptionsmaximum bei 279 nm. Durch das Lambert Beer'sche Gesetz kann aus dem gemessenen A_{279} -Wert bei bekannten Extinktionskoeffizienten die Proteinkonzentration (Gleichung 3.1) berechnet werden.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.1)$$

A	Absorption bei 279 nm
ε	Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$)
c	Proteinkonzentration (M)
d	Schichtdicke der Küvette (cm)

Mittels UV-Absorption wurde die Konzentration der PAH-Fusionsproteine ($\epsilon_{280\text{nm}}(1\text{mg/ml})=1,63$) und der geschnittenen PAH-Proteine ($\epsilon_{280\text{nm}}(1\text{mg/ml})=1,0$) gemessen, indem die Proteine im Laufpuffer verdünnt und als Triplikate gegen Laufpuffer als Referenz gemessen wurden.

3.3.4 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde während der Promotionsarbeit eingesetzt, um den Verlauf der Proteinaufreinigungen zu dokumentieren oder die Menge der Proteinexpression in Zellkultur zu überprüfen. Während der SDS-PAGE besitzen die zu analysierenden Proteine eine negative Überschussladung, da das im Probenpuffer enthaltene, negativ geladene SDS im Verhältnis von 1:1,4 pro Aminosäurerest an das Protein bindet. Daher ist der Anteil an negativer Überschussladung proportional zur Größe des Proteins, wodurch die Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Masse aufgetrennt werden, sobald sie im angelegten elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Da das Laufverhalten der Proteine während der Elektrophorese ausschließlich von ihrer Größe abhängig ist, erfolgt die Auftrennung der Proteine proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes, wobei kleinere Proteine die Polyacrylamidmatrix schneller durchlaufen können als die Größeren.

Um die Proteine in der Probe vollständig aufzulösen, mögliche Proteasen zu inaktivieren und Tertiärstrukturen zu unterbinden, wurden die Proben vor dem Auftragen auf das Gel fünf Minuten mit der gleichen Menge $2 \times$ Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Probenpuffer auf 95°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V für 1,5 Stunden. Anhand eines zusätzlich aufgetragenen Proteinstandards (prestained page ruler, Fermentas) erfolgte die Größenzuordnung der gereinigten Proteine. Die für die SDS-PAGE verwendeten vertikalen Gele waren precast NuPAGE Bis-Tris Gele (ThermoFisher Scientific), die mit dem empfohlenen 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)-Puffer verwendet wurden. Je nach Fragestellung wurden Gradientengele mit ansteigender Polyacrylamidkonzentration (4-12 %) verwendet, oder 10 %-ige Gele ohne Konzentrationsgradienten. Es kamen sowohl Mini (8 cm x 8 cm)- als auch Midi (8 cm x 13 cm)-Gele zum Einsatz, die eine gute Auftrennung von Proteinen in der Größenordnung von 1,5 bis 300 kDa ermöglichten. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte entweder durch Coomassie-Färbung (Kapitel 3.3.5) oder durch Blotten der Gele auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran mit anschließender Immundetektion (Kapitel 3.3.6 und 3.3.7).

3.3.5 Coomassie-Färbung der Gele nach SDS-PAGE

Die Färbung der SDS-Gele mit Coomassie G-250 Brilliant Blue gelingt bei Proteinmengen über $1\text{ }\mu\text{g/Bande}$. Sie ist im Vergleich zur Silberfärbung weniger empfindlich und das Ergebnis liegt deutlich schneller vor. Zum Anfärben der Proteine wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung (SERVA Electrophoresis) leicht erhitzt und anschließend 10-15 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine mehrfache Behandlung mit Entfärberlösung (Kapitel 3.1.7), bis sich die blauen Banden deutlich vor einem klaren Hintergrund abhoben.

3.3.6 Native PAGE

Im Gegensatz zur SDS-PAGE wird die native PAGE dazu verwendet, um native Proteinkomplexe im elektrischen Feld aufzutrennen und dadurch höhere Oligomere oder auch Komplexe nachzuweisen. Bei der im Rahmen der Dissertation eingesetzten blauen (BN)-PAGE wird der Farbstoff Coomassie® G-250 als Lade-Verschiebungsmolekül verwendet. Er bindet an Proteine und verleiht ihnen eine negative Überschussladung, jedoch ohne sie gleichzeitig zu denaturieren. Sie verbleiben in ihrem nativen Zustand. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Komplexe in Richtung Anode und werden entsprechend ihrer Größe bei 4 °C zunächst bei einer konstanten Spannung von 150 V (60 Minuten) und anschließend bei 250 V (60 Minuten) aufgetrennt.

Die für die BN-PAGE verwendeten vertikalen Mini (8 cm x 8 cm)-Gele waren precast NativePAGE™ Novex® Bis-Tris-Gele (ThermoFisher Scientific), die mit dem entsprechenden Puffersystem aus Kathodenpuffer und Laufpuffer verwendet wurden. Es handelte sich um Gradientengele (4-16 %), die eine Auftrennung von Proteinen in der Größenordnung von 30 bis 10.000 kDa ermöglichten. Anhand eines zusätzlich aufgetragenen Proteinstandards (NativeMark™ Unstained, ThermoFisher Scientific) war die Größenzuordnung der Proteine möglich. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie-Färbung (Kapitel 3.3.5), wobei die nativen Gele vor der eigentlichen Färbung 15 Minuten in einer Fixierlösung (40 % Methanol, 10 % Eisessig) inkubiert werden mussten.

3.3.7 Western Blot

Die Methode des *Western Blots* dient dazu Proteine, die zuvor bereits in nativen oder denaturierenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt wurden, auf eine Trägermembran zu übertragen (blotten) und im Anschluss durch Immundetektion (Kapitel 3.3.7) zu visualisieren. Die Übertragung erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel, wodurch die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wandern und an der Oberfläche der PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm) durch hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben. Vor dem Blotten muss die PVDF-Membran kurz in Methanol aktiviert werden, um die Hydrophobie der Membran zu reduzieren. Der Elektrotransfer erfolgte während der Promotionsarbeit als *Semidry-Blot*-Verfahren, indem die PVDF-Membran anodenseitig auf das Gel gelegt und beidseitig mit Filterpapieren bedeckt wurde, die zuvor in Transferpuffern (Kathodenpuffer, Anodenpuffer I und II) inkubiert worden waren.

Anode

3 Whatman-Papiere getränkt mit Anodenpuffer I
3 Whatman-Papiere getränkt mit Anodenpuffer II
PVDF-Membran, äquilibriert mit Anodenpuffer II
Polyacrylamidgel
3 Whatman-Papiere getränkt mit Kathodenpuffer

Kathode

Der Elektrottransfer erfolgte durch Anlegen einer konstanten elektrischen Stromstärke von 273 mA ($2,5 \text{ mA/cm}^2$) über 75 Minuten. Die erfolgreiche Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran ohne Veränderung des Musters der elektrophoretischen Auftrennung, konnte im Anschluss an den Blot durch Anfärben der Proteine mit einer Ponceau S-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (v/v) Essigsäure) überprüft werden. Die Färbung ist reversibel (Auswaschen erfolgte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$), mit einer Immundetektion kompatibel und empfindlicher als eine Coomassie-Färbung (Untergrenze ca. 50 ng/ Bande). Die Trichloressigsäure in der Färbelösung fixierte zudem gleichzeitig die Proteine auf der Membran.

3.3.8 Immundetektion

Nach dem *Western Blot* erfolgte die Immundetektion der auf der Membran gebundenen Proteine. Dafür wurde die Membran zunächst gewaschen und anschließend die freien Proteinbindungsstellen über Nacht maskiert, um die Hintergrundfärbung des Blots während der Immundetektion zu reduzieren. Nach drei Waschschritten erfolgte die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern (Monoklonale IgG-Antikörper gegen PAH und GAPDH), gefolgt von drei weiteren Waschschritten. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Ziege- α -Maus-IgG gekoppelt an HRP) und erneutem Waschen wurde der Blot entwickelt. Hierbei katalysiert der peroxidase markierte, sekundäre Antikörper die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenzreaktion aus. Das freigesetzte Licht wird gemessen (DIANA III imaging system) und quantifiziert. Je nach erwarteter Signalstärke kam entweder das Pierce™ ECL *Western Blotting Substrate* SuperSignal™ oder das sensitivere SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrat nach Angabe des Herstellers zum Einsatz. Die Größenzuordnung der Proteine erfolgte anhand eines Größenstandards, der vor der Detektion mit einem Lumineszenzstift eingefärbt wurde. Die densitometrische Auswertung der Blots wurde mit dem Programm AIDA Image Analyzer durchgeführt. Die nachfolgende Tabelle fasst die einzelnen Schritte der Immundetektion zusammen und zeigt die eingesetzte Verdünnung der jeweiligen Antikörper.

Schritte	Verdünnung	Lösung	Durchgänge	Dauer
Waschen		1x TBS	1x	5 Minuten
Blocken		5 % Milchpulver in TBS-T	1x	16 Stunden
Waschen		1x TBS-T	3x	Je 10 Minuten
Anti-PAH	1:10.000	5 % Milchpulver in TBS-T	1x	90 Minuten
Anti-GAPDH	1:40.000	5 % Milchpulver in TBS-T	1x	90 Minuten
Waschen		1x TBS-T	3x	Je 10 Minuten
Anti-HRP	1:10.000	10 % Milchpulver in TBS-T	1x	60 Minuten
Waschen		1x TBS-T	3x	Je 10 Minuten

Tabelle 21. Ablauf der Immundetektion

3.3.9 Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) dient der Messung von Proteinkonzentrationen in Lösung. Dabei wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 von $E_{465\text{ nm}}$ (rot-violett) ohne Protein, nach $E_{595\text{ nm}}$ (blau) bei der Bindung an basische und aromatische Aminosäuren ausgenutzt. Über die Zunahme der Absorption bei $E_{595\text{ nm}}$ kann die Proteinkonzentration in der Lösung berechnet werden.

Für die praktische Umsetzung wurden 500 μl Bradford Reagenz mit 490 μl Wasser und 10 μl Proteinlösung gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Absorption bei $E_{595\text{ nm}}$ mit einem Spektralphotometer gemessen und aus einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin (BSA) die Proteinkonzentration berechnet werden. Dabei wurde vorausgesetzt, dass der Farbstoff mit beiden Proteinen in gleicher Effizienz wechselwirkt (BSA: $A_{280\text{ nm}}, 0,1\text{ \%} = 0,667$).

3.4 Zellkultur

3.4.1 Transiente Expression in COS-7 Zellen

Die für die eukaryote Expression in Zellkultur eingesetzten Plasmide waren die in Kapitel 3.2.1.3 generierten Konstrukte des *PAH*-Wildtyps und der *PAH*-Variante I65T in pEF DEST51. Die quantitative Plasmidpräparation erfolgte endotoxinfrei als Maxi-Prep aus einer 250 ml Bakterienkultur nach Herstellerangaben (Promega). Für die eukaryote Expression des Wildtyps und der Variante I65T wurden jeweils 2×10^6 COS-7 Zellen mit 2 μg DNA transient transfiziert (Amaxa[®] Nucleofector[®]), in 6-well Flachboden-Kulturplatten ausgesät und für 48 h in RPMI-Medium mit L-Glutamin und 10 % FKS sowie 1 % Antibiotikum kultiviert – wobei nach 24 h ein Mediumwechsel erfolgte. Die Zellkultur der transfizierten COS-7 Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen und die Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2). Zur Untersuchung des Effektes verschiedener Liganden auf das Expressionslevel von Wildtyp und Variante wurden die Liganden in einer finalen Konzentration von 43 μM dem Medium zugegeben und ebenfalls über 48 h inkubiert.

3.4.2 Zellernte und Lyse der transfizierten Zellen

Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen zunächst mikroskopiert, um die Morphologie zu analysieren. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin (1:4 Verdünnung), sowie anschließender Inaktivierung des Trypsins durch RPMI-Medium, geerntet. Durch einen 10 minütigen Zentrifugationsschritt (4 °C, 2.500 UpM) wurden die transfizierten Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zelllyse erfolgte durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen (3x) des Zellpellets im entsprechenden Lysepuffer (20 mM NaHEPES, pH 7.0, 200 mM NaCl, 1% Triton und Complete-Proteinaseinhibitormix). Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (4 °C, 14.000 UpM, 20 Minuten) konnte die Zelldebris pelletiert und der Zellüberstand zur weiteren Analyse abgetrennt werden. Die

Bestimmung der Proteinkonzentration des Zelllysats erfolgte mittels Bradford-Assay (Kapitel 3.3.8). Zur Analyse der Expressionslevels von Wildtyp und Variante I65T wurden jeweils 10 µg des Lysats in einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und die überexprimierte PAH durch Immundetektion (Kapitel 3.3.7) mit einem primären Antikörper gegen PAH nachgewiesen. Die Messung der Zellkulturaktivitäten erfolgte nach einem Protokoll modifiziert nach Martinez *et al.* (Kapitel 3.5.1). Für die Varianzanalyse nach Auswertung von *Western Blot* und PAH-Aktivität wurden alle Werte mit einem *Dunnett's multiple-comparison test* (GraphPad Prism, V 5.0) verglichen, indem die im Komplex mit einem Liganden erhobenen Daten auf das jeweilige Enzym (Wildtyp oder I65T) ohne Ligand bezogen wurden.

3.5 Aktivität und Inhibierung

3.5.1 Aktivitätsassay

3.5.1.1 Aktivitätsassay nach prokaryoter Expression

Der Standardaktivitätsassay zur Messung der PAH-Aktivität der in *E. coli* exprimierten PAH-Proteine erfolgte nach einem Protokoll modifiziert nach Martinez (Martinez *et al.* 1995). Hierzu wurden 0,01 mg/ml der funktionellen MBP-PAH Tetramere für 5 min in einem Puffer (15 mM NaHEPES pH 7,3, 1 mg/ml Katalase, 10 µM Eisenammoniumsulfat) mit 1 mM L-Phenylalanin bei 25 °C präaktiviert. Dann erfolgte der Start der Hydroxylierungsreaktion durch Zugabe von 75 µM BH₄ in einem Assayvolumen von 100 µl. Nach 1 Minute wurde die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure gestoppt und die Enzyme durch Inkubation bei 95 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert. Nach Ablauf des Assays konnten Substrat und Produkt mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) getrennt und die Menge an gebildetem L-Tyrosin (Anregung 275 nm, Emission 305 nm) nachgewiesen werden. Generell handelt es sich bei der HPLC um ein Verfahren, bei welchem eine flüssige, mobile Phase unter hohem Druck (bis zu 250 bar) über eine Säule gepumpt wird, um ein Stoffgemisch in seine einzelnen Komponenten aufzutrennen. Die Trennschärfe ist dabei abhängig von der Laufgeschwindigkeit. Die Auftrennung von L-Phe und L-Tyr erfolgte über eine *reverse Phase* Spherisorb ODS2 Säule (10 µm Porengröße, 4,6 mm X 150 mm) im entsprechenden Laufmittel (Kapitel 3.1.7). Die Quantifizierung der gebildeten Menge an L-Tyr erfolgte durch Berechnung der Peakfläche mit dem Programm Dionex™ Chromeleon™ 6.8. Durch einen Abgleich der errechneten Peakfläche mit einer L-Tyr Standardkurve, die vor Beginn der flüssigchromatographischen Auftrennung der Assayproben aufgenommen wurde, konnte die Menge an gebildetem L-Tyr berechnet werden.

3.5.1.2 Aktivitätsassay nach eukaryoter Expression

Der Standardaktivitätsassay zur Messung der PAH-Aktivität der in Zellkultur exprimierten PAH-Proteine erfolgte analog dem Protokoll für prokaryot exprimierte Proteine mit dem einzigen Unterschied, dass 20 µl Zellysat (Kapitel 3.4.2) im Assay eingesetzt wurden und die Hydroxylierungsreaktion über 60 Minuten ablaufen konnte. Die Menge an gebildetem L-Tyr wurde fluoreszenzspektrophotometrisch nachgewiesen und durch Berechnung der Peakfläche quantifiziert.

3.5.2 Activity Landscape

Der Multiwell Aktivitätsassay des präaktivierten MBP-PAH-Wildtyps (0,01 mg/ml) und die Auswertung der Daten erfolgte analog der entsprechenden Publikationen (Gersting *et al.* 2010, Staudigl *et al.* 2011), mit einer Substratkonzentration im Bereich von 0–4.000 µM und einer BH₄- bzw. 6-MPH₄-Konzentration von 0-500 bzw. 0-1.500 µM. Am Fluoreszenzspektrophotometer (FLUOstar OPTIMA) gemessen wurde der direkte Anstieg der Fluoreszenzintensität durch Bildung von L-Tyr bei 25 °C (Anregung 274 nm, Emission 304 nm). Da BH₄ bzw. 6-MPH₄ das Fluoreszenzsignal im gemessenen Wellenlängenbereich quenchen, wurden die gemessenen Rohdaten durch Anwendung eines Korrekturfaktors, der für jede eingesetzte Ligandenkonzentration neu bestimmt werden musste, angepasst. Die gemessene PAH Aktivität konnte basierend auf zuvor gemessene L-Tyr Standards (0-200 µM) quantifiziert und die Fluoreszenzintensität somit in Enzymaktivitätseinheiten (nmol L-Tyr/min x mg Protein) umgerechnet werden. Die Aktivitätsdaten wurden durch Anwendung einer Michaelis-Menten Kinetik oder basierend auf einem Hill-Kinetikmodell analysiert (GraphPad Prism V5.0). Die bioinformatische Berechnung der *activity landscapes* erfolgte durch Export der Datenmatrix in die freie Programmiersprache R (www.r-project.org), die für statistische Berechnungen und Grafiken verwendet wird. Zur Glättung der *landscape* Oberflächen wurden die Funktionen *interp.loess* (<http://cran.rproject.org/web/packages/tgp/index.html>) des *tgp package* sowie *image.plot* des *fields package* verwendet (<http://cran.r-project.org/web/packages/fields/index.html>). Die bioinformatischen Auswertungen erfolgten durch den Bioinformatiker Mathias Woidy.

3.5.3 Inhibierungsassay

Der Assay zur Analyse des inhibierenden Potentials aller im Rahmen der Dissertation verwendeten Liganden basiert auf dem bereits beschriebenen Standardaktivitätsassay (Martinez *et al.* 1995) zur Messung der PAH-Aktivität der in *E. coli* exprimierten PAH-Proteine (Kapitel 3.5.1). Hierzu wurden 0,01 mg/ml der funktionellen MBP-PAH Tetramere für 5 min in einem Puffer (15 mM NaHEPES pH 7,3, 1 mg/ml Katalase, 10 µM Eisenammoniumsulfat) mit 1 mM L-Phe bei 25 °C präaktiviert. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe der zu analysierenden Liganden in zehn ansteigenden Konzentrationen im Bereich von 25-500 mM. Dann wurde die Hydroxylierungsreaktion durch Zugabe von 75 µM BH₄ in

einem Assayvolumen von insgesamt 100 µl gestartet. Nach 1 Minute Laufzeit bei 25 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure gestoppt und die Enzyme durch Inkubation bei 95 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert. Nach flüssigchromatographischer Trennung von Substrat und Produkt mittels HPLC konnte die Menge an gebildetem L-Tyr (Martinez *et al.* 1995) nachgewiesen werden (Anregung 275 nm, Emission 305 nm). Die Ausbeuten variierten dabei stark in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration. Durch Auftragen der Messpunkte gegen den Logarithmus der Ligandkonzentration und einen exponentiellen Fit der Daten, konnte die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bestimmt werden, bei der eine halbmaximale Inhibierung vorlag. Die Berechnung der Werte für die inhibitorische Konstante K_i (Gleichung 3.2) erfolgte aus den IC_{50} -Werten unter Anwendung der Cheng-Prusoff Gleichung (Cheng and Prusoff 1973).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)} \quad (3.2)$$

K_i	inhibitorische Konstante
IC_{50}	inhibitorische Konzentration
$[S]$	Substratkonzentration
K_M	Michaelis-Menten Konstante

3.6 Spektroskopie

Bei allen im Folgenden beschriebenen spektroskopischen Methoden wurden die gemessenen Spektren gegen die entsprechenden Pufferspektren als Referenz korrigiert. Die Referenzlösungen enthielten jeweils alle Komponenten des Assaypuffers bis auf das Protein. Für jeden Assay wurde jeweils ein frisches Enzymaliquot aus dem Stickstofftank aufgetaut und vor der Verwendung zentrifugiert (14.000 UpM, 15 min, 4 °C), um mögliche Aggregate abzutrennen. Sofern nicht anders angegeben erfolgten alle Messungen bei 25 °C und es wurden stets funktionelle Tetramere der PAH-Enzyme ohne MBP-Fusionspartner (Abspaltung durch Faktor Xa oder TEV-Protease) verwendet.

3.6.1 Intrinsische Fluoreszenz

Elektronen können durch die Absorption eines Lichtquants von ihrem Grundzustand mit niedriger Energie in höher angeregte Zustände angehoben werden. Um wieder in den energetischen Grundzustand zu gelangen, kann das photochemisch angeregte Molekül entweder strahlungslos relaxieren – wobei die Energiedifferenz als Schwingungsenergie (Wärme) abgegeben wird. Alternativ kann ein Lichtquant emittiert werden. Die dabei freiwerdende Energie wird als elektromagnetische Strahlung freigesetzt und kann als Fluoreszenzenergie gemessen werden (Lottspeich and Zorbas 1998). Die durch das

Elektron absorbierte Energie ist dabei stets größer als die emittierte Energie, da es durch strahlungslose Übergänge innerhalb des Systems zum Energieverlust kommt (siehe Jablonski-Termschema). Daher ist die gemessene Fluoreszenzenergie gegenüber der Absorptionsenergie immer in den längerwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums verschoben (Rotverschiebung).

Bei Messungen der intrinsischen Fluoreszenz von Biomolekülen werden die Fluoreszenzeigenschaften von direkt am Molekül vorhandenen Gruppen genutzt. Bei Proteinen handelt es sich um die drei Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin und Phenylalanin, die aufgrund ihres delokalisierten π -Elektronensystems Lichtquanten absorbieren und emittieren können, wobei die Aminosäure Tryptophan das Fluoreszenzverhalten der Proteine bestimmt, denn sie absorbiert die Lichtquanten am stärksten. Zudem kann durch Energietransfer eine Anregung des Tryptophans durch emittierte Lichtquanten von Tyrosin und Phenylalanin erfolgen, da die Tyrosin- und Phenylalanin-Emissionsspektren mit dem Tryptophan-Anregungsspektrum überlappen (Cantor and Schimmel 1980b). Dadurch ergibt sich eine relative Empfindlichkeit für die Fluoreszenz von Trp:Tyr:Phe von 1100:200:8.

Die Absorptionsbande der Tryptophane liegt bei ca. 280 nm. Die Trp-Fluoreszenz kann dann bei Wellenlängen von oberhalb 300 bis 350 nm gemessen werden, wobei das Trp-Emissionsmaximum durch die molekulare Umgebung im Protein beeinflusst wird und eine Abhängigkeit von der Polarität des umgebenden Lösemittels aufzeigt. In polarer Umgebung ist die Trp-Fluoreszenz rotverschoben. Aufgrund dieser Empfindlichkeit gegenüber lokalen Veränderungen wurden Messungen der intrinsischen Trp-Fluoreszenz auch im Rahmen der Dissertation eingesetzt, um Änderungen in der Proteinkonformation – beispielsweise durch Bindung von Liganden – nachzuweisen. Im nativen Protein wird das Emissionsmaximum der Trp-Seitenketten bei einer Wellenlänge von 333 nm gemessen, was der Wellenlänge von freiem Tryptophan in hydrophober Umgebung entspricht. Wird das Protein denaturiert, kommt es zur Exposition der Tryptophanreste und das Emissionsmaximum in wässriger Umgebung kann bei einer längeren Wellenlänge von 353 nm gemessen werden. Zudem nimmt die Fluoreszenzintensität ab, da im denaturierten Zustand aufgrund der Distanz kein Energietransfer von Tyrosinen auf Tryptophane mehr stattfinden kann.

Die Aufnahme der intrinsischen Trp-Emissionsspektren erfolgte an einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrophotometer mit Quarzküvetten in einem Wellenlängenbereich zwischen 300-400 nm (Excitation 295 nm; Spaltbreiten 2,5/5,0 nm), modifiziert nach einem Protokoll von Knappskog *et al.* (Knappskog *et al.* 1996). Die PAH Enzyme wurden im Assay-Puffer (20 mM NaHEPES pH 7.0, 200 mM NaCl, 10 μ M Eisenammoniumsulfat und 2 mM DTT) auf eine Konzentration von 0,6 mg/ml eingestellt und alle Liganden bis auf L-Phe (1 mM) in einer finalen Konzentration von 43 μ M zugegeben. Das Gesamtvolumen jeder Probe waren 120 μ l. Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde die Probe über 2 Minuten bei 25 °C äquilibriert. Die Emissionsmaxima der Spektren wurden durch Annäherung der Kurven an eine Gaussfunktion (Gleichung 3.3) (Rooney and Lee 1986)

$$A = A_0 \cdot \exp \left[\frac{-(\ln 2) 4 (\lambda - \lambda_m)^2}{\omega_\lambda^2} \right] \quad (3.3)$$

- A Peakhöhe bei Wellenlänge λ
 A_0 Peakmaximum
 λ_m Wellenlänge am Peakmaximum
 ω_λ Peakbreite bei halber Höhe

bzw. eine schiefe Normalverteilung (Gleichung 3.4) (Rooney and Lee 1986) berechnet.

$$A = A_0 \cdot \exp \left\{ -(\ln 2) \cdot \left[\frac{\ln \left(1 + 2b (\lambda - \lambda_m) \right)}{\frac{\omega_\lambda}{b}} \right]^2 \right\} \quad (3.4)$$

- A Peakhöhe bei Wellenlänge λ
 A_0 Peakmaximum
b „skew“ parameter, hier 0,41
 λ_m Wellenlänge am Peakmaximum
 ω_λ Peakbreite bei halber Höhe

3.6.2 DSF-Assay

Extrinsische Fluoreszenz wird im Gegensatz zur intrinsischen Fluoreszenz dann gemessen, wenn zusätzliche Moleküle als Fluorophore eingesetzt werden. Im Rahmen der Dissertation kamen die beiden Fluoreszenzfarbstoffe 8-anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS) (Malnasi-Csizmadia *et al.* 1999) und SYPRO® Orange (Niesen *et al.* 2007) als Fluoreszenzsonden zum Einsatz. Beide binden an hydrophobe Bereiche in Proteinen, die bei einem nativ gefalteten Protein normalerweise im hydrophoben Kern des Proteins vom polaren Lösemittel abgeschirmt sind. Nur die hydrophilen Aminosäureseitenketten sind lösemittel exponiert. Im nativen Zustand können somit kaum Farbstoffmoleküle binden und die gemessene Fluoreszenzintensität ist dementsprechend niedrig. Wird das Protein einem ansteigenden Temperaturgradienten ausgesetzt, beginnt es sich zu entfalten und es werden zunehmend hydrophobe Gruppen an der Oberfläche des Proteins exponiert, was eine vermehrte Bindung der Fluoreszenzsonden zur Folge hat und zum Anstieg der messbaren Fluoreszenzintensität und Hydrophobizität führt. Sobald das Protein vollständig entfaltet vorliegt, ist das Fluoreszenzmaximum erreicht und die Intensität nimmt aufgrund einsetzender Aggregationsprozesse wieder ab. Der Umschlagpunkt der gemessenen Fluoreszenzkurve kann als Schmelzpunkt berechnet werden. Aus der Literatur war bereits bekannt (Thorolfsson *et al.* 2002), dass die durch Hitzestress induzierte Entfaltung der PAH in zwei Schritten erfolgt. Zunächst entfalten die vier regulatorischen Domänen bei einer Temperatur

die als erster Umschlagspunkt T_{M1} gemessen werden kann. Bei höheren Temperaturen setzt die Entfaltung zweier katalytischer Domänen ein, zu messen als zweiter Umschlagspunkt T_{M2} , bevor das Protein bei noch höheren Temperaturen vollständig denaturiert. Die Zugabe eines Liganden kann zur Verschiebung der Entfaltungskurve zu höheren Temperaturen und somit zur Stabilisierung des Proteins führen, was in einem Anstieg eines oder beider Schmelzpunkte gemessen werden kann. Hat die Bindung eines Liganden einen destabilisierenden Effekt, nimmt die Temperatur der messbaren Umschlagspunkte ab. Dieser stabilisierende bzw. destabilisierende Einfluss von Liganden auf die Schmelztemperatur von Proteinen wird im *DSF-Assay* bzw. *thermal shift assay* (Pantoliano *et al.* 2001) gemessen. Die Etablierung des DSF-Assays im Rahmen der Dissertation erfolgte sowohl an einem Fluoreszenzspektrophotometer (CARY Eclipse), sowie im Hochdurchsatz an einem Gerät für *Real-Time*-quantitative PCR (Lo *et al.* 2004, Niesen *et al.* 2007), welches zur Identifikation von Liganden (*Hits*) mit einem stabilisierenden Effekt auf den PAH-Wildtyp und ausgewählte Varianten eingesetzt wurde.

DSF-Assay am CARY Eclipse Fluoreszenzspektrophotometer

Die Durchführung des DSF-Assays erfolgte mit PAH-Wildtyp und Varianten, die im Assaypuffer (20 mM NaHEPES pH 7,0, 200 mM NaCl, 10 μ M Eisenammoniumsulfat, 2 mM DTT) auf eine Konzentration von 6 μ M Untereinheit eingestellt wurden. Die zu analysierenden Liganden wurden in einer finalen Konzentration von 43 μ M zugegeben. Das Probenvolumen in jeder Quarzküvette waren 120 μ l. Gemessen wurde die thermische Denaturierung der Enzyme unter Verwendung von ANS (100 μ M) als Fluoreszenzmarker (Excitation 395 nm; Emission 500 nm; Spaltbreiten 5,0/10,0 nm), in einem Temperaturintervall von 25-60 °C, wobei das Erhitzen der Probe in Schritten von 1,2 °C/Min erfolgte. Die Fluoreszenzdaten der thermischen Entfaltung wurden normalisiert und die Berechnung der *unfolded fraction* (Gleichung 3.5) erfolgte nach einer Publikation von Pey *et al.* (Pey *et al.* 2008) im Programm Microsoft Excel.

$$\chi_U = \left[\frac{F - (F_N + m_N \cdot T)}{(F_U + m_U \cdot T) - (F_N + m_N \cdot T)} \right] \quad (3.5)$$

χ_U	unfolded fraction
F	Fluoreszenzwerte zwischen 25-60 °C
T	Temperatur (°C)
F_N	Fluoreszenzwert des nativen Zustandes
F_U	Fluoreszenzwert des entfalteten Zustandes
m_N	Geradensteigung zu Beginn der Entfaltung
m_U	Geradensteigung am Ende der Entfaltung

Alle Schmelzpunkte des PAH-Wildtyps und der Varianten R68S, R261Q und Y417H mit den Liganden BH₄, BH₂, Sepiapterin, 6-MPH₄, 5-benzylhydantoin, 6-amino-5-(benzylamino)-uracil, 5,6-dimethyl-3-(4-methyl-2-pyridinyl)-2-thioxo-2,3-dihydrothieno[2,3-d]pyrimidin-4(1H)-on, 3-amino-2-benzyl-7-nitro-4-(2-quinolyl)-1,2-dihydroisoquinolin-1-on und 4,5-Diaminopyrimidin, wurden durch Annäherung der berechneten *unfolded fraction* an eine im Programm der Statistiksoftware GraphPad Prism 5.0 hinterlegte sigmoidale Boltzmannkurve (Gleichung 3.6) berechnet.

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + \exp\left(\frac{(T_{50} - x)}{m}\right)} \quad (3.6)$$

Wobei sich Gleichung 3.6 mit den Randbedingungen Bottom=0 und Top=1 vereinfachte zu

$$Y = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{(T_{50} - x)}{m}\right)} \quad (3.7)$$

T₅₀ Temperatur bei welcher das Protein zur Hälfte entfaltet vorliegt
m Steigung der Fluoreszenzkurve

Anwendung von Gleichung 3.7 berechnete aus den Fluoreszenzkurven die Umschlagpunkte der Enzyme mit und ohne Liganden, da diese mit den T₅₀-Werten gleichzusetzen sind.

Auswertung der Hydrophobizitätsdaten

Die Bindung des Fluoreszenzmarkers ANS an die im *DSF*-Assay analysierten Proteine, erlaubte neben der Berechnung der Schmelztemperaturen gleichzeitig auch eine Aussage über die Hydrophobizität und damit die Qualität der Faltung im nativen Zustand. Die Berechnung der Hydrophobizität des PAH-Wildtyps und der Varianten ohne und mit Liganden erfolgte durch Berechnung des Mittelwerts aller bei 25 °C gemessenen ANS-Fluoreszenzwerte. Für die Varianzanalyse wurden alle Hydrophobizitätsdaten mit einem *Dunnett's multiple-comparison test* (GraphPad Prism, V5.0) verglichen, indem alle im Komplex mit einem Liganden erhobenen Werte auf das jeweilige Enzym ohne Ligand bezogen wurden.

DSF-Screen an einem Gerät für *Real-Time*-quantitative-PCR

Die Durchführung des *DSF*-Assays am 7900HT *Fast Real-Time* PCR System erfolgte mit PAH-Wildtyp und den drei Varianten I65T, R261Q und Y414C in einer Konzentration von 0,18 mg/ml als Hochdurchsatzscreen im Standard-Assaypuffer (20 mM NaHEPES pH 7,0, 200 mM NaCl, 10 µM Eisenammoniumsulfat, 2 mM DTT). Die zu analysierenden 234 Kandidatensubstanzen wurden in einer finalen Konzentration von 30 µM zugegeben. Das

Probenvolumen waren 50 µl pro Well und gemessen wurde die thermische Denaturierung der Enzyme in einem 96-well Blockmodul unter Verwendung von SYPRO® Orange (1:1000 Verdünnung) als Fluoreszenzmarker (Excitation 492 nm; Emission 610 nm) (Niesen *et al.* 2007) im Temperaturintervall von 20-75 °C. Das Erhitzen der Probe erfolgte in Schritten von 1,0 °C/Min. Die Fluoreszenzdaten der thermischen Entfaltung wurden normalisiert und die Berechnung der beiden Umschlagpunkte T_{M1} und T_{M2} für alle 234 Kandidatensubstanzen erfolgte durch die Statistiksoftware GraphPad Prism 5.0 durch Annäherung der Messwerte an eine im Programm hinterlegte biphasische Funktion (Gleichung 3.8).

$$Y = B + \frac{T - B \cdot \text{Frac}}{\left(1 + 10^{(T_{50_1} - T)^{m_1}}\right)} + \frac{T - B(1 - \text{Frac})}{\left(1 + 10^{(T_{50_2} - T)^{m_2}}\right)} \quad (3.8)$$

B	Kurvenabschnitt zu Beginn der Messung ohne Steigung (bei Y_{Min})
T	Kurvenabschnitt am Ende der Messung ohne Steigung (bei Y_{Max})
T_{50_1}	Temperatur bei welcher regulatorische Domänen zur Hälfte entfaltet vorliegen (T_{M1})
T_{50_2}	Temperatur bei welcher katalytische Domänen zur Hälfte entfaltet vorliegen (T_{M2})
T	gemessene Temperatur (°C)
m_1	Steigung des ersten Kurvenabschnitts
m_2	Steigung des zweiten Kurvenabschnitts
Frac	ein vom Programm errechneter Wert zwischen 0-1 je nach Kurvenverlauf

Die knapp 2.000 berechneten T_{M1} und T_{M2} -Werte für den PAH-Wildtyp und die Varianten mit allen 234 Kandidatensubstanzen wurden in Microsoft Excel gelistet und ihr Effekt (ΔT_M) nach einem Farbcode markiert. Grün hinterlegte Werte stehen für eine Stabilisierung der Enzyme durch den Liganden, rote Bereiche zeigen den gegenteiligen Effekt und verursachten eine Destabilisierung. Je heller die Grün- bzw. Rotfärbung dabei ist, umso stärker ist die stabilisierende bzw. destabilisierende Wirkung.

Bioinformatische Auswertung des DSF-Screens

Neben der Berechnung der T_M -Werte erfolgte auch eine bioinformatische Analyse des Screendatensatzes durch den Bioinformatiker Mathias Woidy. Dazu wurde für jeden Liganden anhand der ΔT_M -Werte berechnet wie stark er sich von den anderen Liganden unterscheidet und das Ergebnis in einer Distanzmatrix niedergeschrieben. Anhand dieser Distanzmatrix wurden die Liganden in Cluster zusammengefasst, indem ähnliche Liganden in den gleichen Zweig sortiert wurden. Das wird so lange wiederholt, bis für jeden Liganden die optimale Position in den Zweigen gefunden worden ist. Dabei gilt, je tiefer die Verzweigungen sind, desto größer die Distanz der Liganden in der vorher berechneten Distanzmatrix. Die Gruppierung der Liganden wurde willkürlich auf 6 Gruppen festgelegt. Um zu verdeutlichen, in was sich die 6 Gruppen unterscheiden, wurden Boxplots in Abhängigkeit

der ΔT_M -Werte für den PAH-Wildtyp und die Varianten angelegt (Kapitel 4.9.4.3). Zudem wurden Struktur- und Effekt-Analysen für alle 234 Liganden durchgeführt, indem die Liganden hinsichtlich ihres Grundgerüsts in verschiedene Gruppen eingeteilt und deren Wirkung auf die Enzyme analysiert wurde.

3.6.3 ANS-Fluoreszenz-Kinetiken

Neben der thermischen Denaturierung der PAH unter Verwendung von ANS als Fluoreszenzmarker, wurden im Rahmen der Dissertation auch zeitabhängige ANS-Fluoreszenzkurven bei konstanter Temperatur gemessen. Aus den Daten konnten kinetische und thermodynamische Parameter des Entfaltungsprozesses berechnet werden. Für die Messungen der Entfaltungskinetiken des PAH-Wildtyps und der Varianten R68S, R261Q und Y417H wurden unterschiedliche Temperaturen ausgewählt, von welchen aus den vorangegangenen thermischen Entfaltungsexperimenten (Kapitel 4.2.4) bekannt war, dass sie deutlich unterhalb der Temperatur liegen, bei der die PAH im hitzedenaturierten Zustand irreversibel aggregiert. Denn das würde eine anschließende thermodynamische Auswertung der Entfaltungskinetiken unmöglich machen. Die Messungen der zeitabhängigen Denaturierungen bei konstanten Temperaturen (41,5; 43,0; 44,5; 46,0 und 47,5 °C für den PAH-Wildtyp und R68S; 38,0; 40,0; 42,0; 44,0 und 46,0 °C für R261Q und Y417H) erfolgten am CARY Eclipse Spektrophotometer unter Verwendung des Fluoreszenzmarkers ANS in einer finalen Konzentration von 100 μM (Anregung 395 nm, Emission 500 nm, Spaltbreiten 5,0/10,0 nm). Hierzu wurden die zu untersuchenden Enzyme im Assaypuffer (20 mM HEPES pH 7,0, 200 mM NaCl, 10 μM Eisenammoniumsulfat, 2 mM DTT) auf eine Konzentration von 0,6 mg/ml verdünnt und die entsprechenden Liganden in einer finalen Konzentration von 43 μM zugegeben. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante k für jede Messtemperatur (GraphPad Prism 5.0), erfolgte durch Annäherung der gemessenen Kinetiken an eine Exponentialfunktion erster Ordnung (Gleichung 3.9).

$$Y = Y_0 + (Plateau - Y_0) \cdot (1 - e^{(-kx)}) \quad (3.9)$$

Y	gemessene Fluoreszenzintensität
Y_0	Y-Ausgangswert zu Beginn der Messung ($x=0$)
x	Zeitabhängigkeit
k	Geschwindigkeitskonstante
Plateau	Phase mit gleichbleibender Fluoreszenzintensität ($\Delta Y=0$)

Durch Auftragen des natürlichen Logarithmus der berechneten Geschwindigkeitskonstanten ($\ln k$) gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur in Kelvin ($1/K$), konnten die exponentiell vom Kehrwert der Temperatur abhängigen Werte in einem Arrhenius-Plot auf einer Geraden abgebildet werden. Durch Anwendung der Arrhenius-Gleichung (Gleichung 3.10)

$$k = A \cdot e^{\left(\frac{-E_A}{RT}\right)} \quad (3.10)$$

k	Geschwindigkeitskonstante
A	präexponentieller Faktor (Arrheniusfaktor)
E_A	Aktivierungsenergie
R	universelle Gaskonstante (8,314 J/(molK))
T	Temperatur in Kelvin

konnte aus der Steigung der Arrhenius-Geraden m multipliziert mit der universellen Gaskonstante R , die Aktivierungsenergie E_A für den Übergang der Enzyme aus dem nativen in den entfalteten Zustand berechnet werden (Gleichung 3.11).

$$E_A = -m \cdot R \quad (3.11)$$

Die Berechnung der drei thermodynamischen Größen von Gibbs-Energie $\Delta G^\#$, Reaktionsenthalpie $\Delta H^\#$ und Reaktionsentropie $\Delta S^\#$ konnte nur unter der Annahme erfolgen, dass die Entfaltung der PAH in kleinsten Schritten erfolgt, die als solche reversibel sind und die beobachtbaren Prozesse während der Entfaltung miteinander im Gleichgewicht stehen. Die Berechnung erfolgte nach der Eyring Theorie des Übergangszustandes aus der statistischen Thermodynamik und unter Anwendung der Gibbs-Helmholtz-Gleichung.

$$\Delta G^\# = RT \left(\frac{\ln k_B}{h} + \ln T - \ln k \right) \quad (3.12)$$

R	universelle Gaskonstante (8,314 J/(molK))
T	Temperatur in Kelvin
k_B	Boltzmann-Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K)
h	Planck'sche Konstante ($6,62 \cdot 10^{-34}$ Js)
k	Geschwindigkeitskonstante

$$\Delta H^\# = E_A - RT \quad (3.13)$$

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T \Delta S^\# \quad (3.14)$$

3.6.4 CD-Spektroskopie

Alle Proteine besitzen einen bestimmten Anteil an optisch aktiven Aminosäuren bzw. asymmetrischen Kohlenstoffatomen und enthalten zudem Sekundärstrukturelemente, die zirkular polarisiertes Licht gleicher Wellenlänge unterschiedlich stark absorbieren können. Somit zählen auch Proteine zur Gruppe optisch aktiver Moleküle, die mittels CD-Spektroskopie analysiert werden können, da sie eine links- und rechts-zirkular polarisierte Lichtwelle unterschiedlich stark absorbieren. Je nach analysiertem Wellenlängenbereich unterscheidet man in der CD-Spektroskopie zwei Regionen; der Spektralbereich zwischen 250 nm und 350 nm beschreibt die Nah-UV-Region, in welchem asymmetrisch angeordnete aromatische Aminosäuren (Phe, Trp und Tyr) für das CD-Signal verantwortlich sind - wobei die asymmetrische Umgebung der Aminosäuren von der Tertiärstruktur des Proteins abhängig ist. Der Spektralbereich zwischen 170 und 250 nm wird als Fern-UV Region bezeichnet, in welchem die Konformation der Polypeptidkette (Amidregion) ein charakteristisches CD-Signal erzeugt. α -helikale Sekundärstrukturelemente sind im CD-Spektrum der Fern-UV Region für zwei benachbarte Minima bei 208 nm und 222 nm verantwortlich. β -Faltblattstrukturen zeigen dagegen ein weniger deutlich ausgeprägtes CD-Signal mit einem einzigen Minimum bei 218 nm. Im Rahmen der Dissertation wurde die Fern-UV-CD-Spektroskopie dazu genutzt die vorherrschenden Proteinsekundärstrukturelemente des PAH-Wildtyps zu analysieren. Als quantitatives Maß für die Ausprägung an Struktur wurde die Elliptizität θ in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ im CD-Spektrum aufgezeichnet, indem die Differenz der unterschiedlichen Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht gemessen wurde (Lottspeich and Zorbas 1998). Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde die molare Elliptizität $[\theta_{222}]$ berechnet, also die Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren (Gleichung 3.15).

$$[\theta_{222}] = \frac{\theta_{222}}{(c \cdot d \cdot 10)} \quad (3.15)$$

$[\theta_{222}]$ Molare Elliptizität

θ_{222} Gemessener Wert für die Elliptizität bei einer Wellenlänge von 222 nm

c Konzentration des Proteins in wässriger Lösung (Mol/L)

d Schichtdicke der Küvette (cm)

Um die molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\theta_{\text{mittlere}}]$ zu berechnen (Gleichung 3.16), wird die molare Elliptizität $[\theta_{222}]$ durch die Anzahl der Aminosäuren geteilt.

$$[\theta_{\text{mittlere}}] = \frac{[\theta_{222}]}{452} \quad (3.16)$$

Die Berechnung der molaren Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta_{\text{mittlere}}]$ war die Voraussetzung um den α -helikalen Anteil (F_{Helix}) für den PAH-Wildtyp in Prozent zu berechnen (Gleichung 3.17).

$$F_{\text{Helix}} = \frac{[\theta_{\text{mittlere}}] - [\theta_{222}]_{\text{coil}}}{[\theta_{222}]_{\text{helix}} - [\theta_{222}]_{\text{coil}}} \quad (3.17)$$

Mit

$$[\theta_{222}]_{\text{helix}} = -40.000 \cdot \left(1 - \frac{2,5}{N}\right) + 100 \cdot T \quad (3.18)$$

$$[\theta_{222}]_{\text{coil}} = 640 - 45 \cdot T \quad (3.19)$$

N Anzahl der Aminosäuren pro PAH Untereinheit (452)

T Assaytemperatur in °C

Die Fern-UV-CD-Messungen des PAH-Wildtyps wurden in 20 mM Kaliumphosphatpuffer mit einer Proteinkonzentration von 0,26 mg/ml bei einer konstanten Temperatur von 25 °C und einem Intervall von 0,1 nm durchgeführt.

3.6.5 DLS-Messungen

Grundlage der DLS-Messung ist die Streuung von kohärentem und monochromatischem Licht eines Lasers an Partikeln in Lösung. Während kleine Moleküle das Licht in alle Richtungen gleichmäßig streuen, erzeugen Teilchen, deren Größe der Wellenlänge des einfallenden Lichtes entspricht, ein charakteristisches Interferenzmuster. In Abhängigkeit der eingesetzten Wellenlänge des Lasers und der Teilchengröße zeigt das Muster helle Bereiche konstruktiver Interferenz und dunkle Bereiche negativer Interferenz auf. Die dynamische Lichtstreuung misst die zeitabhängige Intensitätsschwankung des gestreuten Lichtes, denn das Streumuster ändert sich zeitabhängig je nachdem welche Positionen die einzelnen Teilchen gemäß ihrer Brown'schen Molekularbewegung gerade einnehmen. In Abhängigkeit von der Viskosität des Lösemittels führen kleinere Teilchen dabei zu stärkeren Fluktuationen als größere Partikel. Die zeitabhängige Intensität des gestreuten Lichtes wird für die Berechnung der zeitabhängigen Intensitäts-Autokorrelationsfunktion verwendet, woraus wiederum ein translationaler Diffusionskoeffizient D_T der Nanopartikel berechnet werden kann. Dieser steht über die Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 3.20) mit dem hydrodynamischen Radius R_H im Zusammenhang.

$$D_T = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (3.20)$$

k_B	Boltzmann-Konstante
T	absolute Temperatur in Kelvin
η	Viskosität des Lösemittels

Neben dem hydrodynamischen Radius kann aus dem translationalen Diffusionskoeffizienten auch die Größenverteilung (Polydispersität) unterschiedlicher Teilchen in der Lösung berechnet werden. Die Grenze der Auflösung ist dann erreicht, wenn sich zwei Teilchen in weniger als zwei hydrodynamischen Radien unterscheiden. Dann werden die Teilchen nicht mehr als zwei getrennte Peaks abgebildet, sondern erscheinen als einzelner Peak, der zwischen den beiden zu erwartenden Peaks positioniert ist. Das Molekulargewicht M_w des Proteins kann basierend auf dem globulären Standard-Auswertemodus ausgehend vom hydrodynamischen Radius berechnet werden. Bei dieser Methode wurde aus einer größeren Anzahl an gut charakterisierten, globulären Proteinen ein empirischer Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht und dem hydrodynamischen Radius hergestellt.

Alle DLS Experimente wurden am DynaPro NanoStar bei 25 °C in Polyäthylen-Copolymer Einwegküvetten (Wyatt) mit einem Gesamtvolumen von 4 μ l durchgeführt. Die Proteine wurden dazu im entsprechenden Assaypuffer (20 mM HEPES pH 7.0; 200 mM NaCl) auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und die Liganden in einer finalen Konzentration von 43 μ M zugegeben. Die DLS-Messung von 3-amino-2-benzyl-7-nitro-4-(2-quinolyl)-1,2-dihydroisoquinolin-1-on war nicht möglich, da die orange Färbung der Lösung selbst in niedrigsten Konzentrationen die Messung störte. Die Analyse der Daten erfolgte durch Berechnung von hydrodynamischem Radius und Polydispersität mit dem Softwareprogramm Dynamics 7.1.9. Für die Varianzanalyse wurden alle DLS-Daten mit einem *Dunnett's multiple-comparison test* (GraphPad Prism, V 5.0) verglichen, indem alle im Komplex mit einem Liganden erhobenen Werte auf das jeweilige Enzym ohne Ligand bezogen wurden.

3.7 MST-Messungen

Die Mikroskalierte Thermophorese ist eine Methode um Wechselwirkungen zwischen Molekülen in Lösung zu analysieren (Duhr and Braun 2006, Seidel *et al.* 2012). Sie basiert auf dem physikalischen Prinzip der Thermophorese, welche die gerichtete Bewegung von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten (Thermophorese) untersucht. Die Bewegung der Teilchen ist dabei abhängig von ihrer molekularen Größe, ihrer Hydrationshülle und ihrer Ladung. Die Komplexbildung zwischen beispielsweise Enzym und Ligand führt zur Änderung von mindestens einem der genannten Parameter, wodurch sich die Thermophorese des Komplexes von der Thermophorese der Einzelmoleküle unterscheidet. Während der MST-Messung wird das veränderte Thermophorese-Verhalten des Zielkomplexes durch Titration des unmarkierten Bindungspartners aufgezeichnet und aus den resultierenden Thermophoresekurven kann die quantitative Bestimmung der Bindungsparameter der Interaktion berechnet werden. Der erforderliche lokale Temperaturgradient wird dabei durch einen Infrarotlaser erzeugt. Die Bewegung der Teilchen kann durch kovalent gebundene

Farbstoffe, fluoreszierende Bindungspartner oder intrinsische Tryptophanfluoreszenz (*label-free*) detektiert und quantifiziert werden. Vorteile der Methode sind die geringen Mengen an gereinigtem Protein, die trotzdem eine hohe Sensitivität gewährleisten und die Tatsache, dass eine Analyse der Bindungsparameter auch ohne Kopplung der Moleküle auf eine Oberfläche möglich ist.

Durchgeführt wurden die MST-Messungen an einem Monolith™ NT.115 in den Laboren der Firma NanoTemper Technologies GmbH in München. Der PAH-Wildtyp wurde für die MST-Messung mit einem Fluoreszenzfarbstoff nach Herstellerangabe markiert (NT™-647-NHS), der als NHS-Ester an Aminogruppen im Protein bindet (z.B. über Lysinseitenketten). Ein erfolgreiches Labeling wurde umgehend durch Messung der Labelingeffizienz bestätigt. Alle zu testenden Liganden wurden anschließend in 16 unterschiedlichen Verdünnungen (20 mM HEPES pH 7.0, 200 mM NaCl, 0,05 % Tween, 5 mM DTT) in einem Konzentrationsbereich von 0,0153 μ M bis 500 μ M zum Wildtypenzym pipettiert und in *premium coated* Kapillaren aufgezogen. Nach einer fünf minütigen Inkubation der gefüllten Kapillaren bei 25 °C unter Zugabe von Glucose-Oxidase als Oxidationsschutz, wurde die MST-Messung gestartet (LED-Power 20 %; MST Laser-Power 40 %; Anregung 625 nm; Emission 680 nm) und die Thermophoresekurve bestehend aus einer Grundlinienmessung im Ruhezustand (5 Sekunden), einer Erhitzungsphase (30 Sekunden) und einer abschließenden Relaxationsphase (5 Sekunden), aufgezeichnet. Durch plotten der Messdaten gegen den Logarithmus der Einzelkonzentrationen resultierte eine sigmoidale Bindungskurve, aus welcher die Dissoziationskonstante K_D mittels NanoTemper Analysis Software v.1.5.49 berechnet werden konnte (Baaske *et al.* 2010, Wienken *et al.* 2010).

3.8 Molecular Modeling

Um die Wechselwirkungen von BH_4 , BH_2 , Sepiapterin, 6-MPH₄, 4,5-Diaminopyrimidin und der Liganden 1-4 (Kapitel 4.6) mit dem aktiven Zentrum der PAH zu vergleichen, wurden entsprechende Bindungsstudien der Liganden an beschriebenen Kristallstrukturen der katalytischen Domäne der PAH im Komplex mit BH_4 (PDB Code 1j8u (Andersen *et al.* 2001)) sowie der oxidierten Form des Kofaktors BH_2 (PDB Code 1dmw (Erlandsen *et al.* 2000)) unter Verwendung der Software GOLD Version 5.1 (Jones and Willett 1995, Jones *et al.* 1997) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung von *PAH*-Wildtyp und ausgewählten *PAH*-Varianten

Das erste Ziel der Dissertation war die Klonierung des für die funktionelle PAH kodierenden Genabschnitts des Wildtyps und ausgewählter *PAH*-Mutationen in geeignete Vektoren, die eine Expression sowohl im prokaryoten sowie eukaryoten System erlauben. Die neben dem Wildtyp für eine Charakterisierung ausgewählter Mutationen waren I65T und R68S aus der regulatorischen Domäne, R261Q aus der katalytischen Domäne und Y414C sowie Y417H aus der Oligomerisierungsdomäne. Alle Varianten sind BH₄ responsiv, verteilen sich über alle drei Domänen des Enzyms und sind aus klinischer Sicht relevant.

Die Klonierung aller Konstrukte erfolgte unter Einsatz des *Gateway*[®]-Systems, denn die Rekombinations-Klonierungstechnologie verspricht eine deutlich höhere Effizienz im Vergleich zum traditionellen Klonieren auf Basis von Restriktionsendonukleasen. Zudem ermöglichen die zunächst erzeugten *Entry Clones* bei Bedarf stets einen einfachen Wechsel des Expressionssystems. Nach Ableitung von für das *Gateway*[®]-System geeigneten PCR-Primern für den *PAH*-Wildtyp, erfolgte die Durchführung der *Gateway*-PCR zur Generierung der *attB*-Sites flankierten cDNA des Wildtyps (Kapitel 3.2.1.1). Die Klonierung des *PAH*-Wildtyp *Entry Clones* erfolgte durch Rekombination des *attB*-PCR-Produkts mit dem Donor-Vektor pDONRTM221 (Kapitel 3.2.1.2). Ein nach analytischem Restriktionsverdau positiver *Entry Clone* des Wildtyps wurde abschließend durch eine Sequenzierung überprüft und diente im Weiteren als Matrize für die mutagenisierende PCR zur Generierung der fünf *PAH*-Varianten I65T, R68S, R261Q, Y414C und Y417H. Alle fünf *PAH*-Varianten konnte nach Ableitung der entsprechenden mutagenisierenden Primer, in welchen jeweils ein Nucleotid gezielt verändert wurde um für die entsprechend ausgetauschte Aminosäure zu kodieren, durch gezielte Punktmutation im *PAH*-Wildtyp-Gen mittels ortsspezifischer Mutagenese generiert werden (Kapitel 3.2.2). Die Klonierung der finalen Expressionskonstrukte erfolgte durch eine LR-Rekombinationsreaktion (Kapitel 3.2.1.3).

<i>PAH</i> cDNA	Vektor	Tag	Expressionssystem
Wildtyp	pDONR TM 221	-	prokaryot
Wildtyp	pMAL-c2X DEST	MBP	prokaryot
Wildtyp	pEF-DEST51	His (6x), V5	eukaryot
I65T	pMAL-c2X DEST	MBP	prokaryot
I65T	pEF-DEST51	His (6x), V5	eukaryot
R68S	pMAL-c2X DEST	MBP	prokaryot
R261Q	pMAL-c2X DEST	MBP	prokaryot
Y414C	pMAL-c2X DEST	MBP	prokaryot
Y417H	pMAL-c2X DEST	MBP	prokaryot

Tabelle 22. Klonierte Konstrukte während der Promotionsarbeit

Als Zielvektoren dienten der für die prokaryote Expression einsetzbare pMAL-c2X DEST Vektor, der für ein N-terminales MBP kodiert, sowie der konventionell zu erwerbende Gateway[®] pEF-DEST51 Vektor, der C-terminal über einen His-Tag und ein V5-Epitop verfügt und zudem eine Expression in Zellkultur ermöglicht. Die PAH Varianten I65T, R68S, R261Q, Y414C und Y417H wurden durch LR-Reaktion als pMAL-c2X Expressionskonstrukte für die Expression in *E. coli* generiert, während die Variante I65T gleichzeitig in den pEF-DEST51 Vektor kloniert wurde, um eine Expression in Zellkultur zu ermöglichen. Der PAH-Wildtyp wurde als Kontrolle in beide Expressionsvektoren kloniert. Tabelle 22 stellt die generierten Konstrukte in einer Übersicht dar.

4.2 Biophysikalische Charakterisierung des PAH-Wildtyps

4.2.1 Der PAH-Wildtyp lässt sich als stabiles Tetramer aufreinigen

Vor der quantitativen Aufreinigung (2 L Kultur) des MBP-PAH Wildtyps aus BL21(DE3)-Zellen wurde ein Expressionstest im kleinen Maßstab (25 ml Kultur) durchgeführt, um die Löslichkeit des Fusionsproteins zu überprüfen. Nach 20 stündiger Inkubationszeit bei 28 °C wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und der Zellüberstand über ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel analysiert. Die überexprimierte Bande des Wildtyp-Fusionsproteins konnte bei ca. 96 kDa gut nachgewiesen werden, was zeigte, dass die Expressionsbedingungen bei 28 °C über Nacht gut gewählt waren, um eine ausreichende Menge an Fusionsprotein in der löslichen Fraktion anzureichern.

Daher erfolgte die Anzucht der Hauptkultur für eine quantitative Reinigung der PAH unter den gleichen Bedingungen. Die 2 L Kultur wurde über 20 h inkubiert und das MBP-PAH Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über eine Amylosesäule angereichert. Die Analyse der Oligomerisierung erfolgte durch eine anschließende (Abbildung 9A) Gelfiltrationschromatographie. Eine vorausgegangene Kalibrierung der Gelfiltrationssäule erlaubte eine näherungsweise Bestimmung der Größe des MBP-PAH Tetramers. Das Peakmaximum bei einem Elutionsvolumen von 146 ml entsprach einer Proteingröße von ca. 550 kDa. Dieser Wert war größer als der erwartete Wert von ca. 400 kDa. Mit Hilfe eines anschließenden nativen Gels einschließlich Aktivitätsassay konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem Hauptpeak der Gelfiltration um funktionelle Tetramere der PAH handelte. Die Fraktionen der MBP-PAH Tetramere des Wildtyps wurden nach der ersten Gelfiltrationschromatographie für 16 h mit Faktor Xa inkubiert, um den MBP-Fusionspartner abzuspalten. Der Nachweis der erfolgreichen Spaltung sowie die Abtrennung des MBP erfolgte über eine zweite Gelfiltration (Abbildung 9B). Die geschnittenen PAH-Tetramere wurden nach 71 ml eluiert. Aufgrund der vorangegangenen Kalibrierung der Säule konnte dieses Elutionsvolumen einer Größe von 290 kDa zugeordnet werden. Dieser Wert lag über dem berechneten Wert von 210 kDa. Durch ein natives Gel sowie einen anschließenden PAH-Enzymaktivitätsassay konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Eluat um funktionelle Tetramere der PAH handelte. Das Eluat der geschnittenen PAH-Tetramere

wurde gepoolt, aufkonzentriert und die Konzentration der Probe spektrophotometrisch bestimmt. Das Konzentrat wurde nach der Reinigung umgehend aliquotiert und die einzelnen Aliquots bis zu ihrer Verwendung in Flüssigstickstoff gelagert. Alle Schritte der Aufreinigung wurden abschließend in einem SDS-Gel dokumentiert (Abbildung 9C).

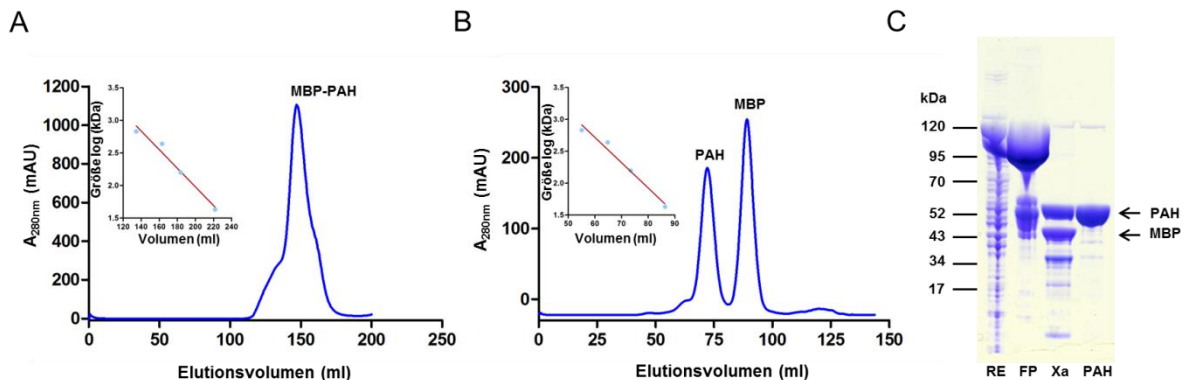


Abbildung 9. Oligomerisierungsprofile des PAH-Wildtyps und SDS-PAGE

(A) Gelfiltrationschromatographie des Wildtyp MBP-PAH Fusionsproteins. Die kleine eingefügte Abbildung zeigt die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 200 pg) mit den Proteinen Thyroglobulin, Ferritin, Aldolase und Ovalbumin einschließlich der Kalibrierungsgeraden (rote Linie). (B) Größenchromatografische Auftrennung der PAH-Tetramere und des abgespaltenen MBP-Fusionspartners. Die kleine eingefügte Abbildung zeigt die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg) mit den vier Proteinen Thyroglobulin, Ferritin, Aldolase und Ovalbumin einschließlich der Kalibrierungsgeraden (rote Linie). (C) Das SDS-Gel dokumentiert die einzelnen Schritte der Aufreinigung des PAH Wildtyps. In der ersten Spalte des Gels wurde der nach Aufschluss der Zellen und Zentrifugation erhaltene Rohextrakt (RE) aufgetragen. Die zweite Spalte zeigt das nach der ersten Gelfiltrationssäule isolierte Tetramer des Fusionsproteins (FP), das im SDS-Gel als Monomer bei einer Größe von ca. 95 Kilodalton (kDa) detektierbar ist. In der dritten Spalte wurde der Schneideansatz nach 16 stündiger Inkubationszeit mit Faktor Xa aufgetragen (Xa). Die obere Bande entspricht dem PAH Monomer bei ca. 52 kDa, die untere Bande dem abgespaltenen MBP-Fusionspartner bei 43 kDa. In der vierten Spalte wurde ein Aliquot aus dem Tetramerpool nach der zweiten Gelfiltrationssäule aufgetragen (PAH).

4.2.2 Die Enzymaktivität wird von Substrat- und Kofaktorkonzentration bestimmt

Nach erfolgreicher Reinigung des PAH-Wildtyps wurde die Enzymaktivität des funktionellen Tetramers bestimmt. Stand der Wissenschaft war zu Beginn der Promotionsarbeit die Bestimmung der Aktivität rekombinanter PAH durch ein diskontinuierliches Messverfahren. Dabei wurde die Enzymaktivität entweder bei verschiedenen Phenylalaninkonzentrationen und einer Standard-BH₄-Konzentration (75 µM) oder variierenden BH₄-Konzentrationen bei einer Standard-Phenylalaninkonzentration (1 mM) gemessen. Nach Ablauf des Assays mussten Substrat und Produkt flüssigchromatographisch getrennt und die Menge an L-Tyrosin fluoreszenzspektrophotometrisch bestimmt werden (Kapitel 3.5.1.1). Nachteile dieser Methode waren der eingeschränkte Bereich an einsetzbaren Substrat- und Kofaktorkonzentrationen, sowie ein hoher methodischer und zeitlicher Aufwand. In den Jahren 2010 und 2011 gelang es unserer Arbeitsgruppe einen neuen Test zur Bestimmung der Enzymaktivität der PAH zu entwickeln (Gersting *et al.* 2010, Staudigl *et al.* 2011), der inzwischen weitverbreitet im Einsatz ist. Es handelt sich um einen fluoreszenzbasierten Hochdurchsatzassay, der die direkte und kontinuierliche Messung der Enzymaktivität der

PAH ermöglicht und zudem den Konzentrationsbereich an gleichzeitig einsetzbaren und variierbaren Substrat- und Kofaktorkonzentrationen um ein 4-faches erweitert, um so den optimalen Arbeitsbereich des Enzyms zu bestimmen. Die Enzymaktivität kann als dreidimensionaler PAH *activity landscape* dargestellt werden, was eine Anwendung der im Labor generierten Daten im klinischen Umfeld erleichtert. Anhand der *landscapes* lässt sich gut ablesen, bei welcher L-Phenylalanin- bzw. BH₄-Konzentration die optimale Enzymaktivität einer spezifischen Mutante erreicht werden kann und in welcher Dosierung das Pharmakon dementsprechend eingesetzt werden muss.

Die Enzymaktivität des unter 4.2.1 gereinigten PAH-Wildtyps wurde durch den neu entwickelten fluoreszenzbasierten Hochdurchsatzassay in Abhängigkeit von zunehmenden Konzentrationen an Substrat und Kofaktor gemessen und als dreidimensionaler PAH *activity landscape* dargestellt (Abbildung 10). Phenylalanin wurde dabei in einem Konzentrationsbereich von 0 - 4.000 µM eingesetzt, bei BH₄ lagen die verwendeten Konzentrationen aufgrund der höheren Affinität deutlich niedriger (0 - 500 µM). Die Durchführung des Assays einschließlich Datenanalyse erfolgte analog der 2011 publizierten Methode (Staudigl *et al.* 2011). Die höchste Aktivität (9.106 nmol L-Tyr/min x mg Protein), erreichte die PAH bei einer Phenylalaninkonzentration von 662 µM und einer BH₄-Konzentration von 132 µM. Wie bereits aus der Literatur bekannt, zeigten auch die Daten des PAH *activity landscapes* die Inhibierung des Enzyms durch hohe Konzentrationen an Substrat (Pey and Martinez 2005) und Kofaktor (Staudigl *et al.* 2011).

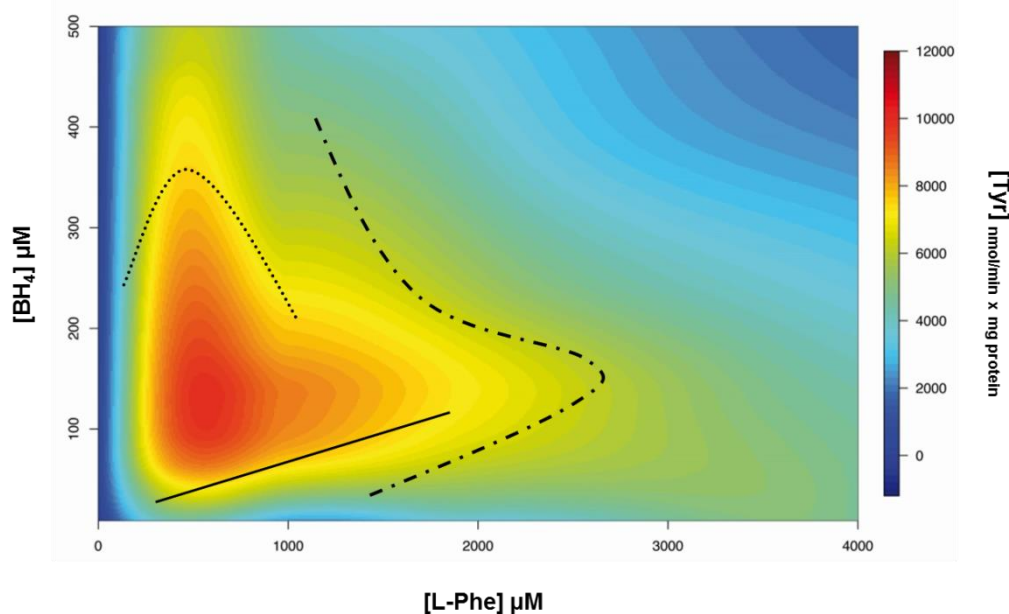


Abbildung 10. Activity landscape des PAH-Wildtyps mit BH₄ und L-Phe

Die Daten für die Aktivität des PAH-Wildtyps wurden bei unterschiedlichen L-Phenylalanin- und BH₄-Konzentrationen gemessen, interpoliert und die Aktivität farbkodiert als *activity landscape* dargestellt. Die gepunktete Linie symbolisiert K_i für die Kofaktorinhibierung bei variierenden Substratkonzentrationen. Die durch Strichpunkte dargestellte Linie zeigt K_i für die Substratinhibierung bei ansteigenden BH₄-Konzentrationen. Die durchgezogene Linie macht deutlich, dass mit zunehmenden Phenylalaninkonzentrationen mehr BH₄ notwendig ist, um die gleiche Enzymaktivität aufrecht zu erhalten.

4.2.3 Das CD-Spektrum des Wildtyps weist auf α -helikale Sekundärstrukturelemente hin

Im Rahmen der Dissertation wurde die UV-CD-Spektroskopie dazu genutzt, die vorherrschenden Proteinsekundärstrukturelemente des PAH-Wildtyps zu analysieren. Dazu wurde der Spektralbereich von 190 bis 260 nm aufgezeichnet (Abbildung 11), in dem die $n \rightarrow \pi^*$ - und $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Peptidbindung liegen, deren Absorption im CD-Spektrum charakteristisch ist.

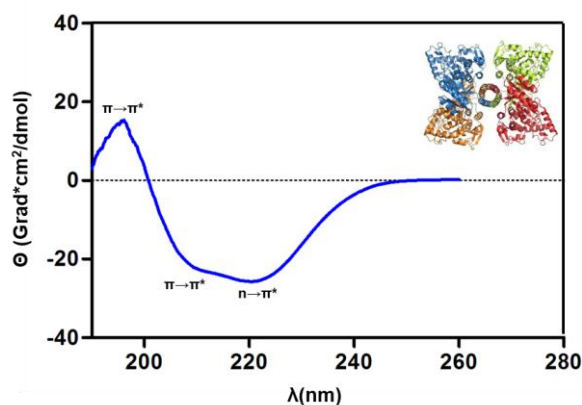


Abbildung 11. UV-CD-Spektrum des PAH-Wildtyps

Aufgetragen wurde die Elliptizität θ gegen den Wellenlängenbereich von 190 bis 260 nm. Das CD-Spektrum zeigt mit zwei negativen und einer positiven CD-Bande die drei charakteristischen Übergänge eines α -helikalen Peptids.

Das CD-Spektrum des PAH-Wildtyps zeigt die charakteristischen Merkmale eines α -helikalen Peptids mit einer negativen CD-Bande bei $\lambda=222$ nm, die einem $n \rightarrow \pi^*$ Übergang entspricht, sowie eine zweite negative CD-Bande bei $\lambda=207$ nm und eine positive Bande bei $\lambda=192$ nm, die beide dem Carbonyl- $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang zuzuordnen sind, der in zwei Komponenten aufgespalten ist. Die Berechnung des α -helikalen Anteils (Kapitel 3.6.4) erfolgte aus dem gemessenen Wert der Elliptizität bei einer Wellenlänge von 222 nm (Scholtz *et al.* 1991). Demnach konnte für den PAH-Wildtyp ein dominierender α -helikaler Anteil von 24,4 % berechnet werden.

4.2.4 Etablierung eines *DSF*-Assays zur Analyse der thermischen Stabilität

Ein weiterer Schritt zur biochemischen Charakterisierung des PAH-Wildtyps war die Etablierung eines fluoreszenzbasierten *DSF*-Entfaltungsassays zur Untersuchung der thermischen Stabilität des funktionellen Enzyms unter Verwendung von ANS als extrinsischem Fluorophor. Wie bereits aus der Literatur bekannt war (Thorolfsson *et al.* 2002), erfolgt die durch Hitzestress induzierte Entfaltung der PAH in zwei Schritten, wobei zunächst die vier regulatorischen Domänen bei einer Temperatur, die als erster Umschlagspunkt T_{M1} bestimmt wird, entfalten. Bei höheren Temperaturen setzt die Entfaltung zweier katalytischer Domänen ein, zu messen als zweiter Umschlagspunkt T_{M2} , bevor das Protein bei noch höheren Temperaturen vollständig denaturiert.

Zunächst wurde im Rahmen der Dissertation der *DSF*-Assays im eigenen Labor etabliert (Gersting *et al.* 2008). Die Auswertung der Daten erfolgte durch Berechnung der beiden Umschlagpunkte (Kapitel 3.6.2) aus der *unfolded fraction* (Pey *et al.* 2008) und durch gleichzeitige Analyse der Hydrophobizität des Wildtyps im nativen Zustand. Die berechneten Temperaturen für die beiden Umschlagpunkte waren 47,74 °C für den ersten und 54,99 °C für den zweiten Übergang (Abbildung 12) und stimmten sehr gut mit der Literatur überein (Thorolfsson *et al.* 2002).

Da die Bindung von ANS zu Beginn des Experiments auch gleichzeitig eine Aussage über die Hydrophobizität im nativen Zustand erlaubt, konnte durch Berechnung des Mittelwerts der ANS-Fluoreszenz bei 25 °C die Qualität der Faltung analysiert werden. Die Hydrophobizität des Wildtyps entsprach 72,45 Absorptionseinheiten. Generell ist die Bestimmung von Übergangstemperaturen und Hydrophobizität des PAH-Wildtyps von Bedeutung, da sie eine wichtige Grundlage für die Analyse des Unterschiedes zwischen PAH-Wildtyp und Varianten darstellt. Darüber hinaus handelt es sich hierbei um wichtige experimentelle Endpunkte bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf das Enzym.

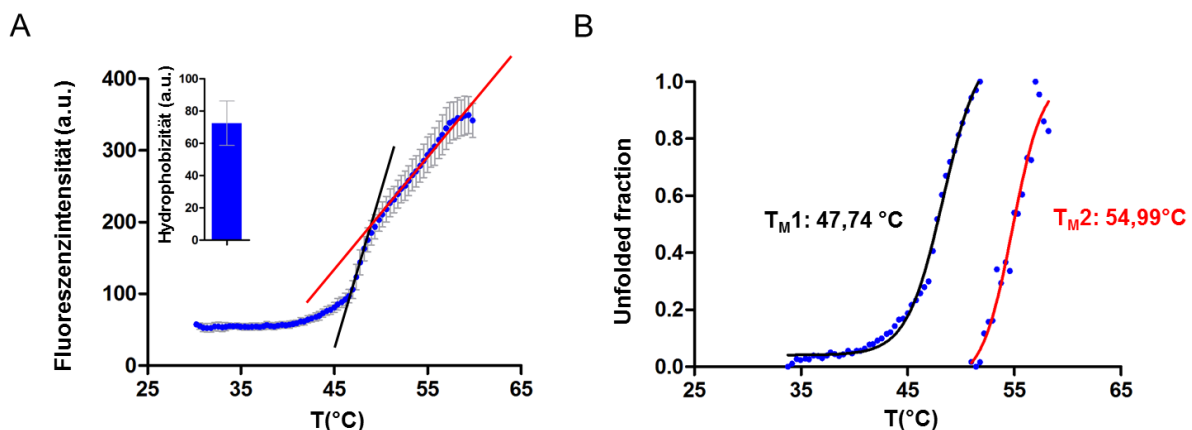


Abbildung 12. Thermische Denaturierung des PAH-Wildtyps

(A) Die ansteigende ANS-Fluoreszenzkurve zeigt die temperaturabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps und ist gemittelt aus den Rohdaten von elf Einzelmessungen. Die Standardabweichung zwischen den einzelnen Messungen wird durch die grauen Fehlerbalken angezeigt. Die Linien verdeutlichen den ersten (schwarz) und zweiten (rot) Übergang der Entfaltung. Das kleine eingefügte Balkendiagramm zeigt die Hydrophobizität des Wildtyps im nativen Zustand bei 25 °C. Auch hierbei diente ANS als Fluoreszenzmarker, der eine Aussage über hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche erlaubt. Das Balkendiagramm ist ein Mittelwert aus 60 Einzelwerten und die Standardabweichung zwischen den Messungen wird durch den grauen Fehlerbalken dargestellt. (B) Die Berechnung der *unfolded fraction* (Pey *et al.* 2008) in Abhängigkeit von der Temperatur erfolgte separat für den ersten und zweiten Umschlagpunkt (blau gepunktete Kurven). Durch Boltzman fit der Messwerte konnten die Temperaturen am Umschlagpunkt für den ersten (schwarz) und zweiten (rot) Übergang berechnet werden.

4.2.5 Durch DLS lässt sich der hydrodynamische Radius des Wildtyps analysieren

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung wurde angewendet, um den hydrodynamischen Radius des PAH-Wildtyps in Lösung zu berechnen. Aus 16 Einzelmessungen – wobei jede der 16 Messungen ein Mittelwert aus zehn Korrelationsfunktionen ist – konnte der Mittelwert des hydrodynamischen Radius des PAH-Wildtyps aus der entsprechenden Größenverteilung (Abbildung 13A) mit 6,18 nm berechnet werden (Abbildung 13B). Die Berechnung des Molekulargewichts aus den DLS-Daten ergab einen Wert von 248 kDa, der mit der theoretischen Größe von 207,48 kDa gut übereinstimmte.

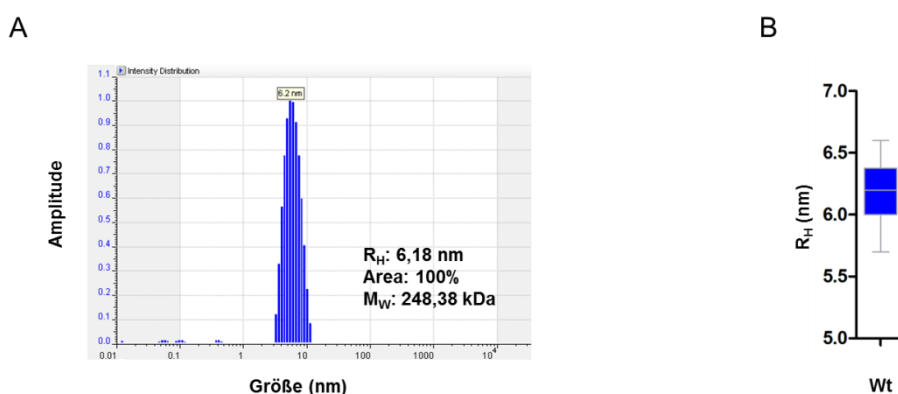


Abbildung 13. Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung des PAH-Wildtyps

(A) Die Größenverteilung zeigt exemplarisch eine von insgesamt 16 DLS-Messungen des PAH-Wildtyps bei 25 °C. Der einzige Peak bei einer Größe von 6,22 nm konnte zu 100 % dem hydrodynamischen Radius R_H des Wildtyp-Tetramers zugeordnet werden. (B) Im Boxplot aufgetragen ist der berechneten Mittelwert von 6,18 nm des hydrodynamischen Radius des PAH-Wildtyps, basierend auf 16 DLS-Einzelmessungen. Die Standardabweichung ist als grauer Balken eingezeichnet.

4.2.6 Tryptophanfluoreszenzspektren zeigen lokale Änderungen am N-Terminus der PAH

Die Aufnahmen intrinsischer Tryptophanfluoreszenzspektren eignen sich zur Analyse lokaler Effekte auf eine Wildtyp-Untereinheit, wie sie beispielsweise durch die Bindung von Substrat und Kofaktor oder auch Mutationen ausgelöst werden können. Der humane PAH-Wildtyp enthält in jeder Untereinheit drei konservierte Tryptophanreste an den Aminosäurepositionen 120 (regulatorische Domäne), 187 und 326 (beide katalytische Domäne). Aus der Literatur war bereits bekannt, dass W120 in der regulatorischen Domäne für 61 % des Tryptophanfluoreszenzsignals verantwortlich ist (Knappskog and Haavik 1995). Daher können Veränderungen in der Fluoreszenzintensität, welchen Ursprungs auch immer, Hinweise auf lokale Verschiebungen in der *hinge region* R111-T117 sein (Thorolfsson *et al.* 2003). Die Spektren des PAH-Wildtyps wurden in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 400 nm aufgenommen und zeigten ein Fluoreszenzmaximum bei 332,9 nm (Abbildung 14). Im Vergleich zum Fluoreszenzmaximum von freiem Tryptophan in Lösung konnte so eine hypsochrome Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen (Blauverschiebung) gemessen werden. Interessant werden die Analysen der intrinsischen Tryptophanspektren vor allem in

den folgenden Kapiteln, wenn es um das Vorliegen von Mutationen oder die Bindung von Substanzen geht.

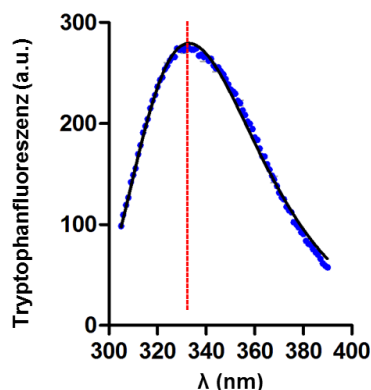


Abbildung 14. Intrinsisches Tryptophanfluoreszenzemissionsspektrum des PAH-Wildtyps

Das Emissionsspektrum im Wellenlängenbereich zwischen 300 und 400 nm (Anregung 295 nm) ist das Ergebnis aus drei unabhängigen Messungen bei 25 °C. Die Position des Emissionsmaximums (332,9 nm) wird durch die rot gestrichelte Linie dargestellt und wurde durch eine schiefe Normalverteilung (Rooney and Lee 1986) (schwarzer Fit) berechnet. Die Standardabweichung ist für jeden Punkt als grauer Balken eingezeichnet.

4.2.7 Kinetische und thermodynamische Analysen erlauben die Quantifizierung des Entfaltungsprozesses

In einem abschließenden Schritt zur Charakterisierung des PAH-Wildtyps erfolgten kinetische und thermodynamische Untersuchungen des Entfaltungsprozesses durch Berechnung der Aktivierungsenergie, sowie der thermodynamischen Parameter der Gibbs-Energie $\Delta G^\#$, der Reaktionsenthalpie $\Delta H^\#$ und der Reaktionsentropie $\Delta S^\#$ (Kapitel 3.6.3). Die Berechnung der thermodynamischen Größen konnte nur unter der Annahme erfolgen, dass die Entfaltung der PAH in kleinsten Schritten erfolgt, die als solche reversibel sind und die beobachtbaren Prozesse während der Entfaltung miteinander im Gleichgewicht stehen. Für die Messungen der Entfaltungskinetiken wurden fünf Temperaturen zwischen 40 und 50 °C ausgewählt, von denen aus den vorangegangenen thermischen Entfaltungsexperimenten (Kapitel 4.2.4) bekannt war, dass sie deutlich unterhalb der Temperatur liegen, bei der die PAH im hitzedenaturierten Zustand irreversibel aggregiert, was eine thermodynamische Auswertung der Entfaltung unmöglich machen würde.

Abbildung 15A zeigt die zeitabhängige Denaturierung des PAH-Wildtyps bei fünf verschiedenen Temperaturen unter Verwendung des ANS-Fluoreszenzmarkers, der während der Entfaltung an die zunehmend exponierten hydrophoben Bereiche im Protein bindet und dadurch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals induziert. Je stärker die Probe erhitzt wurde, umso schneller war die Entfaltung des Enzyms mit Erreichen eines Plateaus mit gleichbleibender Fluoreszenzintensität abgeschlossen. Dauerte die Entfaltung des PAH-Wildtyps bei 41,5 °C beispielsweise noch 35 min, war der Prozess bei 47,5 °C bereits nach 12 min abgeschlossen. Um die Geschwindigkeitskonstante k für jede einzelne Temperatur zu berechnen, wurden alle fünf gemessenen Entfaltungskinetiken jeweils an eine

Exponentialfunktion erster Ordnung angenähert. Durch Auftragen des natürlichen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur, konnten die exponentiell vom Kehrwert der Temperatur abhängigen Werte in einem Arrhenius-Plot auf einer Geraden abgebildet werden (Abbildung 15B). Durch Anwendung der Arrhenius-Gleichung wurde aus der Steigung der Geraden die Aktivierungsenergie E_A für den Übergang des Wildtyps aus dem nativen in den entfalteten Zustand mit 204,7 kJ/mol berechnet (Kapitel 3.6.3).

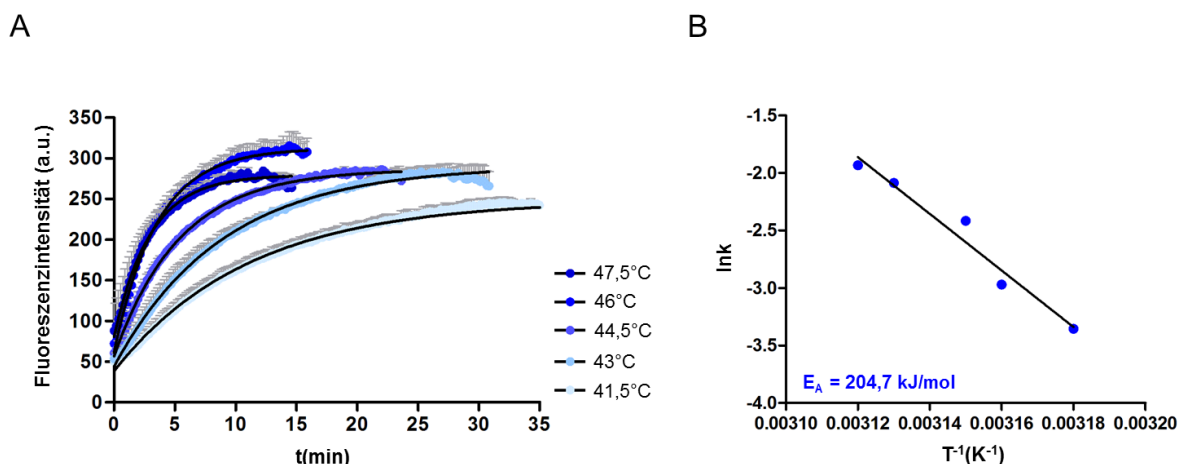


Abbildung 15. Entfaltungskinetiken des PAH-Wildtyps und Arrhenius-Plot

(A) Die ansteigenden ANS-Fluoreszenzkurven zeigen die zeitabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps bei fünf verschiedenen Temperaturen. Die Kurven wurden gemittelt aus den Rohdaten von drei Einzelmessungen und die Standardabweichung zwischen den einzelnen Messungen wird durch die grauen Fehlerbalken angezeigt. Alle fünf Kurven wurden jeweils an eine Exponentialfunktion erster Ordnung angenähert (schwarze durchgezogene Linien), um daraus den Wert der Geschwindigkeitskonstanten k der zeitabhängigen Entfaltung zu ermitteln. (B) Im Arrhenius-Plot aufgetragen wurden die aus den Kinetikmessungen berechneten Geschwindigkeitskonstanten k gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur in Kelvin. Die Messpunkte konnten durch eine lineare Regression angenähert werden. Aus der Steigung der Geraden multipliziert mit der universellen Gaskonstante erfolgte die Berechnung der Aktivierungsenergie E_A für die Entfaltung des PAH-Wildtyps.

Die Berechnung der thermodynamischen Parameter ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger der zeitabhängigen Entfaltung erfolgte nach der Eyring Theorie des Übergangszustandes aus der statistischen Thermodynamik und Anwendung der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Kapitel 3.6.3). Tabelle 23 zeigt, dass mit zunehmender Temperatur im Rahmen des Entfaltungsprozesses eine Abnahme der Gibbs-Energie und der Reaktionsenthalpie sowie ein Anstieg der Reaktionsentropie erfolgt.

T(°C)	k	T(K)	T ⁻¹ (K ⁻¹)	ln k	ln T	ΔG^\ddagger (J/mol)	ΔH^\ddagger (J/mol)	ΔS^\ddagger (J/mol*K)
41,5	0,03492	314,65	0,00318	-3,3547	5,7514	85977,86	202084,69	369,00
43	0,05123	316,15	0,00316	-2,9714	5,7562	85392,84	202072,22	369,06
44,5	0,08921	317,65	0,00315	-2,4168	5,7609	84345,64	202059,75	370,57
46	0,124	319,15	0,00313	-2,0875	5,7656	83882,70	202047,27	370,24
47,5	0,1447	320,65	0,00312	-1,9331	5,7703	83877,89	202034,80	368,49

Tabelle 23. Kinetische und thermodynamische Parameter für die Entfaltung des Wildtyps

4.3 Biophysikalische Charakterisierung des PAH-Wildtyps im Komplex mit BH₄ und den BH₄-Derivaten BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄

4.3.1 BH₄ und die BH₄-Derivate unterscheiden sich in wichtigen strukturellen Details

Zu Beginn der Promotionsarbeit war die Erkenntnis, dass pharmakologische Dosen des natürlichen Kofaktors der PAH bei einem hohen Prozentsatz der Patienten mit Phenylketonurie zu einer Korrektur der biochemischen Auffälligkeiten führen, noch ziemlich neu (Muntau *et al.* 2002). Die klinische Relevanz dieser Beobachtung bestand darin, dass für viele Patienten dadurch die Hoffnung entstand, die bisher notwendige lebenslange belastende diätetische Therapie langfristig durch eine medikamentöse Therapie ersetzen zu können. Völlig ungeklärt waren zu diesem Zeitpunkt die molekularen Mechanismen, die dem Phänomen der BH₄-Sensitivität zugrunde lagen. Auch nach Zulassung der synthetischen Form von BH₄, Sapropterindihydrochlorid, als *orphan drug* 2007 in den USA und 2008 in Europa, war der Wirkmechanismus noch nicht geklärt. Ein Schwerpunkt der Dissertation war daher nach erfolgreicher Reinigung und Charakterisierung des PAH-Wildtyps, die Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung zwischen BH₄ und der PAH.

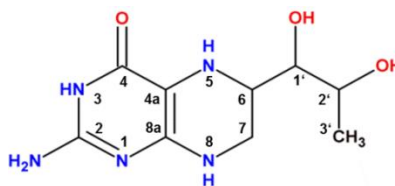


Abbildung 16. Strukturformel von 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin

5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin setzt sich aus einem Pyrimidopyrazin-Ringsystem und einer 1,2-Dihydroxypropylseitenkette zusammen. Die drei chiralen Zentren des Moleküls sind an den Kohlenstoffatomen C6, C1' und C2' lokalisiert.

Um die Einflüsse der spezifischen strukturellen Elemente des Kofaktors – des kondensierten Pyrimidopyrazin-Ringsystem und der (1*R*,2*S*)-1,2-Dihydroxypropylseitenkette am C6-Kohlenstoff des Grundgerüsts (Abbildung 16) – auf die PAH zu analysieren, wurden neben BH₄ zusätzlich drei BH₄-Derivate mit in das Arbeitsprogramm aufgenommen, die sich entweder am Ring oder in der Seitenkette von BH₄ unterscheiden. Es handelte sich dabei um die oxidierte Form des Kofaktors 7,8-dihydro-L-biopterin (BH₂) und Sepiapterin, eine Vorstufe von BH₂ im *de novo* Pathway, sowie um das synthetische Kofaktoranalogen 6-MPH₄ (Abbildung 17).

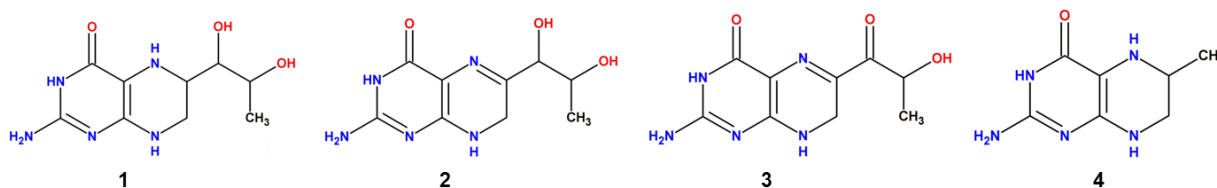


Abbildung 17. Strukturformeln von BH₄ und BH₄-Derivaten

Vergleichende Strukturformeln von 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (1), 7,8-Dihydrobiopterin (2), Sepiapterin (3) und 6-Methyltetrahydrobiopterin (4).

BH₂ und Sepiapterin unterscheiden sich von BH₄ durch ein oxidiertes Pyrazin-Grundgerüst und Sepiapterin verfügt zudem über eine Carbonylfunktion in der Seitenkette, die die bisherige Hydroxylgruppe im BH₄-Molekül ersetzt. Das Pyrimidopyrazin-Ringsystem von BH₄ und 6-MPH₄ ist dagegen identisch. Der Unterschied zwischen beiden Substanzen liegt in einer verkürzten Seitenkette am C6-Kohlenstoffatom, denn die 1,2-Dihydroxypropylseitenkette ist im 6-MPH₄-Molekül durch einen kurzen Methylrest ersetzt.

4.3.2 Bindungsstudien zeigen unterschiedliche Wechselwirkungen der Liganden

Der erste Schritt zur Charakterisierung der Struktur-Funktionsbeziehung zwischen der PAH und den Liganden BH₄ (Abbildung 18A und B), BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ waren Bindungsstudien zur Untersuchung der Wechselwirkungen der Substanzen mit dem aktiven Zentrum der PAH, basierend auf den Kristallstrukturen der katalytischen Domäne im Komplex mit BH₄ (PDB Code 1j8u (Andersen *et al.* 2001)) und BH₂ (PDB Code 1dmw (Erlandsen *et al.* 2000)). Zwischen dem C4 Carbonyl-Sauerstoff im Pyrimidinring und den drei konservierten Wassermolekülen, die das Eisenatom komplexieren, bilden sich Wasserstoffbrücken aus. Der N3-Stickstoff der Liganden im Pyrimidinring interagiert über das Wassermolekül 1142 mit der Carboxygruppe von E286 in der katalytischen Domäne. Die benachbarte Aminogruppe an C2 vervollständigt das Wasserstoffbrückennetzwerk durch die Interaktion mit der Carbonylgruppe von G247, welches am Boden der Bindungstasche lokalisiert ist. Die beiden Stickstoffe N1 und N8 der Liganden interagieren jeweils mit L249 in der katalytischen Domäne, wobei N1 als Akzeptor für den Backbone-Stickstoff von L249 dient und N8 als Donor Wechselwirkungen mit der Carbonylgruppe von L249 eingeht. Der Pyrazinring der Liganden bildet zudem eine π - π -Wechselwirkung mit der Phenylgruppe von F254 in der katalytischen Domäne aus, wodurch der Kofaktor zusätzlich im aktiven Zentrum arretiert wird. Zudem interagiert BH₄ in Abwesenheit des Substrats indirekt über eingelagerte Wassermoleküle sowie das katalytische Eisen mit den Aminosäuren H264, H285, H290, A322, Y325 und E330 (Teigen *et al.* 2004, Santos-Sierra *et al.* 2012). Die Aminosäureanionen Glutamat und Aspartat spielen bei der Bindung von Pterinen im Allgemeinen eine wichtige Rolle. Sie bilden beispielsweise in den Proteinen, die an der *de novo* Synthese von BH₄ beteiligt sind und keine Sequenzhomologie untereinander aufweisen, ein Wasserstoffbrückennetzwerk zum Pyrimidinring aus. Zu nennen ist in diesem Zusammenhang der Aminosäurerest E286 im aktiven Zentrum der PAH, der für die Bindung der Guanidinogruppe des Pyrimidinrings im ternären Komplex unerlässlich ist. Ein Mutageneseexperiment mit anschließender kinetischer Analyse des varianten Proteins konnte die wichtige Funktion dieser BH₄-bindenden Aminosäure bestätigen, denn die Variante E286A zeigte einen 50-70 fachen Anstieg des K_m -Wertes für BH₄ und eine Aktivität von <1 % im Vergleich zum PAH-Wildtyp (Dickson *et al.* 1994, Erlandsen *et al.* 2000). Die 1,2-Dihydroxypropylseitenkette des Kofaktors zeigt in Richtung der durch die Aminosäurereste Y325, A322, L255 und F254 geformte Untertasche. Der lipophile Teil der Seitenkette bildet dabei hydrophobe Wechselwirkungen mit diesem Bereich aus. Die beiden

Hydroxylgruppen der Seitenkette sind verstärkt dem Lösemittel ausgesetzt. Die erste Hydroxylgruppe OH1' ist daher auch von Wassermolekülen umgeben, während die zweite OH2' eine Wasserstoffbrücke mit Ser251 ausbildet. Der Aminosäurerest Y325 ist ebenfalls wichtig für die Bindung des Pterinrings, denn er interagiert durch seinen Phenylring mit der hydrophoben Methylgruppe der Dihydroxypropylseitenkette (Erlandsen *et al.* 2000, Andersen *et al.* 2001). Zudem bildet er in der PAH ohne gebundenen Liganden über seine Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül in der Koordinationssphäre des Eisens aus (Erlandsen *et al.* 1997). Die Varianten Y325L und Y325A zeigen beispielsweise eine stark reduzierte spezifische Enzymaktivität von 8 % bzw. 0.5 % im Vergleich zur Aktivität des Wildtyps (Jennings *et al.* 2000). Diese Wechselwirkungen gelten sowohl für die Interaktion von BH₄ mit der PAH als auch für die von BH₂ mit der PAH, denn der Unterschied zwischen den beiden Substanzen sind lediglich zwei zusätzliche Wasserstoffatome an den Positionen 7 und 8 im Pyrazinring von BH₂.

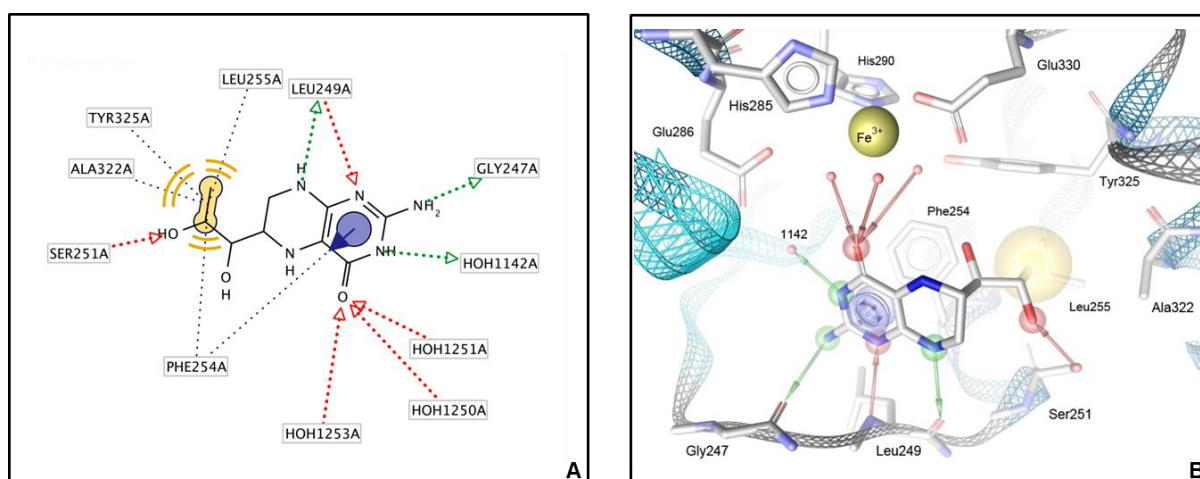


Abbildung 18. Bindungsnetzwerk von BH₄ im aktiven Zentrum des PAH-Wildtyps

(A) Das Netzwerk der PAH-BH₄-Interaktion ist als 2D-Modell dargestellt. Von Donorzentren für eine Wasserstoffbrückenbindung zeigen grüne Pfeile auf den Bindungspartner, während rote Pfeile auf Akzeptorzentren einer Wasserstoffbrückenbindung gerichtet sind. Der gelbe Bereich zeigt die Region hydrophober Kontakte an und der blaue Kreis symbolisiert die π - π -Wechselwirkung zwischen aromatischem Pyrazinring des Liganden und dem Phenylring von F254 in der katalytischen Domäne. (B) Das 3D-Modell zeigt die unterschiedlichen Wechselwirkungen von BH₄ in der Bindungstasche der PAH. Sauerstoffatome sind dabei rot markiert, Stickstoffatome blau, Kohlenstoffatome grau und Eisen (III) ist als gelbe Kugel dargestellt. Die kleinen roten Kugeln symbolisieren die eingelagerten Wassermoleküle. Der transluzierende gelbe Bereich zeigt die Umgebung mit hydrophoben Kontakten an. Grüne und rote Pfeile markieren Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren.

Sepiapterin unterscheidet sich von BH₄ durch zwei strukturelle Eigenschaften. Das Ringgrundgerüst ist identisch mit dem von BH₂, ist also gegenüber dem Grundgerüst von BH₄ oxidiert und zusätzlich ist die Hydroxylgruppe OH1' in der Sepiapterinseitenkette durch eine Carbonyl-Funktion ersetzt und wirkt als starker Wasserstoffbrückenakzeptor auf die umgebenden Wassermoleküle. Alle weiteren oben bereits beschriebenen Wechselwirkungen von BH₄ bzw. BH₂ mit der katalytischen Domäne der PAH gelten aufgrund der sehr ähnlichen chemischen Strukturen auch für Sepiapterin (Abbildung 19A und B).

Das Ringgrundgerüst von 6-MPH₄ ist identisch mit dem des natürlichen Kofaktors der PAH, allerdings ist die 1,2-Dihydroxypropylseitenkette durch einen kurzen Methylrest ersetzt. Daher fehlen bei der Bindung von 6-MPH₄ die Wechselwirkungen der Hydroxylgruppen OH1' und OH2' mit den umgebenden Wassermolekülen, die Interaktion mit S251 sowie die hydrophoben Wechselwirkungen mit L255, A322 und Y325 (Abbildung 19C und D). Alle Interaktionen des kondensierten Pyrimidopyrazin-Ringsystems sind jedoch mit den für BH₄ beschriebenen Wechselwirkungen identisch. Die Bindungsstudien zeigen insgesamt die sehr ähnlichen Wechselwirkungen der Liganden im aktiven Zentrum der PAH. Nur 6-MPH₄ verfügt aufgrund der verkürzten Seitenkette über eine reduzierte Anzahl an Interaktionen.

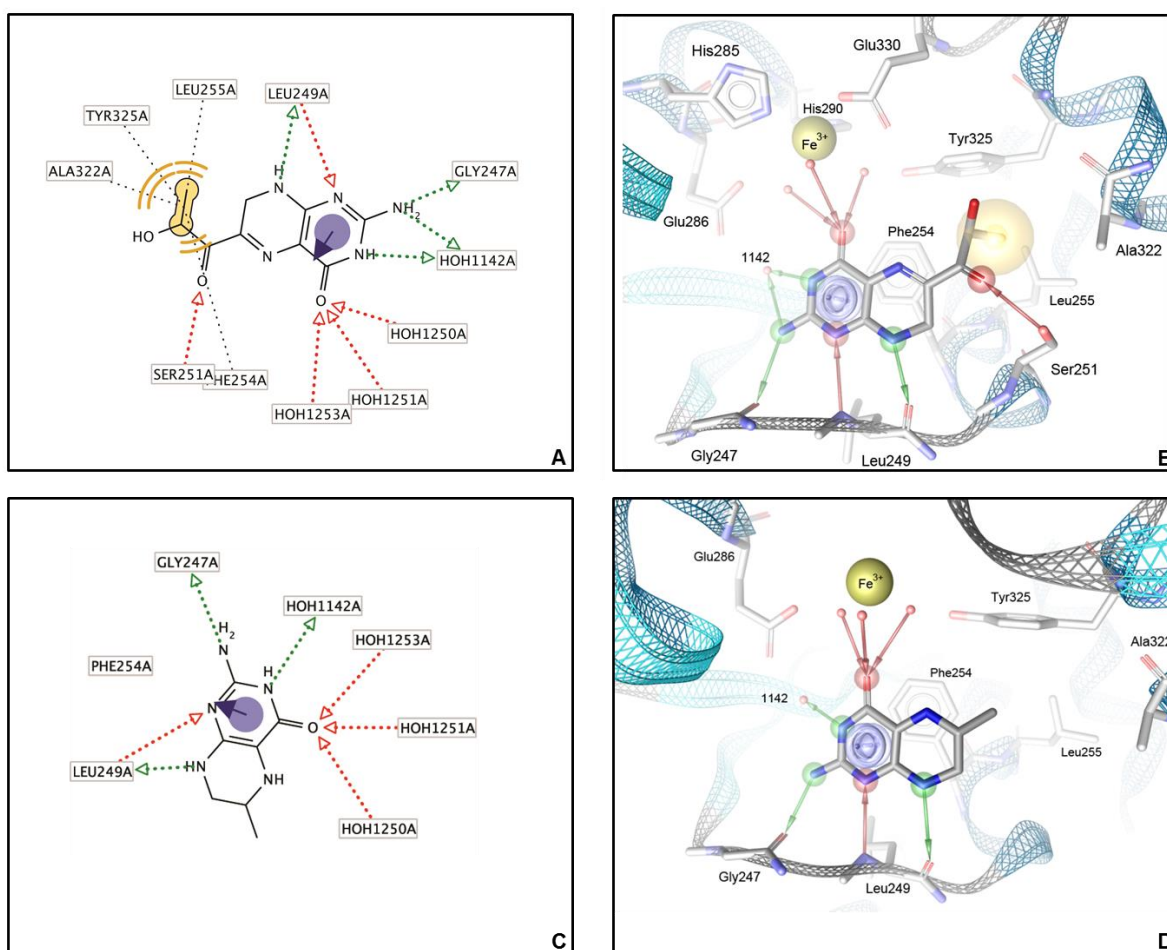


Abbildung 19. Bindungsnetzwerk von Sepiapterin und 6-MPH₄

(A) Das Netzwerk der PAH-Sepiapterin Interaktion ist als 2D-Modell dargestellt. Von Donorzentren für eine Wasserstoffbrückenbindung zeigen grüne Pfeile auf den Bindungspartner, rote Pfeile sind auf Akzeptorzentren einer Wasserstoffbrückenbindung gerichtet. Der gelbe Bereich beschreibt die Region hydrophober Kontakte und der blaue Kreis symbolisiert die π - π -Wechselwirkung zwischen aromatischem Pyrazinring des Liganden und Phenylring von F254 in der katalytischen Domäne der PAH. (B) Das 3D-Modell zeigt die unterschiedlichen Wechselwirkungen von Sepiapterin in der Bindungstasche der PAH. Sauerstoffatome sind dabei rot markiert, Stickstoffatome blau, Kohlenstoffatome grau und Eisen (III) ist als gelbe Kugel dargestellt. Die kleinen roten Kugeln symbolisieren die eingelagerten Wassermoleküle. Der transluzierende gelbe Bereich zeigt die Umgebung mit hydrophoben Kontakten an. Grüne und rote Pfeile markieren Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren. (C) 2D- und 3D-Modell (D) der Interaktion von 6-MPH₄ mit dem aktiven Zentrum der PAH.

4.3.3 Messung der Bindungskonstanten der PAH-Liganden mittels MST

Im vorhergehenden Kapitel wurden die möglichen Wechselwirkungen zwischen den in der Bindungstasche von BH₄ gebundenen Liganden und dem Enzym beschrieben. Die tatsächliche Bindung von BH₄, BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ im aktiven Zentrum der PAH wurde mittels MST-Messungen untersucht. Vor der Thermophorese-Messung erfolgte die kovalente Kopplung eines Fluoreszenzmarkers an die Lysinreste des PAH-Wildtyps (Kapitel 3.7). Das Labeln erfolgte zu Beginn jedes Messtages, denn Vorversuche ergaben, dass es nicht möglich ist gelabelten PAH-Wildtyp einzufrieren und für die nächste Messung zu verwenden. Das erfolgreiche Labeling wurde umgehend durch Bestimmung der Labelingeffizienz verifiziert.

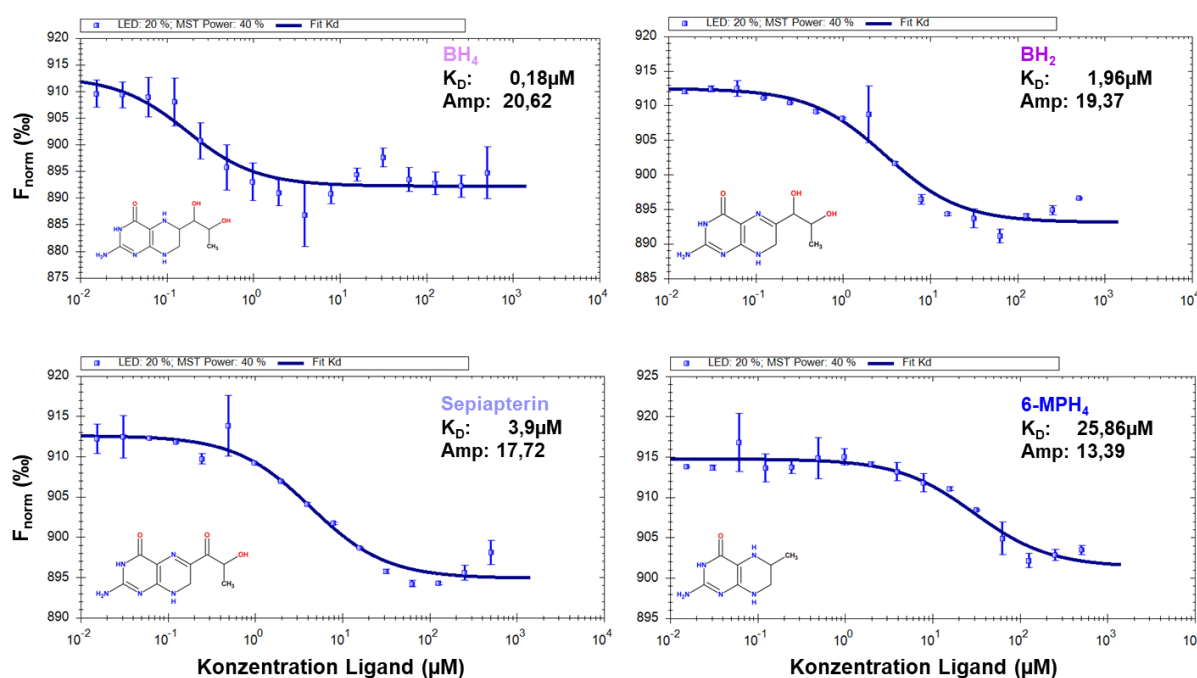


Abbildung 20. MST-Messungen des Wildtyps im Komplex mit BH₄ und BH₄-Derivaten

Die Messergebnisse aus 16 seriellen Verdünnungen der vier Liganden wurden jeweils gegen das gemessene und normalisierte Fluoreszenzsignal aufgetragen und aus dem Fit der Daten durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes die Dissoziationskonstante K_D berechnet. Die Amplitude (Amp) zeigt den Unterschied zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand. Die Daten wurden mindestens als Duplikate gemessen und die Standardabweichung ist als blauer Balken angegeben.

Zunächst erfolgte die Aufzeichnung der Bindungskurve aus 16 seriellen Verdünnungen für BH₄, BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ im Komplex mit dem PAH-Wildtyp (Abbildung 20) in einem Konzentrationsbereich von 0,0153-500 μM . Durch Plotten der Messdaten gegen den Logarithmus der Einzelkonzentrationen resultierte eine sigmoidale Bindungskurve, aus der die Dissoziationskonstante K_D berechnet werden konnte (Wienken *et al.* 2010). Wichtig für die Qualität der Messdaten war die Amplitude der jeweiligen Bindungskurve, die stets größer als acht sein sollte, damit der darin gezeigte Unterschied zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand für den Fit und damit die Berechnung der K_D ausreichend groß ist. Für BH₄, BH₂ und Sepiapterin im Komplex mit dem PAH-Wildtyp konnten sehr starke Enzym-

Ligand-Interaktionen mit Dissoziationskonstanten von 0,18 μM , 1,96 μM und 3,9 μM gemessen werden. Die Bindungsstärke des synthetischen Kofaktoranalogs 6-MPH₄ war mit einer K_D von 25,86 μM deutlich weniger stark ausgeprägt als für BH₄. Das kann auf die fehlenden Interaktionen der Dihydroxypropylseitenkette zurückgeführt werden (Kapitel 4.3.2), denn die beiden Derivate BH₂ und Sepiapterin zeigten eine vergleichbare Affinität mit BH₄ und weisen keine bzw. nur eine kleine Änderung in der Seitenkettenstruktur auf.

4.3.4 Die Enzymaktivität des Wildtyps mit 6-MPH₄ zeigt einen breiten Aktivitätsbereich

Die vorausgegangenen MST-Experimente bestätigten die Bindung von BH₄, BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ im aktiven Zentrum der PAH mit unterschiedlicher Affinität. Im nächsten Schritt sollte die Kofaktoraktivität der drei Derivate mit der von BH₄ verglichen werden. Da BH₂ und Sepiapterin aufgrund der Substitution an N5 und C6 im Pyrazinring nicht das korrekte Redoxpotential für die katalytische Kofaktorfunktion besitzen (Almas *et al.* 2000), sind sie als Kofaktor für die PAH nicht geeignet. 6-MPH₄ ist bereits aus der Literatur als Kofaktor bekannt (Martinez *et al.* 1995). Daher konnte ein *activity landscape* des PAH-Wildtyps mit 6-MPH₄ als Kofaktor gemessen und berechnet werden (Kapitel 4.2.2), der zum ersten Mal den Einfluss von 6-MPH₄ über einen weiten Konzentrationsbereich von L-Phe (0-4.000 μM) und 6-MPH₄ (0-1.500 μM) beschreibt (Abbildung 21). Die höchste Enzymaktivität der PAH (7.206 nmol L-Tyr/min x mg Protein) konnte bei einem Wert von 2.346 μM L-Phe und 505 μM 6-MPH₄ gemessen werden. Damit lag die Enzymaktivität mit 6-MPH₄ als Kofaktor um fast 2.000 nmol L-Tyr/min x mg Protein unter der mit BH₄ gemessenen Enzymaktivität (9.106 nmol L-Tyr/min x mg Protein). Zudem wurde deutlich, dass die PAH eine geringere Affinität gegenüber 6-MPH₄ zeigte, denn es waren höhere 6-MPH₄-Konzentrationen notwendig, um die maximale Enzymaktivität zu erreichen (505 μM 6-MPH₄ gegenüber 132 μM BH₄). Damit stimmten die Ergebnisse des *PAH activity landscapes* von 6-MPH₄ mit den MST-Daten aus Kapitel 4.3.3 überein, denn auch hier konnte für den Komplex des PAH-Wildtyps mit 6-MPH₄ eine deutlich niedrigere K_D gemessen werden, die für eine niedrigere Affinität der PAH gegenüber 6-MPH₄ spricht. Da der strukturelle Unterschied zwischen BH₄ und 6-MPH₄ ausschließlich die Seitenkette am C6-Kohlenstoffatom des Ringsystems ist, unterstreichen die Ergebnisse erneut, dass die durch die 1,2-Dihydroxypropylseitenkette ausgebildeten Wechselwirkungen im aktiven Zentrum für eine starke Bindung des Liganden sehr wichtig sind. Der Methylrest an C6 im 6-MPH₄ ist dazu nicht in der Lage. Steigende 6-MPH₄-Konzentrationen hatten zudem eine Abnahme der PAH-Affinität gegenüber dem Substrat L-Phe zur Folge. Auch der *activity landscape* mit 6-MPH₄ zeigte eine Inhibierung des Enzyms bei hohen L-Phenylalaninkonzentrationen (Pey and Martinez 2005), aber mit 6-MPH₄ als Kofaktor war diese Inhibierung zu noch höheren Konzentrationen verschoben. Die mit BH₄ beobachtete Inhibierung der Enzymaktivität (Abbildung 10) (Staudigl *et al.* 2011) trat mit 6-MPH₄ nicht auf.

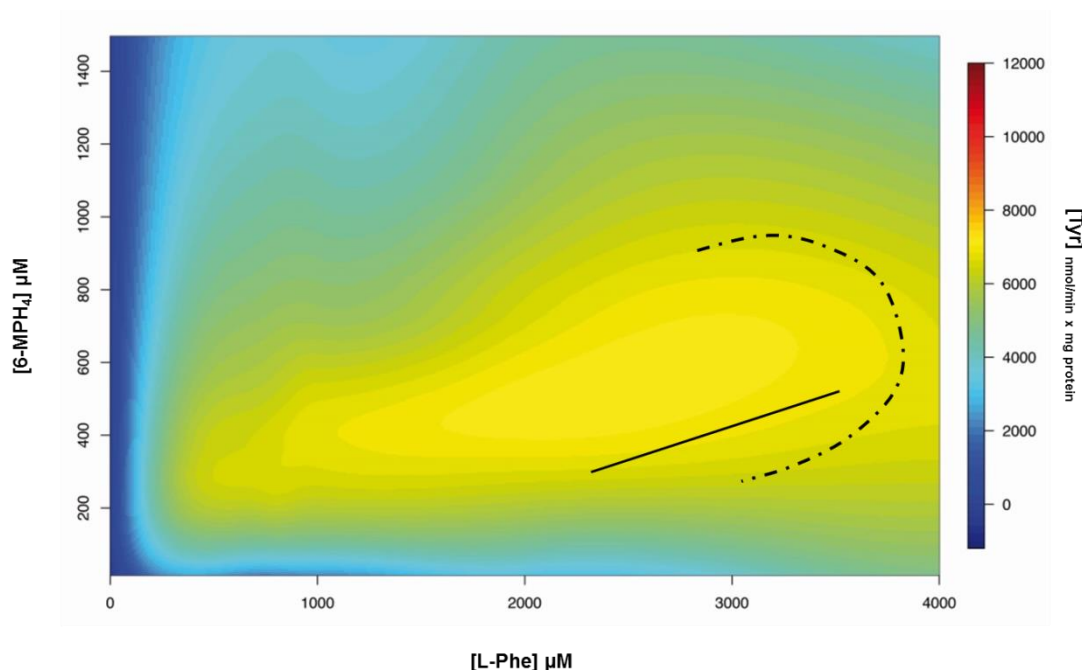


Abbildung 21. Activity landscape des PAH-Wildtyps mit 6-MPH₄ und L-Phe

Die Daten für die Aktivität des PAH-Wildtyps wurden bei unterschiedlichen L-Phenylalanin- und 6-MPH₄-Konzentrationen gemessen, interpoliert und die Aktivität farbkodiert als *activity landscape* dargestellt. Die durch Strichpunkte symbolisierte Linie zeigt K_i für die Substratinhibierung bei ansteigenden 6-MPH₄-Konzentrationen. Die durchgezogene Linie macht deutlich, dass mit ansteigenden L-Phenylalaninkonzentrationen mehr 6-MPH₄ notwendig war, um die Enzymaktivität aufrecht zu erhalten.

4.3.5 BH₂ und Sepiapterin inhibieren die Enzymaktivität des PAH-Wildtyps

Chaperone sind eine heterogene Klasse an Proteinen, die neu translatierte Aminosäureketten unter hohem ATP-Verbrauch dabei unterstützen, sich in die physiologisch korrekte, native Konformation zu falten (Fan *et al.* 1999, Buchner 2002, Wegele *et al.* 2004). Pharmakologische Chaperone sind eine Unterklasse von Chaperonen mit spezifischer Wirkung. Es sind *small molecules*, meist chemische Verbindungen, die durch ihre nichtkovalente, reversible Bindung an das Protein dessen korrekte Faltung unterstützen, indem sie sich positiv auf die Faltungsdynamik auswirken (Fan *et al.* 1999, Fan 2008). Dadurch kann das Protein stabilisiert und ein vorherrschender Funktionsverlust des Enzyms kompensiert werden. Die Voraussetzung für ihre Wirkung ist das Vorliegen von Enzymrestaktivität (Fan 2008) in Kombination mit unzureichender Stabilität des Enzyms. Pharmakologische Chaperone führen phänotypisch zu einem großen Unterschied, wenn es ihnen gelingt eine ausreichende Proteinrestmenge zur Verfügung zu stellen, die für ein Funktionieren des betroffenen Stoffwechselweges ausreichend ist. Oftmals ist allerdings dieser korrigierte biochemische Phänotyp ein Kompromiss, denn die verbesserte Enzymstabilität durch Einschränkung der Flexibilität kann mit einer Verringerung der Enzymaktivität einhergehen (DePristo *et al.* 2005, Muntau and Gersting 2010) und neben dem stabilisierenden Effekt auch zur moderaten Inhibierung der Enzymfunktion führen (Fan *et al.* 1999).

Im Rahmen der Promotionsarbeit sollten die inhibitorischen Eigenschaften der Liganden analysiert werden, um die Struktur-Aktivitätsbeziehung zwischen Ligand und Enzym weiter zu untersuchen. Da die Daten des *activity landscapes* des PAH-Wildtyps im Komplex mit BH_4 bereits die inhibitorischen Eigenschaften des natürlichen Kofaktors zeigten (Kapitel 4.2.2), ging es im Folgenden darum zu analysieren, ob auch die BH_4 -Derivate BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH $_4$ einen inhibitorischen Effekt auf die PAH haben. Hierzu wurde der Standardaktivitätsassay (Kapitel 3.5.1.1) pipettiert (Martinez et al. 1995), die BH_4 -Derivate jeweils als kompetitive Inhibitoren in ansteigender Konzentration (0-500 μM) zugegeben und die Menge an gebildetem L-Tyrosin anschließend spektrophotometrisch gemessen. Ein exponentieller Fit der Daten zeigte eine Abnahme der PAH-Aktivität mit zunehmenden Konzentrationen an BH_2 und Sepiapterin (Abbildung 22).

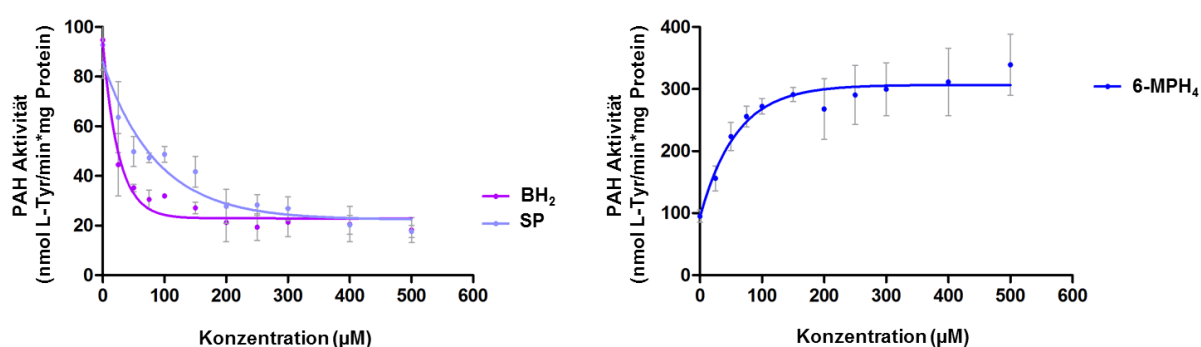


Abbildung 22. Inhibierung des PAH-Wildtyps durch BH_2 und Sepiapterin (SP)

Die Messpunkte aus elf seriellen Verdünnungen der Liganden BH_2 , Sepiapterin und 6-Methyltetrahydropterin (6-MPH $_4$) im Konzentrationsbereich von 0-500 μM wurden jeweils gegen die PAH-Aktivität - gemessen als Bildung von nmol L-Tyr/min*mg Protein - aufgetragen und durch Anwendung einer einphasigen Exponentialfunktion gefittet. Die Daten zeigten eine Inhibierung der PAH-Enzymaktivität durch Bindung von BH_2 und Sepiapterin aber nicht durch 6-MPH $_4$. Alle Messpunkte wurden als Triplikate gemessen und die Standardabweichung als grauer Fehlerbalken für jeden Messwert angegeben.

Durch das Auftragen der Messpunkte gegen den Logarithmus der Ligandenkonzentration und einen exponentiellen Fit der Daten, konnte die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) berechnet werden bei der eine halbmaximale Inhibierung vorlag. Die Berechnung der Werte für die inhibitorische Konstante K_i erfolgte aus den IC_{50} -Werten unter Anwendung der Cheng-Prusoff Gleichung (Kapitel 3.5.3). Für die inhibitorische Konstante von BH_2 konnte ein Wert von 2,2 μM berechnet werden, der mit dem Wert von BH_4 (1,2 μM) sehr gut übereinstimmte. Die Inhibierung durch Sepiapterin (6,37 μM) war etwas schwächer, während 6-MPH $_4$ im eingesetzten Konzentrationsbereich keine Inhibierung der Enzymaktivität zeigte (Abbildung 22). Dies stimmte gut mit den Daten aus dem *activity landscape* (Kapitel 4.3.4) und der Literatur überein, da die Inhibierung durch BH_4 durch die Interaktion der Dihydroxypropylseitenkette mit S23 in der IARS hervorgerufen wird (Teigen and Martinez 2003), die bei 6-MPH $_4$ aufgrund der verkürzten Seitenkette nicht erfolgen kann.

4.3.6 BH₄ stabilisiert den PAH-Wildtyp gegenüber Hitzestress

Um zu analysieren ob BH₄, BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ dazu in der Lage sind den PAH-Wildtyp gegenüber Hitzestress zu stabilisieren, wurden thermische Entfaltungskurven unter Verwendung des ANS-Fluoreszenzmarkers aufgenommen, wie sie bereits für den Wildtyp ohne Ligand im Kapitel 4.2.4 beschrieben sind. Aus den Rohdaten des DSF-Assays erfolgte die Analyse der Hydrophobizität des Wildtyps im Komplex mit jeweils einem der vier Liganden im nativen Zustand, sowie die Berechnung der *unfolded fraction* (Pey *et al.* 2008), woraus die Temperaturen der beiden Umschlagpunkte T_{M1} und T_{M2} (Abbildung 23A) für die Entfaltung der regulatorischen und katalytischen Domänen der PAH mit gebundenem Liganden berechnet werden konnten. Die Zugabe von BH₄ führte zum Anstieg der beiden Umschlagpunkte um 1,5 °C. BH₂ und 6-MPH₄ zeigten einen stärkeren Effekt auf den zweiten Umschlagpunkt, während die Bindung von Sepiapterin zu keiner nennenswerten Änderung der T_M-Werte führte.

Die Auswertung der Hydrophobizität zeigte deutliche konformative Änderungen des nativen Zustandes durch Bindung der Liganden (Abbildung 23B). Während die Hydrophobizität des PAH-Wildtyps durch Bindung von Sepiapterin gegenüber dem Zustand ohne Ligand um 43 % abnahm und damit eine Überführung des Enzyms in eine kompaktere Form andeutet, hatte die Bindung von BH₂ und 6-MPH₄ den gegenteiligen Effekt und zeigte einen signifikanten Anstieg der ANS-Fluoreszenz an, was auf mehr oberflächenexponierte hydrophobe Gruppen hindeutet. Die Bindung von BH₄ führte wie Sepiapterin zu einer leichten Abnahme der Hydrophobizität.

A

	T _{M1} (°C)	ΔT _{M1} (°C)	T _{M2} (°C)	ΔT _{M2} (°C)
Kontrolle	47,74	-	54,99	-
BH ₄	49,23	1,49	56,47	1,48
BH ₂	48,77	1,03	56,41	1,42
Sepiapterin	48,06	0,32	54,65	-0,34
6-MPH ₄	47,15	-0,56	56,09	1,10

B

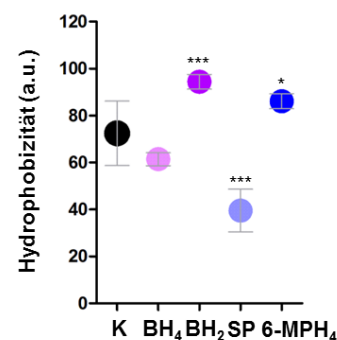


Abbildung 23. Umschlagpunkte und Hydrophobizität des PAH-Wildtyps

Die berechneten Umschlagpunkte und Hydrophobizitätsdaten des Wildtyps wurden jeweils ohne (Kontrolle K) und im Komplex mit 43 μM BH₄, BH₂, Sepiapterin (SP) oder 200 μM 6-MPH₄ gemessen. (A) Die Tabelle zeigt die berechneten Temperaturen der Umschlagpunkte T_{M1} und T_{M2} nach thermischer Denaturierung des PAH-Wildtyps unter Verwendung des Fluoreszenzmarkers ANS. Die Werte basieren auf Triplikaten und wurden durch Boltzman fit der berechneten *unfolded fraction* (Pey *et al.* 2008) ermittelt. Der durch Bindung des Liganden induzierte Temperaturunterschied zwischen dem Wildtypenzym ohne und mit Ligand wurde für den ersten Δ T_{M1} und zweiten Δ T_{M2} Übergang in einer separaten Spalte ermittelt. (B) Die Abbildung zeigt die Hydrophobizität des Wildtyps ohne und mit gebundenem Liganden im nativen Zustand bei 25 °C. Auch hierbei diente ANS als Fluoreszenzmarker, der eine Aussage über hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche erlaubt. Die Messwerte basieren auf mindestens neun Einzelwerten und wurden einer Varianzanalyse unterzogen (Dunnett's test), bei der alle Messdaten des Wildtyps mit gebundenem Liganden mit der Kontrolle ohne Ligand verglichen wurden (*, p<0,05; ***, p<0,001). Die grauen Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen den Einzelwerten.

4.3.7 Bindung der Liganden reduziert den hydrodynamischen Radius des PAH-Wildtyps

Die Analyse des hydrodynamischen Radius des PAH-Wildtyps im Komplex mit BH_4 , BH_2 , Sepiapterin oder 6-MPH_4 erfolgte durch Messung der dynamischen Lichtstreuung der einzelnen Partikel in Lösung. Für den hydrodynamischen Radius des Wildtyps ohne Ligand konnte bereits ein Wert von 6,18 nm berechnet werden (Kapitel 4.2.5). Die Zugabe der vier Liganden führte jeweils zu einer signifikanten Größenabnahme auf 5,9 nm mit BH_4 und 5,7 nm mit den drei Derivaten (Abbildung 24), was darauf hindeutet, dass die Bindung der Liganden das Enzym in eine kompaktere, *t-state*-ähnliche Konformation überführt, wie es im Symmetriemodell nach Monod-Wyman-Changeux (MWC) für allosterische Enzyme beschrieben wurde (Monod *et al.* 1965, Koshland *et al.* 1966). Diese kompaktere Konformation bietet einen gleichzeitigen Schutz vor Degradation durch das Proteasom (Doskeland and Flatmark 1996) und konnte im Rahmen der Dissertation für die PAH in dieser Form erstmals experimentell bestätigt werden.

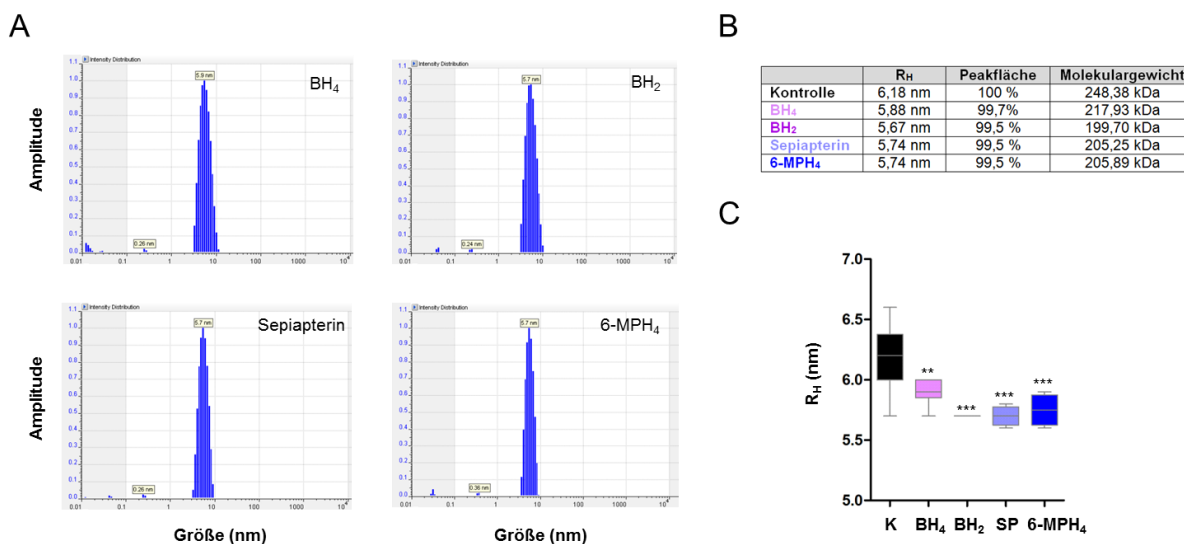


Abbildung 24. DLS Ergebnisse des PAH-Wildtyps

Die Daten zeigen den PAH-Wildtyp ohne (Kontrolle K) und im Komplex mit $43\text{ }\mu\text{M}$ BH_4 , BH_2 , Sepiapterin (SP) oder $200\text{ }\mu\text{M}$ 6-MPH_4 . **(A)** Die DLS-Größenverteilungen stellen exemplarisch nur ein Beispiel aus den jeweils vier Einzelmessungen des PAH-Wildtyps im Komplex mit den Liganden bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ dar. Der Hauptpeak in den vier Abbildungen ist auf die Lichtstreuung des PAH-Tetramers zurückzuführen und gibt den hydrodynamischen Radius des Enzyms in Nanometer an. **(B)** Die Tabelle fasst die Ergebnisse der DLS-Messungen zusammen. Hydrodynamischer Radius R_H in Nanometer, prozentuale Peakfläche und Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) konnten durch Messung der zeitabhängigen Intensität des gestreuten Lichtes und der zugehörigen zeitabhängigen Intensitäts-Autokorrelationsfunktion berechnet werden (Kapitel 4.2.5). **(C)** Im Boxplot aufgetragen sind die berechneten Mittelwerte aus mindestens vier Einzelmessungen der hydrodynamischen Radien R_H . Für die Varianzanalyse (Dunnett's test) wurden alle Messdaten des Wildtyps mit gebundenem Liganden mit der Kontrolle ohne Ligand verglichen (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Die Standardabweichung ist jeweils als grauer Fehlerbalken angegeben.

4.3.8 Tryptophanfluoreszenzspektren zeigen konformative Änderungen nach Bindung der Liganden auf

Um lokale strukturelle Änderungen nach Bindung von BH_4 , BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄ zu analysieren, wurden intrinsische Tryptophanfluoreszenzspektren aufgenommen. Die Bindung von BH_2 oder Sepiapterin im aktiven Zentrum führte zum Quenching des Fluoreszenzsignals um 50 % (Abbildung 25). Noch deutlicher war die Löschung des Fluoreszenzsignals durch BH_4 und 6-MPH₄, beides Substanzen mit reduziertem Pyrimidopyrazinringsystem. Zudem induzierten BH_4 und 6-MPH₄ eine bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums um 4,1 nm bzw. 14,4 nm in den längerwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums, während Sepiapterin das Fluoreszenzmaximum des Wildtyps von ursprünglich 332,9 nm um 2,2 nm auf 330,7 nm zu kürzeren Wellenlängen (hypsochrome Verschiebung) verschob. Die Bindung von BH_2 zeigte keine Auswirkung auf die Position des Fluoreszenzmaximums. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Bindung der beiden Liganden mit reduziertem Pyrimidopyrazinringsystem zu einem stärker lösemittel exponierten N-Terminus der PAH führte, denn das Peakmaximum der PAH im Komplex mit 6-MPH₄ lag bei 347,3 nm, was beinahe dem Wert von freiem Tryptophan in Lösung entspricht. Bei der Bindung von Sepiapterin dagegen war die Lösemittelzugänglichkeit von W120 gegenüber dem Wildtyp ohne Ligand nochmal reduziert, was auf eine kompaktere Struktur des Enzyms im N-terminalen Bereich hindeutete. Ein reduziertes Pyrimidopyrazinringsystem und ein oxidiertes Pyrimidopyrazinringsystem mit höher oxidierten Seitenkette, wie im Fall von Sepiapterin, zeigten somit entgegengesetzte Effekte auf den N-Terminus der PAH.

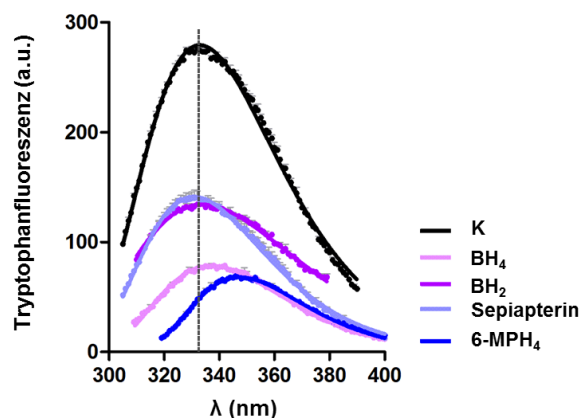


Abbildung 25. Intrinsische Tryptophanfluoreszenzemissionsspektren des PAH-Wildtyps

Die Spektren zeigen den Wildtyp ohne gebundenen Liganden (Kontrolle K) und im Komplex mit 43 μM BH_4 , BH_2 , Sepiapterin oder 200 μM 6-MPH₄. Das Emissionsmaximum (Anregung 295 nm) des PAH-Wildtyps liegt bei 332,9 nm (grau gestrichelte Linie) und wurde wie die anderen Emissionsmaxima durch Annäherung der Spektren an eine schiefe Normalverteilung (Rooney and Lee 1986) berechnet. Alle Emissionsspektren basieren jeweils auf drei unabhängigen Messungen bei 25 °C. Die Standardabweichung ist für jeden Punkt als grauer Balken angegeben.

4.3.9 BH_4 , BH_2 und Sepiapterin erhöhen die Aktivierungsenergie des PAH-Wildtyps

Im Kapitel 4.2.7 erfolgte die kinetische und thermodynamische Analyse der Entfaltung des PAH-Wildtyps. Nun sollte der Effekt der Liganden BH_4 , BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄ auf die Aktivierungsenergie sowie thermodynamische Parameter des Wildtyps analysiert werden.

Abbildung 26 zeigt die zeitabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps im Komplex mit jeweils einem der vier Liganden bei fünf verschiedenen Temperaturen die so gewählt waren, dass sie deutlich unterhalb der Temperatur liegen, bei der eine irreversible Aggregation der Probe erfolgen kann. Den Endpunkt der Einzelmessungen markierte jeweils ein fehlender Anstieg der ANS-Fluoreszenzintensität über die Zeit, da aufgrund der vollständigen Entfaltung des Wildtyps alle hydrophoben Bereiche des Enzyms mit ANS abgesättigt waren.

Die Rohdaten der vier Diagramme aus Abbildung 26 zeigen die unterschiedliche Wirkung der Liganden auf die Entfaltungskinetiken des Wildtyps; während durch Bindung von BH_4 im aktiven Zentrum die Entfaltung des Enzyms bei den beiden niedrigsten Temperaturen über 90 min aufgezeichnet werden konnte, war der Prozess der Entfaltung bei Bindung von 6-MPH₄ auch bei den beiden niedrigsten Temperaturen bereits nach 25 min abgeschlossen. Die Entfaltungskinetiken von BH_2 und Sepiapterin waren in ihrer Zeitabhängigkeit vergleichbar, aber auch sie konnten das Enzym nicht in dem Ausmaß stabilisieren, wie es mit BH_4 als Ligand der Fall war.

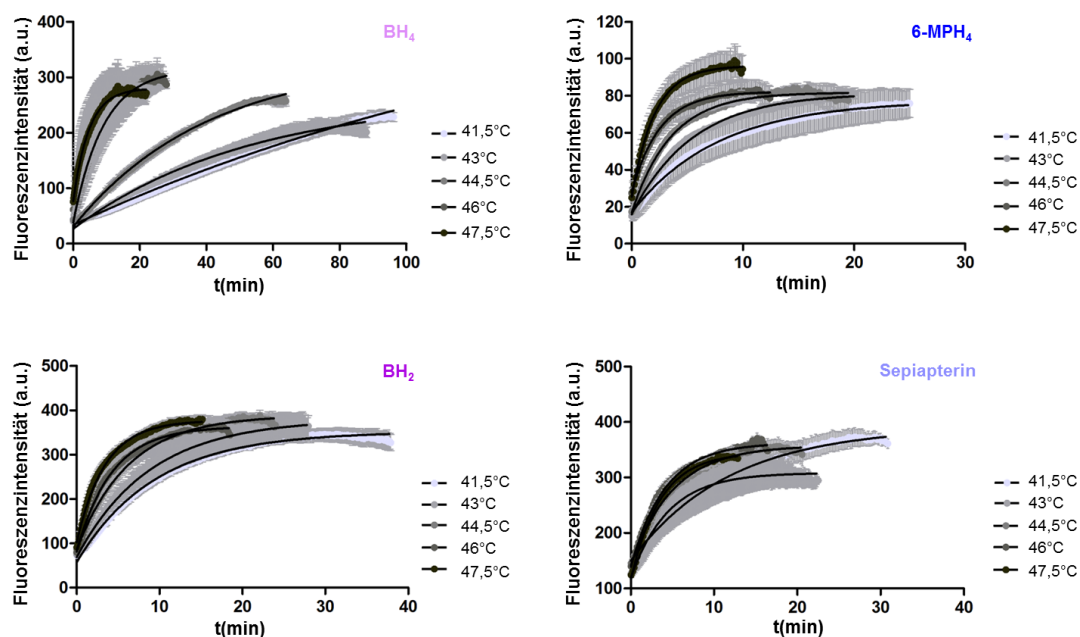


Abbildung 26. Entfaltungskinetiken des PAH-Wildtyps

Die ansteigenden ANS-Fluoreszenzkurven, zeigen die zeitabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps im Komplex mit 43 μM BH_4 , BH_2 , Sepiapterin oder 200 μM 6-MPH₄ bei fünf unterschiedlichen Temperaturen. Die Kurven wurden gemittelt aus den Rohdaten von drei Einzelmessungen und die Standardabweichung zwischen den einzelnen Messungen wird durch die grauen Fehlerbalken angezeigt. Alle fünf Kurven wurden jeweils an eine Exponentialfunktion erster Ordnung angenähert (schwarze durchgezogene Linien), um daraus den Wert der Geschwindigkeitskonstanten k der zeitabhängigen Entfaltung zu berechnen.

Um die Geschwindigkeitskonstante k für jede einzelne Temperatur zu berechnen, wurden alle gemessenen Entfaltungskinetiken aus Abbildung 26 an eine Exponentialfunktion erster Ordnung angenähert. Durch Auftragen des natürlichen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur, konnten die Geschwindigkeitskonstanten in einem Arrhenius-Plot auf einer Geraden abgebildet werden (Abbildung 27A). Durch Anwendung der Arrhenius-Gleichung (Kapitel 3.6.3) konnte die Aktivierungsenergie E_A für den Übergang des Wildtyps im Komplex mit einem der vier Liganden aus dem nativen in den entfalteten Zustand berechnet werden. Abbildung 27B zeigt, dass die Bindung von BH_4 im aktiven Zentrum der PAH zu einem Anstieg der Aktivierungsenergie um Faktor 1,5 im Vergleich zum Wildtyp ohne Liganden führte. Die Bindung von BH_2 und Sepiapterin induzierte nur einen leichten Anstieg der Aktivierungsenergie, während die Bindung von 6-MPH₄ eine Abnahme um 35 % gegenüber der Kontrolle zur Folge hatte. Auch dieses Experiment unterstrich die Bedeutung der Dihydroxypropylseitenkette bezüglich der Fähigkeit der vier Liganden einen stabilisierenden Einfluss auf den Wildtyp auszuüben. Denn während BH_4 , BH_2 und Sepiapterin die zeitabhängige Entfaltung des Wildtyps in unterschiedlichem Ausmaß verzögern konnten, war 6-MPH₄ aufgrund der verkürzten Seitenkette nicht dazu in der Lage den nativen Grundzustand des Enzyms zu stabilisieren und damit die Kinetik der Entfaltung zu beeinflussen.

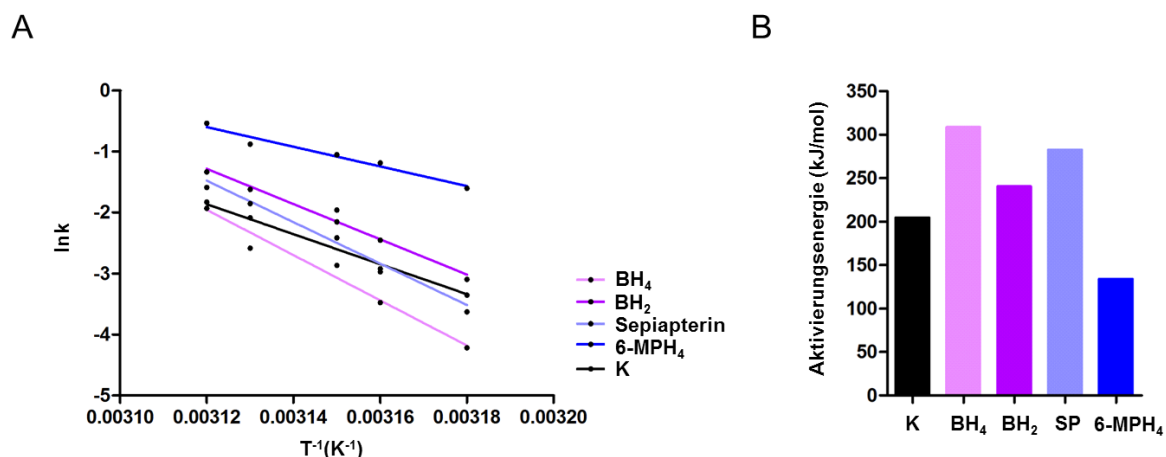


Abbildung 27. Arrhenius-Plot und Aktivierungsenergien des PAH-Wildtyps

(A) Im Arrhenius-Plot aufgetragen wurden jeweils die aus den Kinetikmessungen berechneten Geschwindigkeitskonstanten k gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur in Kelvin für den PAH-Wildtyp (Kontrolle K) sowie das Wildtypenzym im Komplex mit BH_4 , BH_2 , Sepiapterin oder 6-MPH₄. Die Messpunkte konnten jeweils durch eine lineare Regression angenähert werden. (B) Aus der Steigung der Geraden im Arrhenius-Plot multipliziert mit der universellen Gaskonstante, konnten die Aktivierungsenergien für die Entfaltung des Wildtyps ohne und mit Ligand berechnet werden.

Die Werte der zugehörigen thermodynamischen Parameter ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger der zeitabhängigen Entfaltung des Wildtyps im Komplex mit den vier Liganden sind in Tabelle 24 zusammengefasst und zeigen eine leichte Abnahme der Gibbs-Energie und Reaktionsenthalpie, sowie kaum Veränderungen der Reaktionsentropie mit zunehmender Temperatur für den Prozess der Entfaltung an.

	T(°C)	k	T(K)	T ⁻¹ (K ⁻¹)	lnk	lnT	ΔG [#] (J/mol)	ΔH [#] (J/mol)	ΔS [#] (J/mol*K)
BH ₄	41,5	0,01474	314,65	0,00318	-4,217	5,7514	88234,15	305931,69	691,87
	43	0,03094	316,15	0,00316	-3,475	5,7562	86718,31	305919,22	693,34
	44,5	0,05681	317,65	0,00315	-2,868	5,7609	85537,45	305906,75	693,74
	46	0,07534	319,15	0,00313	-2,585	5,7656	85204,82	305894,28	691,49
	47,5	0,1604	320,65	0,00312	-1,830	5,7703	83603,28	305881,81	693,21
BH ₂	41,5	0,04515	314,65	0,00317	-3,097	5,7514	85305,73	237894,86	484,94
	43	0,08597	316,15	0,00316	-2,453	5,7562	84032,15	237882,39	486,63
	44,5	0,1407	317,65	0,00314	-1,961	5,7609	83142,33	237869,92	487,10
	46	0,1977	319,15	0,00313	-1,621	5,7656	82644,97	237857,45	486,33
	47,5	0,2633	320,65	0,00311	-1,334	5,7703	82282,01	237844,98	485,14
SP	41,5	0,02656	314,65	0,00317	-3,628	5,7514	86693,74	280148,70	614,82
	43	0,05372	316,15	0,00316	-2,923	5,7562	85268,09	280136,23	616,37
	44,5	0,1162	317,65	0,00314	-2,152	5,7609	83647,59	280123,76	618,53
	46	0,1563	319,15	0,00313	-1,855	5,7656	83268,45	280111,29	616,77
	47,5	0,2037	320,65	0,00311	-1,591	5,7703	82966,19	280098,82	614,79
6-MPH ₄	41,5	0,2014	314,65	0,00317	-1,602	5,7514	81394,02	131470,39	159,14
	43	0,305	316,15	0,00316	-1,187	5,7562	80703,68	131457,92	160,53
	44,5	0,3491	317,65	0,00314	-1,052	5,7609	80742,43	131445,44	159,61
	46	0,4153	319,15	0,00313	-0,878	5,7656	80675,47	131432,97	159,03
	47,5	0,5843	320,65	0,00311	-0,537	5,7703	80156,97	131420,50	159,87

Tabelle 24. Berechnete Geschwindigkeitskonstanten und thermodynamische Parameter

Die Geschwindigkeitskonstanten k für die Entfaltung des PAH-Wildtyps im Komplex mit jeweils 43 μM BH₄, BH₂, Sepiapterin (SP) oder 200 μM 6-MPH₄ wurden aus dem Fit jeder Kinetik (Abbildung 276) mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung berechnet. Die thermodynamischen Parameter der Gibbs-Energie ΔG^\ddagger , der Reaktionsenthalpie ΔH^\ddagger und der Reaktionsentropie ΔS^\ddagger konnten unter Anwendung der Eyring Theorie des Übergangszustandes aus der statistischen Thermodynamik und der Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vier Liganden unterschiedliche Effekte auf den PAH-Wildtyp ausübten. Thermische Entfaltungsassays zeigten einen stabilisierenden Effekt durch den natürlichen Kofaktor der PAH – BH₄ – und das oxidierte Analogon BH₂. Dies stimmte auch gut mit den DLS-Ergebnissen überein, die sogar daraufhin deuteten, dass durch die Bindung aller Liganden im aktiven Zentrum des Enzyms globale, konformative Änderungen induziert werden, die das Enzym in einen stabileren, da kompakteren *t-state* ähnlichen Zustand überführen. Diese durch Bindung der Liganden induzierten globalen konformativen Änderungen hatten auch Auswirkungen auf die regulatorische Domäne der PAH und zeigten sich in lokalen Änderungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von W120. Liganden mit einem reduzierten Pterinringsystem wie BH₄ und 6-MPH₄ induzierten eine bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums in den längerwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums, die mit einem starken Quenching der Tryptophanfluoreszenz einherging.

4.4 Biophysikalische Charakterisierung der PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H

Zu Beginn der Doktorarbeit war die experimentelle Datenlage zu den biochemischen und molekularen Konsequenzen von Mutationen im *PAH*-Gen noch wenig überzeugend, obwohl es sich bei der Phenylketonurie um den Prototyp einer behandelbaren Aminoazidopathie handelt. Daher sollten neben der Charakterisierung des PAH-Wildtyps und der Untersuchung des BH₄-Effektes auch drei PAH-Varianten analysiert werden, die Aminosäureaustausche jeweils in einer der drei funktionellen Domänen des Enzyms aufweisen und BH₄-responsiv sind. Dafür ausgewählt wurden die PAH-Mutationen R68S, R261Q und Y417H. Der Aminosäurerest R68 liegt in der regulatorischen Domäne der PAH und ist über eine Wasserstoffbrückenbindung zu C237 (Abbildung 28A) in der katalytischen Domäne (Thorolfsson *et al.* 2003) in aktivierende konformative Änderungen involviert, die nach Bindung des Substrats L-Phe eintreten. Die beiden anderen Mutationen beeinflussen ein Netzwerk von Seitenketteninteraktionen, die die katalytische Domäne (R261) mit dem Dimerisierungsmotiv der angrenzenden Untereinheit (Y417) verbinden (Abbildung 28B) (Gersting *et al.* 2008). Die ausgewählten Mutationen sind somit an zentralen Positionen im Enzym lokalisiert, die einzelne Untereinheiten miteinander verbinden. Im Folgenden geht es darum, inwieweit die einzelnen Mutationen Konformation und Stabilität der PAH beeinflussen.

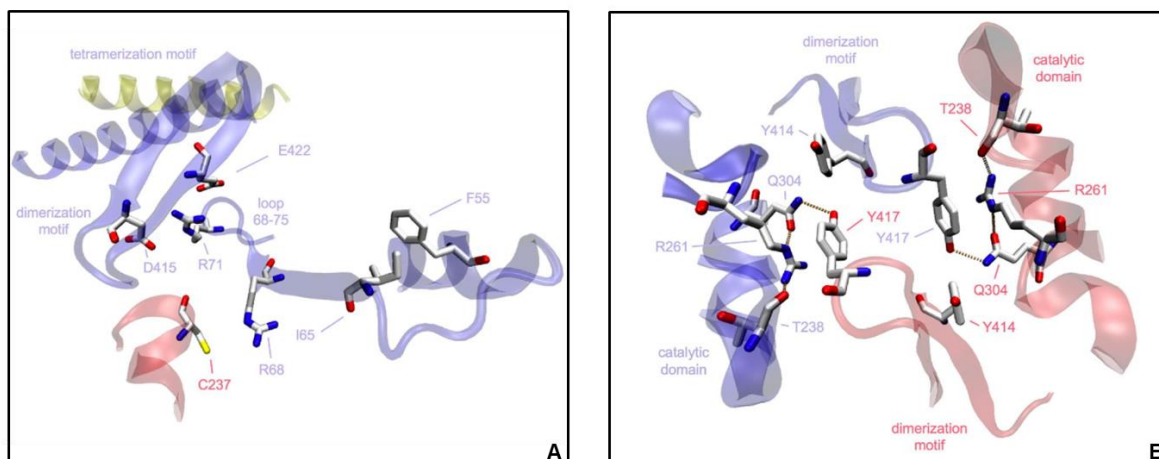


Abbildung 28. Aminosäureinteraktionen im PAH-Wildtyp

Visualisierung ausgewählter Bereiche des PAH-Backbones als Bändermodell, wobei einzelne Aminosäurereste im Stab-Modell hervorgehoben werden. Kohlenstoffatome sind weiß, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau markiert. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. (A) Der Aminosäurerest R68 ist Teil des Loops der durch die Aminosäurereste 68-75 in der regulatorischen Domäne der PAH-Untereinheit A (blaues Bändermodell) ausgebildet wird. Nach Aktivierung des Enzyms durch das Substrat, bildet R68 eine Wasserstoffbrücke zu C237 in der katalytischen Domäne der angrenzenden Untereinheit D aus (rotes Bändermodell). (B) Der Aminosäurerest Y417 ist in einem Loop lokalisiert, der zwei antiparallele β -Faltblätter miteinander verbindet und das Dimerisierungsmotiv ausbildet. Y417 ist zudem in einem Netzwerk mit den Aminosäureresten Q304, R261 und T238 integriert, welches das Dimerisierungsmotiv einer Untereinheit mit der katalytischen Domäne der angrenzenden Untereinheit verbindet. Die Hydroxylgruppe von Y417 bildet eine Wasserstoffbrücke zu Q304 aus und der aromatische Ring von Y417 interagiert mit der positiv geladenen Guanidiniumgruppe von R261. Q304 und T238 sind durch Wasserstoffbrücken mit R261 verknüpft (Gersting *et al.* 2008).

4.4.1 Die drei PAH-Varianten lassen sich als stabile Tetramere aufreinigen

Nach erfolgreicher Reinigung des PAH-Wildtyps (Kapitel 4.2.1), wurde auch für die drei Varianten R68S, R261Q und Y417H zunächst ein Expressionstest unter den gleichen Bedingungen wie für den Wildtyp durchgeführt, um die Löslichkeit der jeweiligen MBP-Fusionsproteine nach rekombinanter Expression in kleinem Volumen zu überprüfen. Für alle drei Varianten konnte bei einer Expressionstemperatur von 28 °C und einer Inkubationszeit von 20 h ausreichend Protein in der löslichen Phase angereichert werden, so dass jeweils 2 L Hauptkultur zur Reinigung angezogen wurden. Wie bereits für den Wildtyp beschrieben, erfolgte nach dem Zellaufschluss die Affinitätschromatographie zur Isolierung und Anreicherung der MBP-Fusionsproteine. In einem zweiten Schritt wurden die Fusionsproteine entsprechend ihrer Größe über eine Gelfiltrationssäule chromatografisch aufgetrennt (Abbildung 29A). Die Elution der varianten PAH-Tetramere erfolgte bei einem Elutionsvolumen von ca. 146 ml, allerdings war die Ausbeute der Fusionsproteine im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert.

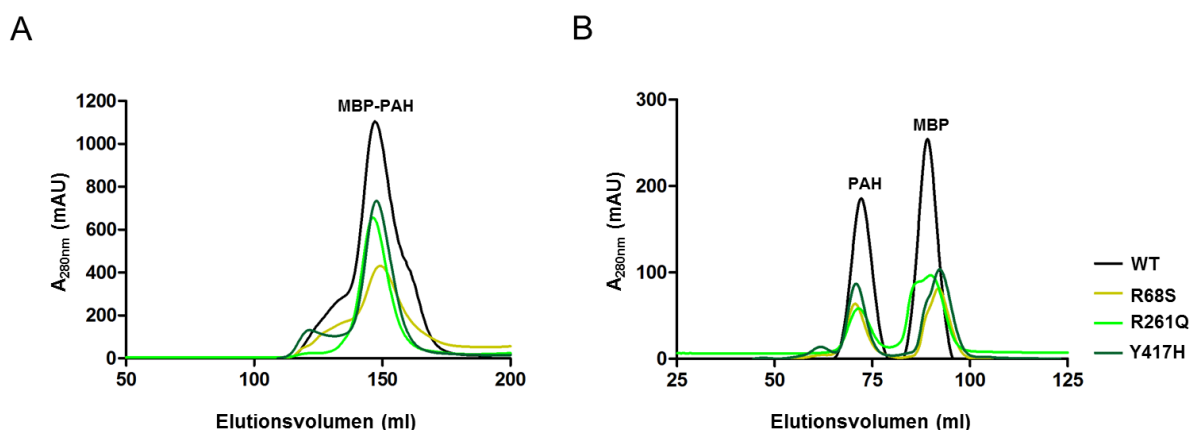


Abbildung 29. Oligomerisierungsprofile der Enzyme ohne und mit Fusionspartner

(A) Das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie zeigt die Absorption der MBP-PAH Fusionsproteine von Wildtyp und Varianten bei einer Wellenlänge von 280 nm. (B) Die Abbildung stellt die größenchromatografische Auftrennung der PAH-Tetramere und ihres Fusionspartners MBP nach Inkubation mit Faktor Xa bei einer Wellenlänge von 280 nm dar.

Die Fraktionen der Tetramere wurden gepoolt, aufkonzentriert und nach Messung der Proteinkonzentration zur Abspaltung des MBP-Fusionspartners über Nacht mit Faktor Xa inkubiert (Kapitel 3.3.2.3). Zur chromatografischen Isolierung der PAH-Tetramere wurde der Schneideansatz anschließend erneut auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (Abbildung 29B). Die Fraktionen der geschnittenen Tetramere wurden gepoolt, aufkonzentriert, die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt und die varianten Proteine bis zu ihrer Verwendung als Aliquots in Flüssigstickstoff gelagert. Während der Reinigung jeder Variante wurde nach den einzelnen Schritten eine Gelprobe abgenommen, in SDS aufgekocht und anschließend in einem diskontinuierlichen Gel (Kapitel 3.3.4) elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 30).

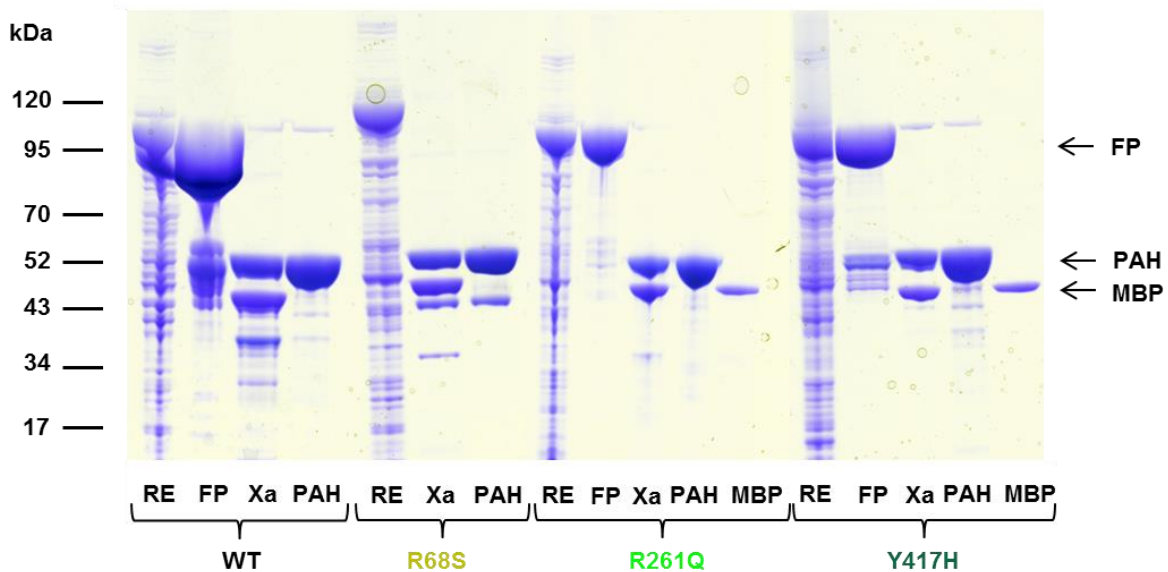


Abbildung 30. SDS-Gel zur Dokumentation einzelner Reinigungsschritte

Das Gel wurde für den PAH-Wildtyp (WT) und die Varianten in vier Bereiche eingeteilt. Aufgetragen wurden jeweils Proben des Rohextraktes (RE) nach dem Aufschluss der Zellen und einem Zentrifugationsschritt. Zudem Proben des nach der ersten Gelfiltrationssäule isolierten MBP-PAH Tetramers (FP), das im SDS-Gel als Monomer bei einer Größe von ca. 95 Kilodalton (kDa) detektierbar ist. Die Xa-Probe zeigt den Schneideansatz des Fusionsproteins mit FaktorXa nach 16 stündiger Inkubationszeit, wobei die obere Bande dem PAH-Monomer bei ca. 52 kDa entspricht und die untere Bande dem abgespaltenen MBP-Fusionspartner bei ca. 43 kDa. Eine Spalte in jedem Bereich stellt die jeweiligen isolierten funktionellen PAH-Tetramere (PAH) ohne MBP dar. Bei der Reinigung von R261Q und Y417H wurde zudem noch eine Probe des abgespaltenen MBPs in der letzten Spalte mit aufgetragen.

4.4.2 PAH-Varianten sind empfindlich gegenüber Hitzestress

Nach erfolgreicher Reinigung der varianten Enzyme R68S, R261Q und Y417H sollte ihr Verhalten gegenüber Hitzestress untersucht werden. Die Daten des DSF-Assays zeigten eine reduzierte Stabilität der PAH-Varianten im Vergleich zum Wildtyp. Dies war bereits an einer Linksverschiebung der Entfaltungskurven aller Varianten gegenüber dem Wildtyp erkennbar (Abbildung 31A). Die anschließende Berechnung der Umschlagpunkte T_{M1} und T_{M2} ergab, dass besonders T_{M1} für alle drei Varianten gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert war (Abbildung 31B). Vor allem die Variante Y417H zeigte mit einem um 12 °C niedrigeren T_{M1} -Wert eine starke Anfälligkeit der regulatorischen Domänen gegenüber Hitzestress.

Die aus den DSF-Daten bei 25 °C abgeleiteten Werte für die Hydrophobizität im nativen Grundzustand zeigten, dass sich die Fluoreszenz der beiden Varianten R261Q und Y417H kaum von der des Wildtyps unterschied (Abbildung 31C), während R68S eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz im Grundzustand um Faktor 2 gegenüber dem Wildtyp zeigte, woraus eine veränderte Oberflächenhydrophobizität für R68S abgeleitet werden kann.

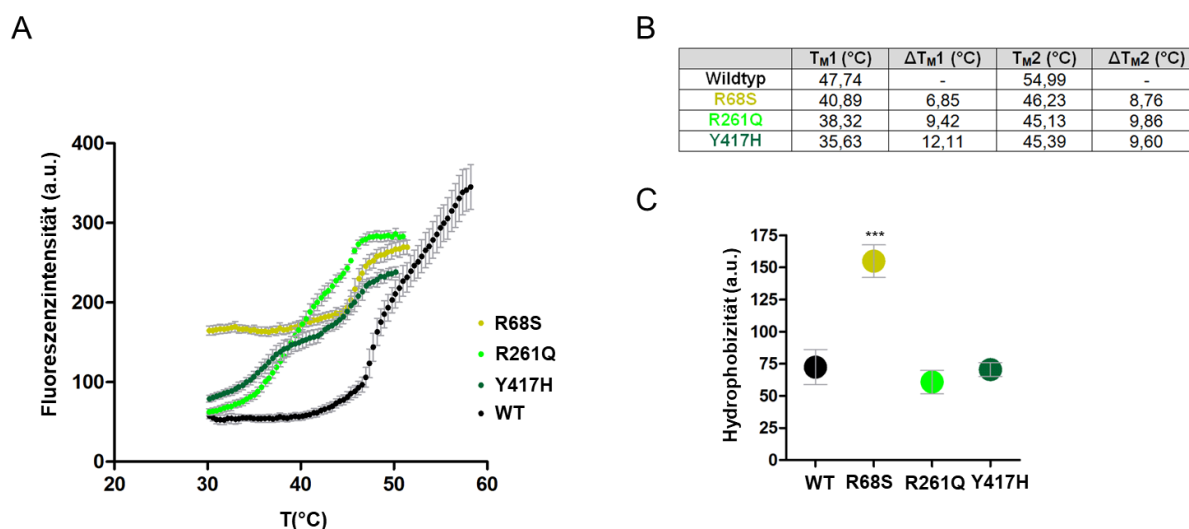


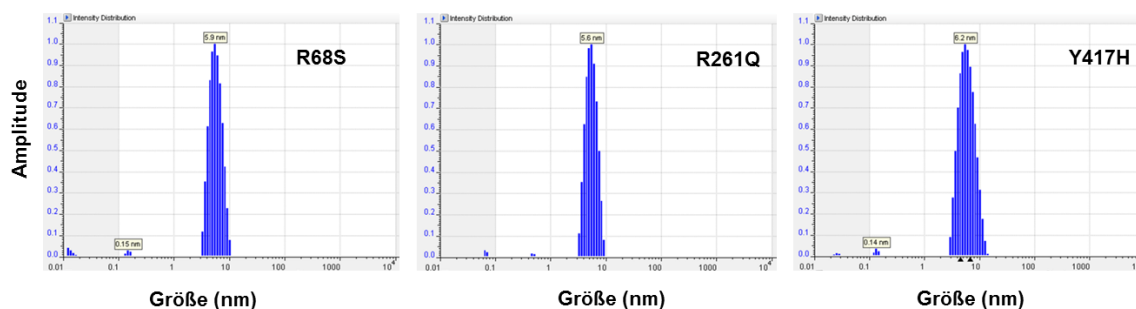
Abbildung 31. Thermische Denaturierung von PAH-Wildtyp und Varianten

(A) Die ansteigenden ANS-Fluoreszenzkurven zeigen die temperaturabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps (WT) und der drei PAH-Varianten. Die Kurve des Wildtyps ist gemittelt aus den Rohdaten von elf Einzelmessungen, die Entfaltungskurven der Varianten basieren auf vier unabhängigen Einzelmessungen. Der Standardfehler zwischen den einzelnen Messungen wird durch die grauen Fehlerbalken angezeigt. (B) Die Tabelle stellt die berechneten Temperaturen der Umschlagpunkte T_{M1} und T_{M2} zusammen. Die Werte wurden durch Boltzman fit der berechneten *unfolded fraction* (Pey *et al.* 2008) ermittelt. Der Temperaturunterschied zwischen Wildtyp und Varianten wurde für den ersten (ΔT_{M1}) und zweiten (ΔT_{M2}) Umschlagpunkt in einer separaten Spalte berechnet. (C) Die Abbildung zeigt die Hydrophobizität des Wildtyps und der Varianten im nativen Zustand bei 25 °C. Auch hierbei diente ANS als Fluoreszenzmarker, der eine Aussage über hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche erlaubte. Die Messwerte basieren auf mindestens zwanzig Einzelwerten und die Standardabweichung zwischen den Einzelwerten wird durch die grauen Fehlerbalken symbolisiert. Die Messwerte wurden einer Varianzanalyse unterzogen (Dunnett's test) bei der alle Messdaten der Varianten mit dem Wildtyp verglichen wurden (***, $p < 0,001$).

4.4.3 Der hydrodynamische Radius von R261Q ist im Vergleich zum Wildtyp kleiner

Bei der Analyse der hydrodynamischen Radien der PAH-Varianten mittels dynamischer Lichtstreuung in Lösung (Kapitel 4.2.5) ging es um die Frage, ob die jeweils vorliegende Mutation globale, konformative Änderungen innerhalb des Tetramers induziert, die sich über eine Änderung der Größe nachweisen lassen (Abbildung 32A). Während sich die Varianten R68S und Y417H in ihrer Größe und ihrem Molekulargewicht (Abbildung 32B) nicht vom PAH-Wildtyp unterschieden, war der hydrodynamische Radius von R261Q gegenüber der Kontrolle um 9,6 % signifikant reduziert (Abbildung 32C). Interessanterweise entsprach der Radius von R261Q dem hydrodynamischen Radius des PAH-Wildtyps im Komplex mit BH_4 , was darauf hindeutet, dass die Variante bereits in Abwesenheit des natürlichen Kofaktors eine durch die Mutation induzierte, kompaktere Konformation aufweist als der Wildtyp. Dafür spricht auch das geringere Molekulargewicht von R261Q mit einem gegenüber dem Wildtyp um 22 % verringerten Wert.

A



B

	R_H	Peakfläche	Molekulargewicht
WT	6,18 nm	100 %	248,38 kDa
R68S	6,03 nm	99,6 %	219,99 kDa
R261Q	5,58 nm	100 %	194,33 kDa
Y417H	6,12 nm	99,4 %	247,33 kDa

C

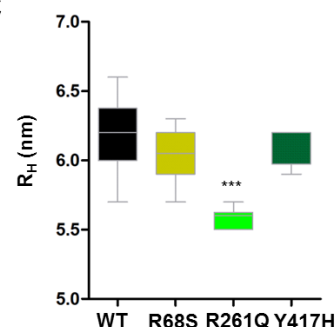


Abbildung 32. Hydrodynamischer Radius von PAH-Wildtyp und Varianten

(A) Die DLS-Größenverteilungen zeigen exemplarisch nur ein Beispiel aus den jeweiligen Einzelmessungen der drei Varianten bei 25 °C. Der Hauptpeak in den drei Abbildungen ist auf die Lichtstreuung des PAH-Tetramers zurückzuführen und gibt den hydrodynamischen Radius des Enzyms in Nanometer an. (B) Die Tabelle fasst die Ergebnisse der DLS-Messungen zusammen. Hydrodynamischer Radius R_H in Nanometer, prozentuale Peakfläche und Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) des PAH-Wildtyps (WT) und der drei Varianten konnte durch Messung der zeitabhängige Intensität des gestreuten Lichtes und der zugehörigen zeitabhängigen Intensitäts-Autokorrelationsfunktion berechnet werden. (C) Im Boxplot aufgetragen sind die berechneten Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Einzelmessungen des hydrodynamischen Radius des Wildtyps und der drei Varianten. Für die Varianzanalyse (Dunnett's test) wurden alle Messdaten des Wildtyps mit den Mittelwerten der Varianten verglichen (***, $p < 0,001$). Die Standardabweichung ist jeweils als grauer Balken eingezeichnet.

4.4.4 Mutationsbedingte konformative Änderungen führen zu Präaktivierung von R68S

Neben dem PAH-Wildtyp (Kapitel 4.2.6) wurden für die Varianten R68S, R261Q und Y417H Untersuchungen zur intrinsischen Tryptophanfluoreszenz durchgeführt um zu analysieren, ob das Vorliegen von Mutationen zu lokalen Veränderungen in der Proteinstruktur führen kann (Abbildung 33A). Während das Emissionsspektrum von Y417H mit dem Wildtyp vergleichbar war und die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von R261Q nur eine moderate Löschung des Signals im Vergleich zum Wildtyp zeigte, war das Emissionsmaximum des Spektrums von R68S deutlich in den längerwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums verschoben. Das Peakmaximum zeigte eine bathochrome Verschiebung von 11,4 nm im Vergleich zum Emissionspeak des Wildtyps und gleichzeitig war das Fluoreszenzsignal stark gequenchet. Die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums im Spektrum von R68S erinnerte an das intrinsische Tryptophanfluoreszenzspektrum des PAH-Wildtyps nach Zugabe von L-Phe, dessen Bindung nachweislich konformative Änderungen in

der PAH induziert (Kappock *et al.* 1995, Knappskog *et al.* 1996, Davis *et al.* 1997, Chehin *et al.* 1998, Teigen *et al.* 1999, Thorolfsson *et al.* 2002, Stokka *et al.* 2004), die das Enzym von einem *t-state* mit niedriger Energie in einen aktiven *r-state* überführen (Monod *et al.* 1965, Koshland *et al.* 1966). Diese globalen konformativen Änderungen die zur Aktivierung des Enzyms führen, können durch lokale Änderungen in der regulatorischen Domäne nachgewiesen werden, da sie die Tryptophanfluoreszenz von W120 beeinflussen. Sie führen beispielsweise im PAH-Wildtyp mit gebundenem L-Phe zur bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums und zum Anstieg des Fluoreszenzsignals (Abbildung 33B). Das Emissionsspektrum von R68S ist daher mit dem Spektrum des aktivierten PAH-Wildtyps vergleichbar. Zwar zeigte das Fluoreszenzsignal von R68S gegenüber dem Wildtyp eine Abnahme der Intensität, aber die starke Verschiebung in den längerwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums ist identisch. Bei R68S handelt es sich daher um eine Variante, bei der allein durch den Austausch von Arginin durch Serin an Position 68 in der regulatorischen Domäne konformative Änderungen induziert werden, die mit den durch L-Phe induzierten konformativen Änderungen vergleichbar sind und zur Präaktivierung der Variante auch in Abwesenheit von L-Phe führen. Dieser Zusammenhang konnte durch unsere Arbeitsgruppe bereits publiziert werden (Gersting *et al.* 2010).

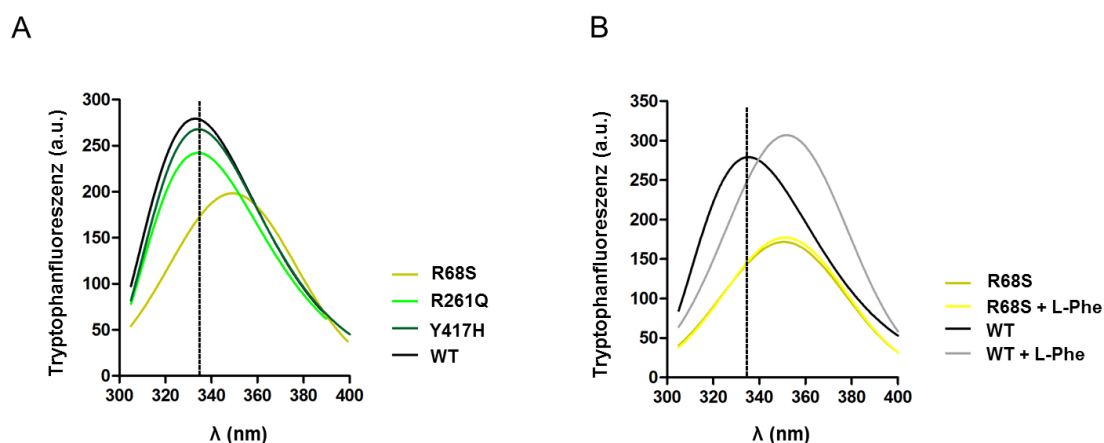


Abbildung 33. Intrinsische Tryptophanfluoreszenzemissionsspektren der Enzyme

(A) Alle an eine schiefe Normalverteilung (Rooney and Lee 1986) angenäherten Spektren wurden im Wellenlängenbereich zwischen 300 und 400 nm aufgezeichnet (Anregung 295 nm) und sind das Ergebnis aus drei unabhängigen Messungen bei 25 °C. Die Position des Emissionsmaximums des Wildtyps von 332,9 nm wird durch die schwarze, gestrichelte Linie dargestellt. (B) Emissionsspektren des PAH-Wildtyps und R68S ohne und mit 1 mM L-Phenylalanin (L-Phe), aufgenommen bei 25 °C.

4.4.5 Die Aktivierungsenergien von Wildtyp und Varianten unterscheiden sich deutlich

Zum Abschluss der Charakterisierung der drei PAH-Varianten wurde die zeitabhängige Entfaltung der Enzyme untersucht. Abbildung 34A zeigt die jeweiligen Kinetiken bei fünf verschiedenen Temperaturen zwischen 38 °C und 48 °C, welche deutlich unterhalb der Temperatur liegen, bei der die Proteine irreversibel aggregieren. Endpunkt der Einzelmessungen war auch hier das Erreichen einer Phase mit gleichbleibender Fluoreszenzintensität über die Zeit (Kapitel 4.2.7).

Die Rohdaten der drei Diagramme aus Abbildung 34A zeigen bereits Unterschiede in den Kinetiken der Varianten. Die zeitabhängige Entfaltung von R68S war bei der niedrigsten Temperatur bereits nach 30 min abgeschlossen, während die Kinetik von Y417H bei der niedrigsten Temperatur über 40 min aufgezeichnet werden konnte. Überraschende Ergebnisse zeigten die Kinetiken der Variante R261Q, denn alle fünf zeitabhängigen Entfaltungskurven konnten über einen längeren Zeitraum gemessen werden als es für den PAH-Wildtyp der Fall war (vgl. Abbildung 15). Ausgewertet wurden alle Kinetiken durch Annäherung der Kurven an eine Exponentialfunktion erster Ordnung, woraus die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten k für jede einzelne Temperatur und Variante berechnet werden konnten. Durch Auftragen des natürlichen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur konnten die Werte in einem Arrhenius-Plot auf einer Geraden abgebildet (Abbildung 34B) und die Aktivierungsenergie für den Übergang von Wildtyp und Varianten aus dem nativen in den entfalteten Zustand berechnet werden (Abbildung 34C).

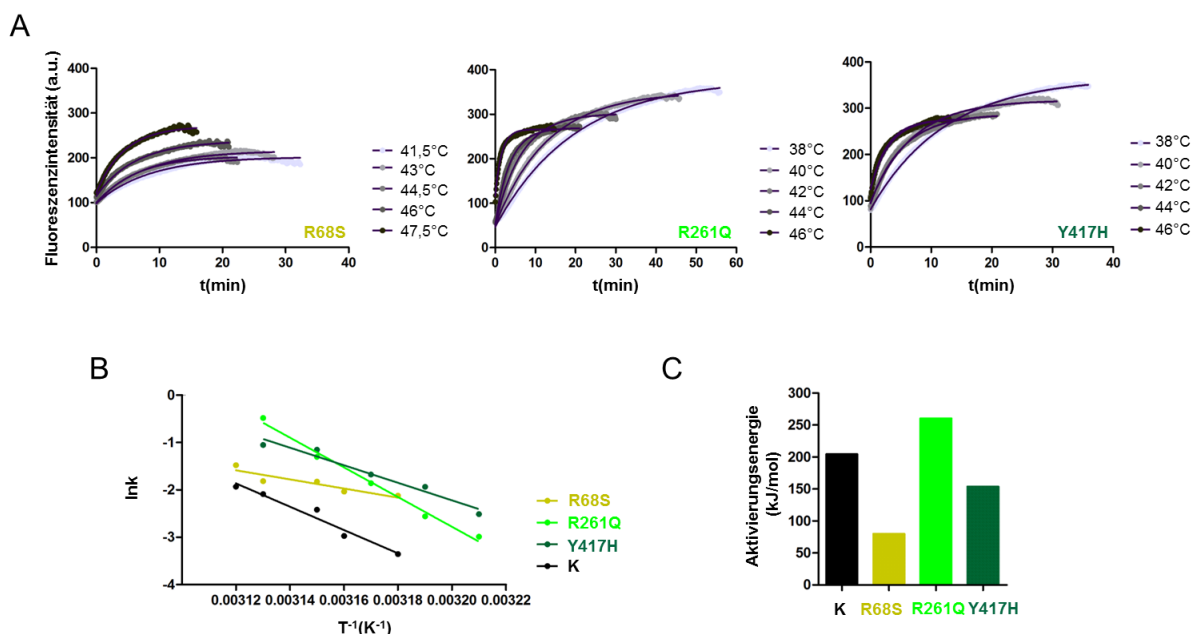


Abbildung 34. Entfaltungskinetiken, Arrhenius-Plot und Aktivierungsenergien

(A) Die ANS-Fluoreszenzkurven sind gemittelt aus den Rohdaten von drei Einzelmessungen und zeigen die zeitabhängige Entfaltung der drei PAH-Varianten bei fünf unterschiedlichen Temperaturen. Durch Annäherung an eine Exponentialfunktion erster Ordnung (schwarze durchgezogene Linien) konnten die Geschwindigkeitskonstanten k der zeitabhängigen Entfaltung berechnet werden. (B) Im Arrhenius-Plot aufgetragen wurden die aus den Kinetiken berechneten Geschwindigkeitskonstanten k gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur für den PAH-Wildtyp (Kontrolle K) und alle drei PAH-Varianten. Die Messpunkte konnten durch eine lineare Regression angenähert werden. (C) Aus der Steigung der Geraden im Arrhenius-Plot konnten die Aktivierungsenergien für die Entfaltung des PAH-Wildtyps (Kontrolle K) und der Varianten berechnet werden.

Die Aktivierungsenergie von R68S (79,94 kJ/mol) war gegenüber dem Wildtyp (204,7 kJ/mol) um 60 % reduziert. Auch die Aktivierungsenergie von Y417H (153,82 kJ/mol) war niedriger als die des Wildtyps. Dagegen zeigten die Rohwerte der Kinetiken und die Steigung der Arrhenius-Geraden von R261Q bereits, dass die Aktivierungsenergie der Variante vermutlich höher als die des Wildtyps sein würde. Der Wert von 260,66 kJ/mol konnte dies auch

rechnerisch bestätigen und lag knapp 30 % über dem des Wildtyps. Dieses Ergebnis stimmte sehr gut mit den DLS-Daten überein (Kapitel 4.4.3), denn diese zeigten einen im Vergleich zum Wildtyp geringeren hydrodynamischen Radius für R261Q, was auf eine kompaktere Struktur der Variante bereits in Abwesenheit eines Liganden schließen lässt. Diese trägt vermutlich dazu bei, dass der Übergang vom nativen, gefalteten Zustand in den entfalteten Zustand gegenüber dem Wildtyp etwas zeitversetzt erfolgt und sich in einer höheren Aktivierungsenergie manifestiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einzelne *missense* Mutationen charakteristische Effekte auf die lokale und globale Proteinkonformation der PAH zeigten. R68S wies im nativen Zustand deutlich mehr exponierte hydrophobe Gruppen an der Proteinoberfläche auf als der Wildtyp und das Spektrum der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz deutete durch die bathochrome Verschiebung darauf hin, dass die Konformation der Variante im Grundzustand bereits starke Ähnlichkeit mit der Konformation des präaktivierten *r-state* des Wildtyps mit gebundenem L-Phe hat. R261Q hingegen zeigte einen gegenüber dem Wildtyp deutlich kleineren hydrodynamischen Radius, der in seiner Größe mit dem des Wildtyp-BH₄-Komplexes vergleichbar war. Dies deutet darauf hin, dass R261Q bereits ohne Kofaktor eine *t-state* ähnliche Konformation aufweist, die auch erklären würde, warum die Aktivierungsenergie für den Übergang vom nativen Grundzustand in den entfalteten Zustand gegenüber dem Wildtyp erhöht war. Allen Varianten gemeinsam war eine deutliche Instabilität gegenüber Hitzestress, was sich in den reduzierten Umschlagpunkten des DSF-Assays zeigte. Hierbei war die regulatorische Domäne von Y417H besonders anfällig.

4.5 Biophysikalische Charakterisierung der Varianten im Komplex mit BH₄ und den BH₄-Derivaten BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄

Im vorhergehenden Kapitel zeigte sich, dass *PAH missense* Mutationen wie R68S, R261Q und Y417H zu konformativen Veränderungen in der Enzymstruktur führen können, die mit physiologischen *r-state* und *t-state* Konformationen vergleichbar sind, wie sie bei allosterisch regulierten Enzymen nach Bindung von Substrat oder Kofaktor auftreten. Folge dieser strukturellen Veränderungen war ein vom Wildtyp abweichendes Verhalten in allen zur Charakterisierung der Varianten eingesetzten Assays. Besonders im DSF-Assay zeigte sich, dass *missense* Mutationen zur deutlichen Destabilisierung der globalen PAH-Konformation führen. Dieser Zusammenhang konnte bereits durch unsere Arbeitsgruppe publiziert werden (Gersting *et al.* 2008). Im Folgenden ging es daher um die Frage, ob die Bindung des natürlichen Kofaktors der PAH einen stabilisierenden Einfluss auf die Varianten ausüben kann. Darüber hinaus sollte durch den vergleichenden Einsatz der BH₄-Derivate BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ analysiert werden, welche Rolle dabei die beiden charakteristischen Strukturelemente des Kofaktors – das Pyrimidopyrazin-Grundgerüst und die Seitenkette – spielen.

4.5.1 Die Bindung von BH₄ stabilisiert alle Varianten gegenüber Hitzestress

Die Auswertung des DSF-Assays der PAH-Varianten (Kapitel 4.4.2) zeigte, dass sie sensibler auf Hitzestress reagieren als der Wildtyp, denn die Entfaltung der einzelnen Domänen setzte bei allen Varianten bei deutlich niedrigeren Temperaturen ein. Nun sollte analysiert werden, wie sich die Bindung der Liganden auf die thermische Entfaltung der Varianten auswirkt und wie sich die Hydrophobizität der Komplexe verändert.

Die Bindung von BH₄ im aktiven Zentrum von R68S stabilisierte die Entfaltung (Tabelle 25) der regulatorischen (2,2 °C) und katalytischen Domänen (5,3 °C) und führte zur signifikanten Abnahme der an der Oberfläche exponierten hydrophoben Gruppen, so dass die Hydrophobizität des R68S-BH₄-Komplexes mit der des Wildtyps vergleichbar war (Abbildung 35). BH₂ konnte zwar die Temperatur des zweiten Umschlagpunktes um 2 °C erhöhen, führte allerdings zur signifikanten Zunahme der Hydrophobizität von R68S. Sepiapterin zeigte nach BH₄ die stärkste Stabilisierung der katalytischen Domänen gegen angelegten Hitzestress (4,2 °C) und konnte auch die Hydrophobizität der Variante leicht absenken, allerdings längst nicht auf das durch BH₄-Bindung erreichte Niveau. Die Bindung von 6-MPH₄ im aktiven Zentrum hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die thermische Denaturierung von R68S bzw. die an der Oberfläche exponierten hydrophoben Gruppen.

		T _{M1} (°C)	ΔT _{M1} (°C)	T _{M2} (°C)	ΔT _{M2} (°C)
R68S	Kontrolle	40,89	-	46,23	-
	BH ₄	43,06	2,17	51,51	5,28
	BH ₂	41,33	0,45	48,26	2,04
	Sepiapterin	40,89	0,01	50,38	4,15
	6-MPH ₄	40,35	-0,54	46,50	0,28
R261Q	Kontrolle	38,32	-	45,13	-
	BH ₄	45,11	6,80	51,89	6,76
	BH ₂	40,48	2,17	46,09	0,96
	Sepiapterin	40,96	2,65	46,98	1,86
	6-MPH ₄	37,99	-0,33	45,27	0,15
Y417H	Kontrolle	35,63	-	45,39	-
	BH ₄	44,67	9,04	51,47	6,08
	BH ₂	37,71	2,09	45,43	0,04
	Sepiapterin	38,26	2,64	45,79	0,40
	6-MPH ₄	37,60	1,97	45,12	-0,27

Tabelle 25. Berechnete Umschlagpunkte nach thermischer Denaturierung der Varianten

Die Tabelle zeigt die berechneten Temperaturen der Umschlagpunkte T_{M1} und T_{M2} nach thermischer Denaturierung der Varianten R68S, R261Q und Y417H ohne (Kontrolle) und mit gebundenen Liganden. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und wurden durch Boltzman fit der berechneten *unfolded fraction* (Pey *et al.* 2008) ermittelt. Der Temperaturunterschied zwischen den Enzymen ohne gebundenen Liganden und mit Ligand wurde für den ersten (ΔT_{M1}) und zweiten (ΔT_{M2}) Übergang in einer separaten Spalte berechnet. Die Liganden BH₄, BH₂ und Sepiapterin sind in einer finalen Konzentration von 43 μM eingesetzt worden, für 6-MPH₄ kamen aufgrund der niedrigeren Affinität (Martinez *et al.* 1995) 200 μM zum Einsatz.

Auch die Auswertung der DSF-Assays der Varianten R261Q und Y417H im Komplex mit 6-MPH₄ zeigte keinen bzw. nur einen leichten stabilisierenden Effekt für den ersten Umschlagpunkt von Y417H. Zudem induzierte die 6-MPH₄-Bindung einen signifikanten Anstieg der hydrophoben Gruppen an der Proteinoberfläche beider Varianten, was auf eine Destabilisierung der globalen Konformation beider Enzyme hindeutete. Wie bereits bei R68S, so zeigte BH₄ auch für die Varianten R261Q und Y417H im thermischen

Entfaltungssassay den größten Effekt mit einer Erhöhung beider Übergangstemperaturen um mindestens 6 °C und einer Abnahme der Hydrophobizität beider Varianten im Komplex mit BH₄. Die beiden oxidierten Kofaktoranaloga BH₂ und Sepiapterin zeigten einen ähnlichen Effekt auf die thermische Entfaltung von R261Q und Y417H und stabilisierten vor allem die regulatorischen Domänen beider Varianten um mindestens 2 °C. Auf die Hydrophobizität von R261Q und Y417H hatte die BH₂-Bindung dagegen keinen Einfluss, während Sepiapterin als einziger der vier Liganden zur signifikanten Abnahme der Hydrophobizität von R261Q führte.

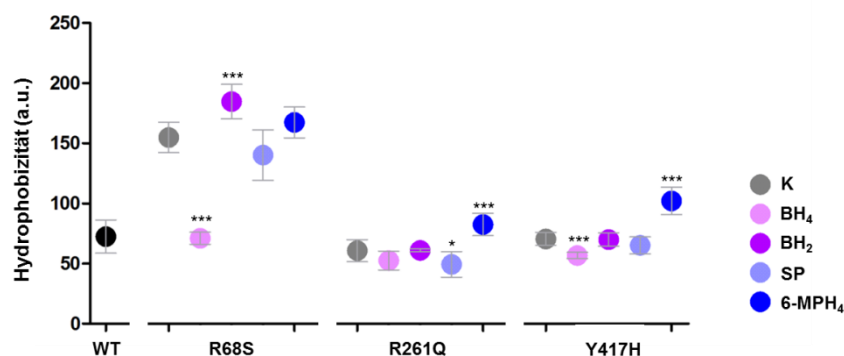


Abbildung 35. Hydrophobizität von PAH-Wildtyp und Varianten

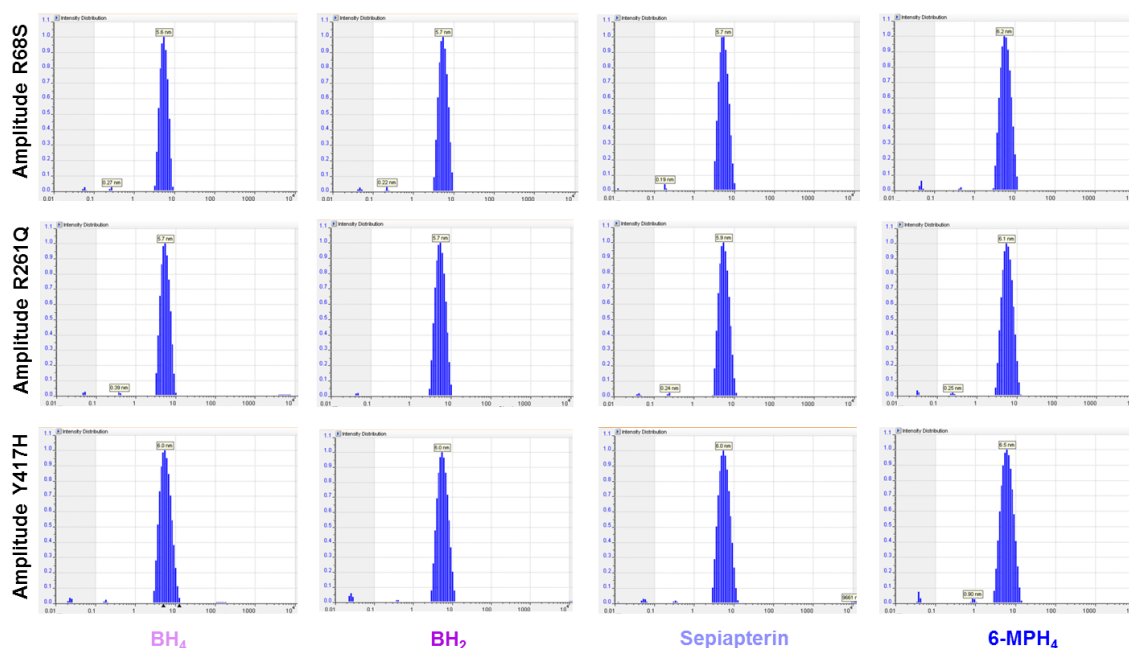
Hydrophobizitätsdaten des PAH-Wildtyps (WT) ohne Ligand und der drei Varianten R68S, R261Q und Y417H ohne gebundene Liganden (Kontrolle K) und mit Liganden bei 25 °C. Als Fluoreszenzmarker für die Analyse der Hydrophobizität im Grundzustand diente ANS. Die Messwerte stellen jeweils den Mittelwert aus mindestens neun Einzelwerten dar und die grauen Fehlerbalken markieren die Standardabweichung zwischen den Einzelwerten. Die Messwerte wurden einer Varianzanalyse unterzogen (Dunnett's test) bei der alle Mittelwerte der Varianten mit gebundenem Liganden mit der jeweiligen Variante ohne gebundenem Ligand verglichen wurde (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).

Zusammenfassend zeigen die DSF-Ergebnisse, dass unter den getesteten Substanzen BH₄ als natürlicher Kofaktor der PAH den stärksten stabilisierenden Effekt gegenüber Hitzestress aufweist. Auch BH₂ und Sepiapterin konnten entweder die regulatorischen oder die katalytischen Domänen aller drei Varianten im DSF-Assay stabilisieren, allerdings war der Effekt weit weniger stark ausgeprägt als im Komplex mit BH₄. Das synthetische Kofaktoranalogon 6-MPH₄ mit verkürzter Seitenkette am C6-Ringkohlenstoffatom konnte dagegen keine der drei Varianten stabilisieren und zeigte auf R261Q und Y417H sogar den gegenteiligen Effekt, da die Bindung des Liganden globale konformative Änderungen induzierte, die vermehrt hydrophobe Gruppen an der Enzymoberfläche exponierten und somit zur signifikanten Erhöhung der Hydrophobizität führte, was mit einer Destabilisierung der Enzymkonformation gegenüber Hitzestress einherging. Die Bindung von BH₄ und Sepiapterin im aktiven Zentrum führte bei allen drei Varianten zur Abnahme der Oberflächenhydrophobizität mit globaler Stabilisierung der Proteine.

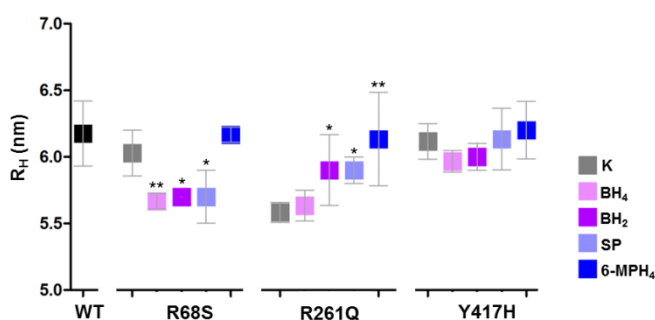
4.5.2 Die Liganden haben unterschiedliche Einflüsse auf den hydrodynamischen Radius

Die Auswertung der DLS-Daten der Varianten ohne gebundene Liganden (Kapitel 4.4.3) zeigte, dass der hydrodynamische Radius von R68S und Y417H mit dem des PAH-Wildtyps vergleichbar war, während R261Q bereits in Abwesenheit eines Liganden eine signifikante Größenabnahme um fast 10 % gegenüber dem Wildtyp aufwies.

A



B



C

	R _H	Peakfläche	MW
R68S	6,03 nm	99,6 %	219,9 kDa
	5,67 nm	99,6 %	196,5 kDa
	5,70 nm	99,6 %	201,5 kDa
	5,70 nm	99,4 %	199,1 kDa
	6,17 nm	100,0 %	245,0 kDa
R261Q	5,58 nm	100,0 %	194,3 kDa
	5,63 nm	100,0 %	200,7 kDa
	5,90 nm	100,0 %	203,3 kDa
	5,90 nm	99,6 %	216,1 kDa
	6,13 nm	99,7 %	236,5 kDa
Y417H	6,12 nm	99,4 %	247,3 kDa
	5,97 nm	100,0 %	228,1 kDa
	6,00 nm	100,0 %	225,8 kDa
	6,13 nm	100,0 %	229,1 kDa
	6,20 nm	99,5 %	276,7 kDa

Abbildung 36. Hydrodynamische Radien von PAH-Wildtyp und Varianten

DLS-Ergebnisse der PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H im Komplex mit 43 μ M BH₄, BH₂, Sepiapterin (SP) oder 200 μ M 6-MPH₄. (A) Die DLS-Größenverteilungen zeigen exemplarisch nur ein Beispiel aus den jeweils drei Einzelmessungen der Varianten bei 25 °C. Der Hauptpeak ist auf die Lichtstreuung des Tetramers zurückzuführen und gibt den hydrodynamischen Radius des Enzyms in Nanometer an. (B) Im Boxplot aufgetragen sind die berechneten Mittelwerte des hydrodynamischen Radius in Nanometer des PAH-Wildtyps (WT) ohne Ligand und der Varianten ohne (Kontrolle K) und mit Liganden. Für die Varianzanalyse (Dunnett's test) wurden alle Messdaten der jeweiligen Variante mit gebundenem Liganden mit der Kontrolle ohne Ligand verglichen (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). Die Standardabweichung ist als grauer Balken angegeben. (C) Die Tabelle fasst die Ergebnisse aller DLS-Messungen zusammen. Hydrodynamischer Radius R_H, prozentuale Peakfläche und Molekulargewicht (MW) in Kilodalton (kDa) der PAH-Varianten ohne Ligand (grau) und mit Liganden (farbkodiert, siehe Abb. B) konnten durch Messung der zeitabhängige Intensität des gestreuten Lichtes und der zugehörigen zeitabhängigen Intensitäts-Autokorrelationsfunktion berechnet werden.

Für den PAH-Wildtyp konnte bereits gezeigt werden (Kapitel 4.3.7), dass eine Zugabe von BH_4 , BH_2 , Sepiapterin oder 6-MPH_4 zur signifikanten Abnahme des hydrodynamischen Radius führte. Daher ging es im Folgenden darum, den Einfluss der Liganden auf die globale Konformation der Varianten zu analysieren. Die Zugabe von BH_4 , BH_2 und Sepiapterin führte bei den jeweiligen R68S-Komplexen zur signifikanten Abnahme der hydrodynamischen Radien (Abbildung 36A und B). Dazu passten auch die um ca. 20 kDa niedrigeren Werte für das hypothetische Molekulargewicht der Komplexe, die aus den jeweiligen zeitabhängigen Intensitäts-Autokorrelationsfunktionen berechnet werden konnten (Abbildung 36C). Der R68S- 6-MPH_4 -Komplex zeigte dagegen eine leichte Zunahme des hydrodynamischen Radius von 6,0 nm auf 6,2 nm und konnte aufgrund der fehlenden Seitenkette als einziger Ligand das Enzym nicht in eine stabilere, *t-state* ähnliche Konformation überführen. Auch die Analyse der Varianten R261Q und Y417H zeigte, dass die Bindung von 6-MPH_4 keinen globalen stabilisierenden Effekt ausüben konnte, denn die Werte für die hydrodynamischen Radien und das abgeleitete Molekulargewicht waren gegenüber den Varianten ohne Liganden deutlich erhöht. Dieses Ergebnis stimmte gut mit den Hydrophobizitätsdaten der jeweiligen Varianten überein, denn auch hier führte die Bindung von 6-MPH_4 an R261Q und Y417H zum Anstieg der hydrophoben Gruppen an der Proteinoberfläche und somit zu einer insgesamt weniger stabilen globalen Proteinkonformation. Interessant waren die DLS-Ergebnisse für R261Q. Diese Variante zeigte bereits in Abwesenheit eines Liganden eine durch die Mutation verursachte, kompaktere Konformation als der Wildtyp (Kapitel 4.4.3) und keiner der vier Liganden konnte den *t-state* ähnlichen Zustand noch weiter verbessern. Die Bindung von BH_4 und BH_2 im aktiven Zentrum von Y417H induzierte eine leichte Abnahme des hydrodynamischen Radius, während Sepiapterin keinen nennenswerten Effekt im DLS-Assay zeigte.

4.5.3 Intrinsische Tryptophanfluoreszenzspektren zeigen lokale Effekte der Liganden

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Bindung der Liganden BH_4 , BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH_4 globale, konformative Änderungen in den PAH-Varianten induzieren. Um lokale Veränderungen in der regulatorischen Domäne nach Ligandenbindung zu erkennen, eignet sich die Untersuchung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz. Für den PAH-Wildtyp konnte bereits gezeigt werden (Kapitel 4.3.8), dass die Bindung von BH_4 und 6-MPH_4 eine bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums einschließlich Löschung des Fluoreszenzsignals verursacht. Sepiapterin und BH_2 induzierten dagegen nur ein moderates Quenching und im Fall von Sepiapterin auch eine leichte hypsochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums. Die Fluoreszenzspektren der Varianten R261Q und Y417H waren mit dem des Wildtyps vergleichbar (Kapitel 4.4.4), während R68S aufgrund der Präaktivierung der Variante, bereits in Abwesenheit eines Liganden eine starke bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums aufzeigte. Daher ging es im nächsten Schritt um die Auswirkung der Ligandenbindung auf die Varianten.

BH_4 und BH_2 zeigten eine moderate Löschung des Tryptophanfluoreszenzsignals von R68S sowie eine leichte hypsochrome Verschiebung des Maximums um 5,1 nm nach BH_4 -Bindung

(Abbildung 37). Eine stärkere Löschung des Fluoreszenzsignals trat durch Bindung von Sepiapterin und 6-MPH₄ auf. Sepiapterin zeigte zudem eine hypsochrome Verschiebung des Peaks um 9,7 nm. Für die Bindung der Liganden an R261Q und Y417H konnte ein ähnliches solvatochromisches Verhalten von W120 beobachtet werden. Die Fluoreszenzmaxima zeigten eine bathochrome Verschiebung von 4,4 nm (R261Q) bzw. 3,7 nm (Y417H) nach BH₄-Bindung, während BH₂ zwar ein Quenching der Signale verursachte, allerdings ohne die Position der Fluoreszenzmaxima zu verändern. Sepiapterin führte zur hypsochromen Verschiebung von 2,6 nm für R261Q und 2,1 nm für Y417H und zeigte in beiden Fällen nur eine moderate Löschung der Fluoreszenzintensität. Die 6-MPH₄-Bindung hatte in beiden Varianten den stärksten Effekt auf die lokale Umgebung von W120. Die sehr starke Reduktion der Quantenausbeute ging mit einer bathochromen Verschiebung des Fluoreszenzmaximums um 14,0 nm für R261Q und 13,6 nm für Y417H einher. Damit konnten die beiden Peakmaxima bei einer Emissionswellenlänge von 352,5 nm (R261Q) und 352,8 nm (Y417H) gemessen werden und entsprachen der Wellenlänge, die normalerweise für freies Tryptophan in wässriger Lösung gemessen werden kann. Das deutete darauf hin, dass W120 durch 6-MPH₄-Bindung vermehrt wässriger Umgebung ausgesetzt wurde, was durch partielle Entfaltung der regulatorischen Domänen von R261Q und Y417H erklärt werden kann. Dieser Effekt trat im Fall von R68S nicht so offensichtlich in Erscheinung, da bei dieser Variante bereits ohne Ligand davon ausgegangen werden muss, dass der N-Terminus partiell entfaltet vorliegt und die Bindung von 6-MPH₄ in diesem Zusammenhang keinen Unterschied macht.

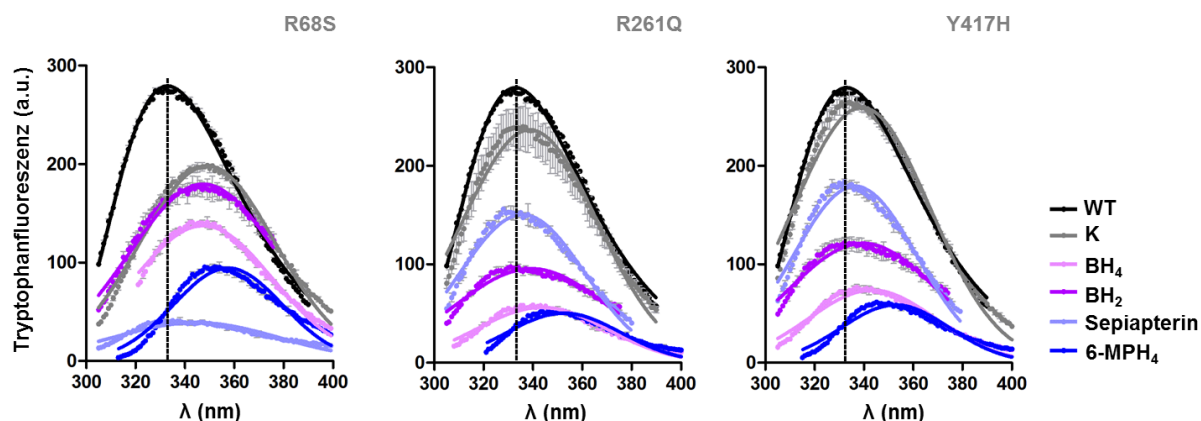


Abbildung 37. Intrinsische Tryptophanfluoreszenzemissionsspektren der Enzyme

Die Spektren zeigen die PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H ohne Liganden (Kontrolle K, grau) und im Komplex mit 43 µM BH₄, BH₂, Sepiapterin oder 200 µM 6-MPH₄. Alle Spektren der Varianten wurden zur Berechnung des Peakmaximums an eine Gauss-Funktion angenähert, das des Wildtyps (WT, schwarzer Fit) an eine schiefe Normalverteilung (Rooney and Lee 1986). Für das Spektrum des Wildtyps ohne gebundenen Liganden konnte ein Emissionsmaximum von 332,9 nm berechnet werden (gestrichelte Linie). Alle Emissionsspektren basieren jeweils auf drei unabhängigen Messungen bei 25 °C und die Standardabweichung ist für jeden Punkt als grauer Balken eingezeichnet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die beiden nicht präaktivierten Varianten R261Q und Y417H nur eine moderate Verschiebung der Fluoreszenzmaximums in den längerwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums nach BH₄-Bindung gemessen

werden konnte. Diese Verschiebung war nach Bindung von 6-MPH₄ deutlich stärker ausgeprägt. Interessanterweise induzierte nicht nur Sepiapterin, sondern auch BH₄ im Fall der strukturell präaktivierten Variante R68S eine hypsochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums und mit Sepiapterin war diese Verschiebung in den kürzerwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums für R68S sogar doppelt so stark wie für die beiden anderen nicht präaktivierten Varianten. Für die BH₂-Komplexe konnten keine solvatochromischen Eigenschaften aufgezeichnet werden.

4.5.4 Die Bindung von BH₄ stabilisiert den nativen Grundzustand aller Varianten

Abschließend sollte der Effekt aller Liganden auf Aktivierungsenergie und thermodynamische Parameter für den Übergang vom nativen, gefalteten Zustand in den entfalteten Zustand untersucht werden, um so die durch die Bindung induzierten lokalen und globalen Änderungen zu quantifizieren. Im Kapitel 4.4.5 wurde gezeigt, dass die Aktivierungsenergie von R261Q unter vergleichbaren Bedingungen höher war als die des Wildtyps, während die Werte der beiden anderen Varianten deutlich reduziert waren. Vor allem die Zugabe des natürlichen Kofaktors BH₄ führte im Falle des Wildtyps zum Anstieg der Aktivierungsenergie (Kapitel 4.3.9). Daher sollte auch für die Varianten der Einfluss von BH₄ und seinem oxidierten Analogon BH₂ auf die Kinetik der Entfaltung analysiert werden. Erneut diente ANS als Fluoreszenzmarker für die zeitabhängige Entfaltung der drei Varianten bei fünf unterschiedlichen Temperaturen. Jede Entfaltungskurve konnte an eine Exponentialfunktion erster Ordnung angenähert und die Geschwindigkeitskonstante k für jede Temperatur daraus berechnet werden. Die Werte konnten abschließend in einem Arrhenius-Plot auf einer Geraden abgebildet und mit dem Wildtyp und der jeweiligen Variante ohne Ligand als Kontrolle verglichen werden (Abbildung 38).

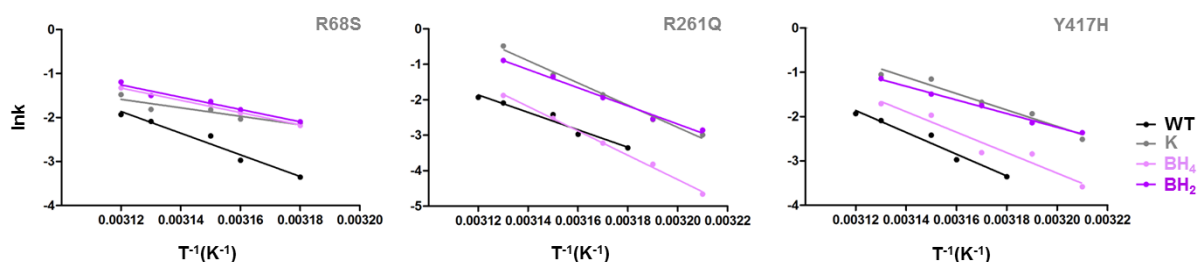


Abbildung 38. Arrhenius-Plots von PAH-Wildtyp und Varianten

Die Abbildungen zeigen die Arrhenius-Plots des PAH-Wildtyps (WT, schwarz) und der Varianten R68S, R261Q und Y417H ohne Liganden (Kontrolle K, grau) und im Komplex mit 43 μM BH₄ oder BH₂. Aufgetragen wurden die aus den jeweiligen Kinetikmessungen berechneten Geschwindigkeitskonstanten k gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur in Kelvin für alle Enzyme. Die Messpunkte konnten jeweils durch eine lineare Regression angenähert werden.

Durch Anwendung der Arrhenius-Gleichung (Kapitel 3.6.3) konnte aus der Steigung der jeweiligen Geraden die Aktivierungsenergie für den Übergang von Wildtyp und Varianten ohne Ligand und im Komplex mit BH₄ oder BH₂ aus dem nativen in den entfalteten Zustand berechnet werden (Abbildung 39).

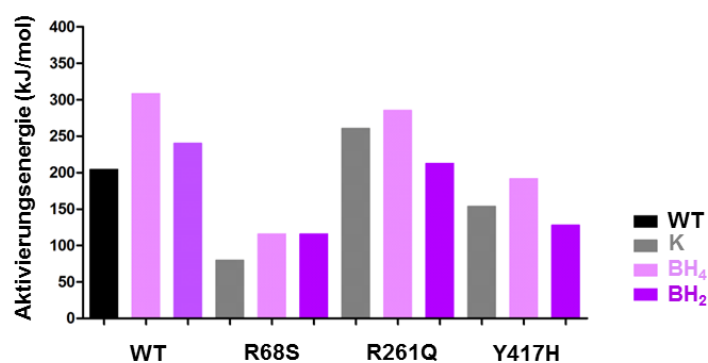


Abbildung 39. Aktivierungsenergien von PAH-Wildtyp und Varianten

Die Abbildung zeigt die Aktivierungsenergien für den Übergang des PAH-Wildtyps (WT, schwarz) und der Varianten R68S, R261Q und Y417H ohne Liganden (Kontrolle K, grau) und im Komplex mit 43 µM BH₄ oder BH₂ aus dem nativen in den entfalteten Zustand.

Der natürliche Kofaktor BH₄ stabilisierte die native Konformation des Wildtyps und der drei Varianten, indem er die Aktivierungsenergie für den Übergang vom nativen in den entfalteten Zustand erhöhte.

	T(°C)	k	T(K)	T ⁻¹ (K ⁻¹)	lnk	lnT	ΔG [#] (J/mol)	ΔH [#] (J/mol)	ΔS [#] (J/mol·K)
R68S	41,5	0,1197	314,65	0,00318	-2,122	5,7514	82755,14	77326,94	-17,25
	43,0	0,1308	316,15	0,00316	-2,034	5,7562	82929,05	77314,47	-17,75
	44,5	0,1610	317,65	0,00315	-1,826	5,7609	82786,40	77301,99	-17,26
	46,0	0,1628	319,15	0,00313	-1,815	5,7656	83160,33	77289,52	-18,39
	47,5	0,2280	320,65	0,00312	-1,478	5,7703	82665,75	77277,05	-16,80
R68S + BH ₄	41,5	0,1129	314,65	0,00318	-2,181	5,7514	82908,14	113369,91	96,81
	43,0	0,1505	316,15	0,00316	-1,893	5,7562	82560,38	113357,44	97,41
	44,5	0,1833	317,65	0,00315	-1,696	5,7609	82443,82	113344,97	97,28
	46,0	0,2225	319,15	0,00313	-1,502	5,7656	82331,40	113332,50	97,13
	47,5	0,2661	320,65	0,00312	-1,323	5,7703	82253,80	113320,03	96,88
R68S + BH ₂	41,5	0,1229	314,65	0,00318	-2,096	5,7514	82686,12	113536,20	98,05
	43,0	0,1616	316,15	0,00316	-1,822	5,7562	82373,25	113523,73	98,53
	44,5	0,1948	317,65	0,00315	-1,635	5,7609	82283,12	113511,26	98,31
	46,0	0,2235	319,15	0,00313	-1,498	5,7656	82319,50	113498,79	97,69
	47,5	0,3033	320,65	0,00312	-1,193	5,7703	81904,97	113486,31	98,49
R261Q	38,0	0,0503	311,15	0,00321	-2,989	5,7402	84992,86	258069,78	556,24
	40,0	0,0775	313,15	0,00319	-2,557	5,7466	83478,62	258053,15	557,47
	42,0	0,1557	315,15	0,00317	-1,859	5,7530	82201,85	258036,52	557,93
	44,0	0,2722	317,15	0,00315	-1,301	5,7593	81267,28	258019,90	557,31
	46,0	0,6173	319,15	0,00313	-0,482	5,7656	79623,78	258003,27	558,92
R261Q + BH ₄	38,0	0,00944	311,15	0,00321	-4,662	5,7402	89368,66	283013,02	622,35
	40,0	0,02191	313,15	0,00319	-3,820	5,7466	86769,10	282996,39	626,62
	42,0	0,03989	315,15	0,00317	-3,221	5,7530	85769,99	282979,76	625,76
	44,0	0,0801	317,15	0,00315	-2,524	5,7593	84492,75	282963,13	625,79
	46,0	0,1533	319,15	0,00313	-1,875	5,7656	83319,87	282946,50	625,49
R261Q + BH ₂	38,0	0,05742	311,15	0,00321	-2,857	5,7402	84647,58	210345,06	403,98
	40,0	0,07884	313,15	0,00319	-2,540	5,7466	83435,34	210328,43	405,22
	42,0	0,1436	315,15	0,00317	-1,940	5,7530	82413,82	210311,80	405,83
	44,0	0,2579	317,15	0,00315	-1,355	5,7593	81409,57	210295,17	406,39
	46,0	0,4112	319,15	0,00313	-0,888	5,7656	80701,79	210278,54	406,01
Y417H	38,0	0,0812	311,15	0,00321	-2,510	5,7402	83739,14	151229,59	216,90
	40,0	0,1444	313,15	0,00319	-1,935	5,7466	82251,88	151212,96	220,21
	42,0	0,1873	315,15	0,00317	-1,675	5,7530	81588,05	151196,33	220,87
	44,0	0,3158	317,15	0,00315	-1,152	5,7593	80238,01	151179,70	223,68
	46,0	0,3495	319,15	0,00313	-1,051	5,7656	79989,20	151163,07	223,01
Y417H + BH ₄	38,0	0,02783	311,15	0,00321	-3,581	5,7402	86542,29	189559,03	331,08
	40,0	0,05834	313,15	0,00319	-2,841	5,7466	84219,34	189542,40	336,33
	42,0	0,06001	315,15	0,00317	-2,813	5,7530	84699,96	189525,77	332,62
	44,0	0,1397	317,15	0,00315	-1,968	5,7593	83026,12	189509,14	335,75
	46,0	0,1814	319,15	0,00313	-1,707	5,7656	82873,28	189492,51	334,07
Y417H + BH ₂	38,0	0,09439	311,15	0,00321	-2,360	5,7402	83347,32	125538,05	135,60
	40,0	0,1178	313,15	0,00319	-2,138	5,7466	82389,84	125521,43	137,73
	42,0	0,1732	315,15	0,00317	-1,753	5,7530	81922,76	125504,80	138,29
	44,0	0,2252	317,15	0,00315	-1,490	5,7593	81767,07	125488,17	137,86
	46,0	0,3188	319,15	0,00313	-1,143	5,7656	81377,13	125471,54	138,16

Tabelle 26. Berechnete Geschwindigkeitskonstanten und thermodynamische Parameter

Die Geschwindigkeitskonstanten k für die Entfaltung der drei PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H ohne Ligand und im Komplex mit $43 \mu\text{M}$ BH_4 oder BH_2 wurden aus dem Fit jeder Kinetik mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung berechnet. Die thermodynamischen Parameter der Gibbs-Energie ΔG^\ddagger , der Reaktionsenthalpie ΔH^\ddagger und der Reaktionsentropie ΔS^\ddagger konnten unter Anwendung der Eyring Theorie des Übergangszustandes und der Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnet werden.

Das oxidierte Kofaktoranalogen BH_2 zeigte dagegen nur eine stabilisierende Wirkung auf den Wildtyp und auf R68S. Im Fall von R261Q und Y417H führte die BH_2 -Bindung sogar zur Abnahme der Aktivierungsenergie um ca. 20 %. Die Berechnung der thermodynamischen Parameter ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger zur Quantifizierung der zeitabhängigen Entfaltung der PAH-Varianten im Komplex mit BH_4 oder BH_2 erfolgte nach der Eyring-Theorie des Übergangszustandes aus der statistischen Thermodynamik und durch Anwendung der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Kapitel 3.6.3). Tabelle 26 zeigt für die Varianten im Komplex mit einem Liganden eine Abnahme der Gibbs-Energie und der Reaktionsenthalpie, sowie einen Anstieg der Reaktionsentropie bei zunehmenden Temperaturen, wie es bereits für den Wildtyp beschrieben wurde. Die Analyse aller Daten konnte eine kinetische und thermodynamische Stabilisierung des PAH-Wildtyps und aller Varianten im Komplex mit BH_4 belegen, was erneut beweist, dass zur Stabilisierung der Proteine ein reduziertes Pyrimidopyrazin-Ringsystem in Kombination mit der 1,2-Dihydroxypropylseitenkette von Vorteil ist.

4.6 Der Einfluss von vier neuen pharmakologischen Chaperonen auf den Wildtyp

Die Untersuchung des Effektes von BH_4 , BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄ auf den PAH-Wildtyp und die drei PAH-Varianten in den voran gegangenen Kapiteln zeigte, dass stets der natürliche Kofaktor der PAH den größten stabilisierenden Effekt auf das PAH-Protein ausübt und BH_4 inzwischen zu Recht als pharmakologisches Chaperon klassifiziert werden kann, das den durch Proteinfehlfaltung induzierten biochemischen Phänotyp korrigiert. Da die chemische Synthese von Sapropterindihydrochlorid, der synthetischen Form von BH_4 , noch sehr kostspielig ist und BH_4 auch nicht bei allen PKU-Genotypen eine therapeutische Wirkung entfaltet, ging die Suche nach alternativen pharmakologischen Chaperonen zur Therapie der Hyperphenylalaninämie in den vergangenen Jahren weiter. Im Rahmen von zwei Forschungsprojekten zu diesem Thema wurden insgesamt vier vielversprechende Kandidaten identifiziert (Abbildung 40). Die Ansätze beider Forschergruppen waren dabei gegensätzlich. Die Arbeitsgruppe aus Norwegen testete zunächst in einem DSF-Hochdurchsatz-Screen eine Bibliothek aus über 1.000 Liganden und identifizierte dabei zwei Kandidaten, die die temperaturabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps *in vitro* verzögerten und sich stabilisierend auf das Enzym auswirkten (Pey *et al.* 2008). Auch der Einsatz der beiden Substanzen in Zellkultur und im Mausmodell, lieferte vielversprechende Ergebnisse. Bei den beiden Substanzen handelt es sich um die chemischen Verbindungen 5,6-Dimethyl-3-(4-methyl-2-pyridinyl)-2-thioxo-2,3-dihydrothieno[2,3-d]pyrimidin-4(1H)-on (Substanz 1) und um 3-Amino-2-benzyl-7-nitro-4-(2-quinolyl)-1,2-dihydroisoquinolin-1-on (Substanz 2).

Substanz **1** setzt sich aus einem Thiophen-Grundgerüst mit zwei funktionellen Methylgruppen zusammen, wobei der Thiophenring mit einem Pyrimidinring anelliert ist, der einen methylierten Pyridinring als Seitenkette trägt. Substanz **2** basiert auf einem Isochinolin, einer bekannten Grundstruktur für unterschiedliche, natürlich vorkommende Isochinolin-Alkaloide.

Die Arbeitsgruppe aus Innsbruck (Santos-Sierra et al. 2012) wählte einen stärker strukturbezogenen Ansatz für ihre Suche nach potentiellen neuen pharmakologischen Chaperonen. In diesem Fall wurde die chemische Bibliothek des *National Cancer Institute* in den USA nach Liganden durchsucht, die aufgrund ihrer strukturellen Merkmale Ähnlichkeit mit BH_4 aufzeigten und im besten Fall sogar ein ähnliches Interaktionsnetzwerk im aktiven Zentrum der PAH ausbilden würden. Dieser strukturbasierte virtuelle Screen einer Datenbank mit über 115.000 Substanzen lieferte insgesamt 84 Treffer, deren reversibles Bindungsverhalten an den murinen PAH-Wildtyp zunächst mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie untersucht wurde. Daraus konnten sechs vielversprechende Kandidaten als *hits* identifiziert werden, die weiteren *in vitro* und *in vivo* Studien in Zellkultur und im Mausmodell unterzogen wurden. Schlussendlich zeigten die beiden Substanzen 5-Benzylhydantoin (Substanz **3**) und 6-Amino-5-(benzylamino)-uracil (Substanz **4**) die besten Effekte auf den murinen PAH-Wildtyp. 5-Benzylhydantoin basiert auf einem Hydantoin-Grundgerüst, das über einen kurzen CH_2 -Linker an einen Phenylrest gebunden ist. Die Grundstruktur von 6-Amino-5-(benzylamino)-uracil ist die Nukleinbase Uracil, die über eine sekundäre Aminogruppe mit einem Benzylrest verbunden ist.

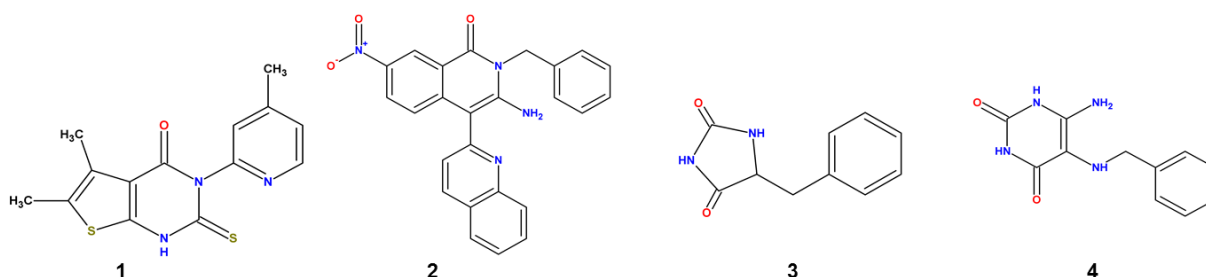


Abbildung 40. Strukturformeln von neuen pharmakologischen Chaperonen für die PAH

(1) 5,6-Dimethyl-3-(4-methyl-2-pyridinyl)-2-thioxo-2,3-dihydrothieno[2,3-d]pyrimidin-4(1H)-on (Substanz **1**) und (2) 3-Amino-2-benzyl-7-nitro-4-(2-quinolyl)-1,2-dihydroisoquinolin-1-on (Substanz **2**) waren positive Hits aus einem DSF-Screen am humanen PAH-Wildtyp (Pey et al. 2008). (3) 5-Benzylhydantoin (Substanz **3**) und (4) 6-Amino-5-(benzylamino)-uracil (Substanz **4**) sind potentielle pharmakologische Chaperone, die durch einen *in silico* Screen identifiziert wurden (Santos-Sierra et al. 2012).

Der Effekt dieser vier neuen, vielversprechenden Substanzen sollte im Rahmen der Dissertation mit der Wirkung von BH_4 auf den humanen Wildtyp verglichen werden, denn die Arbeitsgruppe aus Norwegen zeigte in ihrer Studie zwar die sehr guten Effekte der beiden Substanzen **1** und **2** auf die PAH, allerdings wurde im Rahmen der Publikation kein Vergleich mit BH_4 durchgeführt. Dieser war in der Publikation aus Innsbruck zwar erfolgt, allerdings basierten alle Ergebnisse auf Daten, die am murinen PAH-Wildtyp bzw. an der murinen Variante V106A oder im Mausmodell erhoben wurden.

4.6.1 Drei der vier Liganden binden im aktiven Zentrum der PAH

Vor Beginn der eigentlichen Experimente wurden die vier Substanzen virtuell in die Bindungstasche von BH_4 gefittet, um deren Wechselwirkungen im aktiven Zentrum zu analysieren und mit denen von BH_4 zu vergleichen. Das molekulare Modeling von Substanz **1** (Abbildung 41A und B) zeigte, dass die Orientierung des zentralen Thieno[2,3-d]pyrimidin-Fragments im aktiven Zentrum der PAH mit der Ausrichtung des Pyrimidopyrazin-Grundgerüsts von BH_4 identisch ist. Das aromatische Ringsystem des Liganden ist wie bei BH_4 parallel zu F254 in der katalytischen Domäne angeordnet, wird durch die entsprechende π - π Wechselwirkung stabilisiert und somit an der richtigen Position fixiert. Die Thiocarbonylgruppe im Pyrimidinring bildet als Donorzentrum eine Wasserstoffbrückenbindung zur Backbone Carbonylgruppe von L249 aus, wie es bereits für das Stickstoffatom N8 im BH_4 -Grundgerüst beschrieben wurde (siehe Abbildung 41B). Die lipophile Untertasche in der PAH, die durch die Aminosäurereste Y325, W326, A322, L255 und F254 definiert ist und im Fall von BH_4 durch die Dihydroxypropylseitenkette belegt wird, ist bei Substanz **1** vollständig durch den Methylpyridinrest des Liganden ausgefüllt. Die für BH_4 beschriebene Wechselwirkung des N3-Stickstoffs des Grundgerüsts mit der Carboxygruppe von E286 in der katalytischen Domäne über das eingelagerte Wassermolekül 1142, kann im Fall von Substanz **1** nicht ausgebildet werden, da die beiden hydrophoben Methylgruppen am Thiophengrundgerüst diese Wechselwirkung sterisch unterbinden. Daher wird das Wassermolekül 1142 durch Bindung von Substanz **1** im aktiven Zentrum mit hoher Wahrscheinlichkeit verdrängt.

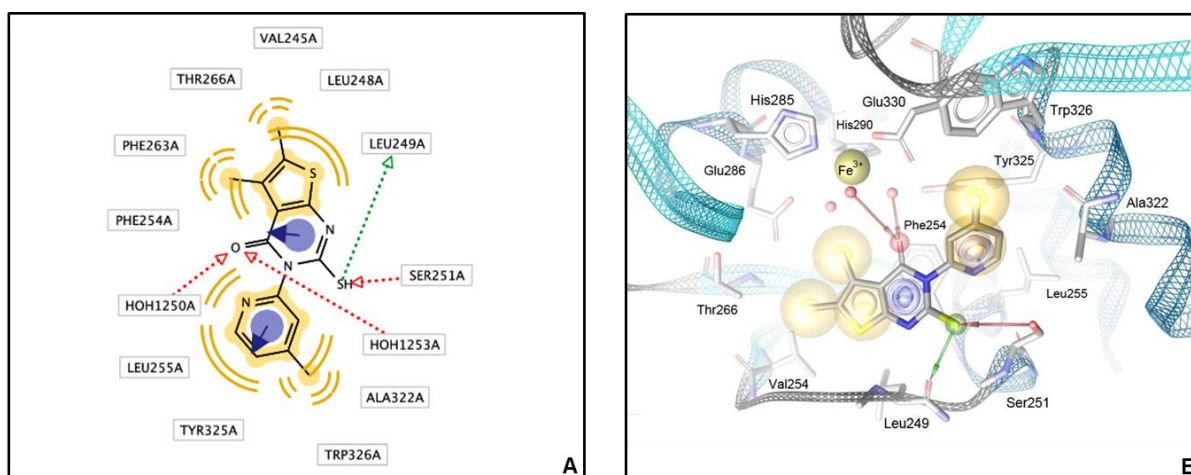


Abbildung 41. Interaktionsstudien von Substanz 1

(A) Netzwerk der PAH-Ligand-Interaktion mit der katalytischen Domäne des Wildtyps als 2D-Modell. Vom Donorzentrum für eine Wasserstoffbrückenbindung zeigt ein grüner Pfeil auf den Bindungspartner L249, während rote Pfeile auf Akzeptorzentren gerichtet sind. Die gelben Bereiche beschreiben Regionen hydrophober Kontakte, während blaue Kreise jeweils die π - π -Wechselwirkung zwischen den aromatischen Ringsystemen des Liganden und aromatischen Seitenketten in der katalytischen Domäne der PAH symbolisieren. (B) Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Wechselwirkungen von Substanz **1** in der Bindungstasche der PAH als 3D-Modell. Sauerstoffatome sind rot markiert, Stickstoffatome blau, Kohlenstoffatome grau und Schwefelatome gelb. Das eingelagerte Eisen (III) ist als gelbe Kugel dargestellt. Die kleinen roten Kugeln symbolisieren die eingelagerten Wassermoleküle. Die transluzierenden gelben Bereiche beschreiben die Umgebung mit hydrophoben Kontakten. Grüne und rote Pfeile markieren Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren.

Dafür konnten hydrophobe Kontakte zwischen den beiden Methylgruppen des Liganden und den Aminosäureseitenketten von F254, Y266 und V254 in der katalytischen Domäne identifiziert werden. Eine weitere neue Wechselwirkung tritt zwischen der Thiocarbonylgruppe des Liganden und der Hydroxylgruppe von Ser251 auf. Die optimale Komplexierung des eingelagerten Eisenatoms durch drei Wassermoleküle, wie es durch Bindung von BH_4 zu beobachten ist, kann allerdings nicht erfolgen. Grund dafür ist der sterische Platzanspruch der beiden lipophilen Methylgruppen am Boden der Bindungstasche, so dass die Carbonylgruppe an Position vier im Pyrimidinring sich nicht optimal unterhalb der eingelagerten Wassermoleküle anordnen kann. Daher können nur zwei von ursprünglich drei das Eisenatom komplexierenden Wassermolekülen durch die Carbonylgruppe des Liganden stabilisiert werden.

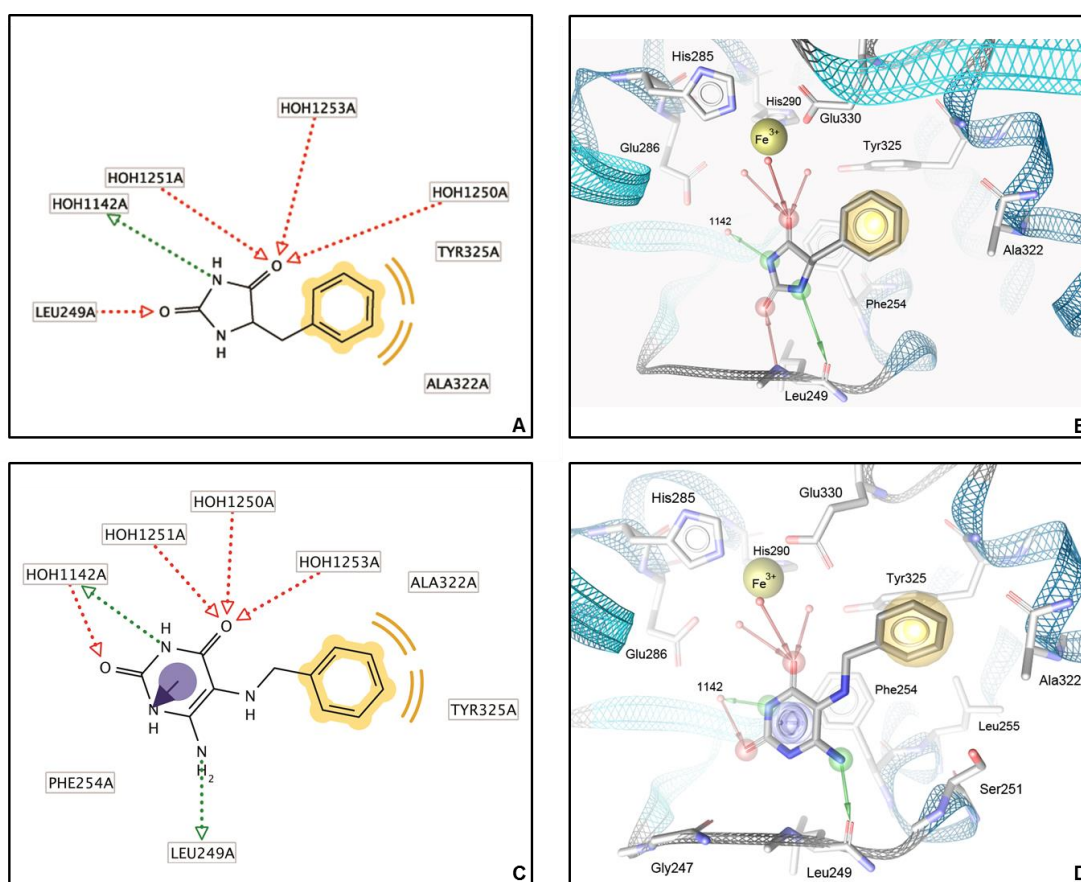


Abbildung 42. Interaktionsstudien der Substanzen 3 und 4

(A) Das Netzwerk der Interaktion von Substanz 3 mit der katalytischen Domäne des Wildtyps ist als 2D-Modell dargestellt. Vom Donorzentrum für eine Wasserstoffbrückenbindung zeigt ein grüner Pfeil auf den Bindungspartner, während rote Pfeile auf Akzeptorzentren gerichtet sind. Der gelbe Bereich beschreibt die Region hydrophober Kontakte. (B) Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Wechselwirkungen von Substanz 3 in der Bindungstasche der PAH als 3D-Modell. Sauerstoffatome sind rot markiert, Stickstoffatome blau, Kohlenstoffatome grau und Eisen (III) ist als gelbe Kugel dargestellt. Die kleinen roten Kugeln symbolisieren die eingelagerten Wassermoleküle. Der transluzierende gelbe Bereich zeigt die Umgebung mit hydrophoben Kontakten an. Grüne und rote Pfeile markieren Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren. (C) 2D- und 3D-Modell (D) der Interaktion von Substanz 4 mit dem aktiven Zentrum der PAH. Der zusätzliche blaue Kreis symbolisiert die π - π -Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Ringsystem des Liganden und dem Phenylring von F254.

Von Substanz **2** wurde ursprünglich angenommen, dass sie aufgrund des BH₄-ähnlichen Grundgerüsts auch ein ähnliches Interaktionsnetzwerk im aktiven Zentrum der PAH ausbilden würde. Allerdings zeigte sich während des virtuellen Modellings, dass Substanz **2** zu voluminös ist, um in der BH₄-Bindungstasche zu binden.

Die Substanzen 3 und 4 bilden ein ähnliches Interaktionsnetzwerk im aktiven Zentrum der PAH aus. Die Carbonylgruppe sowohl im Hydantoin-Ring (Abbildung 42 A und B) als auch im Uracil-Grundgerüst (Abbildung 42 C und D) dient wie bereits für BH₄ beschrieben, als Wasserstoffbrückenakzeptor für die drei das Eisen komplexierenden Wassermoleküle. Diese Konformation erlaubt dem im Hydantoinring gegenüber liegenden Carbonylrest von Substanz 3, als Wasserstoffbrückenakzeptor für das sekundäre Backbone Amin von L249 zu dienen. Ähnlich wirkt die primäre Aminogruppe im Uracilgrundgerüst von Substanz 4 als Wasserstoffbrückendonator für den Backbone Carbonylrest von L249. Das sekundäre Amin zwischen den beiden Carbonylgruppen der Ringe von Substanzen 3 und 4 bindet über das eingelagerte Wassermolekül 1142 an E286, wie es auch bei BH₄ möglich ist. Wie bei Substanz 1 bindet auch der Benzylrest der Substanzen 3 und 4 in der lipophilen Untertasche, die durch die Aminosäurereste Y325, W326, A322, L255 und F254 definiert wird. Zudem ist das Uracilgrundgerüst von Substanz 4 so angeordnet, dass es parallel zu F254 in der katalytischen Domäne liegt und durch die π - π Wechselwirkung in der BH₄-Bindungstasche arretiert wird.

4.6.2 Bindungs- und Inhibierungskonstanten für drei der vier Liganden

Die Interaktionsstudien (Kapitel 4.6.1) zeigten, dass von den vier in der Literatur beschriebenen Substanzen, nur drei tatsächlich in der BH₄-Bindungstasche binden können, denn Substanz 2 ist zu voluminös, um ins aktive Zentrum der PAH gefittet zu werden. Die drei verbleibenden Liganden 1, 3 und 4 sind aber tatsächlich dazu in der Lage, ein ähnliches Bindungsnetzwerk ausbilden wie es bereits für BH₄ beschrieben wurde. Die qualitative Bindung der vier Substanzen wurde mittels MST analysiert (Kapitel 4.3.3). Nach erfolgreicher Kopplung eines Fluoreszenzmarkers an die Lysinreste des PAH-Wildtyps, erfolgte die Aufzeichnung der Bindungskurve aus 16 seriellen Verdünnungen für die vier Liganden im Konzentrationsbereich von 0,0153-500 μ M (Abbildung 43). Durch Plotten der Messdaten gegen den Logarithmus der Einzelkonzentrationen resultierte eine sigmoidale Bindungskurve, aus welcher die Dissoziationskonstante K_D jeder Interaktion berechnet werden konnte (Wienken *et al.* 2010). Für Ligand 2 konnte mittels MST keine Bindung nachgewiesen werden und die Werte der K_D s der drei Liganden 1, 3 und 4 lagen alle deutlich über den Dissoziationskonstanten, die für BH₄, BH₂ und Sepiapterin gemessen wurden (Kapitel 4.3.3). Ligand 3 zeigte mit einer K_D von 28,4 μ M einen mit der Dissoziationskonstante von 6-MPH₄ (25,86 μ M) vergleichbaren Wert, während die K_D s der Liganden 1 (99,4 μ M) und 4 (83,5 μ M) auf eine schwache Enzym-Ligand Interaktion hinwiesen. Alle bis jetzt mit MST gemessenen Liganden lassen sich in insgesamt drei Gruppen einteilen, die sich jeweils in ihrer Bindungsaffinität gegenüber dem PAH-Wildtyp

unterscheiden. Die erste Gruppe an Liganden mit hoher Bindungsaffinität gegenüber dem PAH-Wildtyp setzt sich aus BH₄, BH₂ und Sepiapterin zusammen. Eine mittlere Bindungsaffinität (Gruppe 2) zeigten die Liganden 6-MPH₄ und Substanz 3, während die dritte Gruppe mit Substanz 1 und 4 eine sehr schwache Enzym-Ligand-Interaktion aufwies.

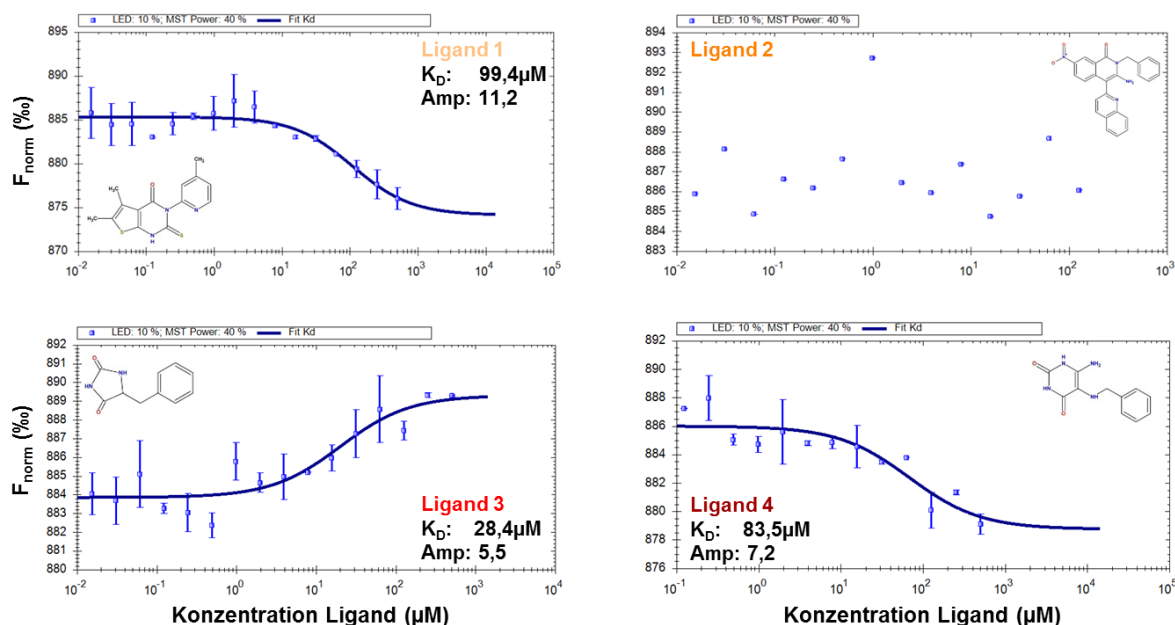


Abbildung 43. MST-Daten des PAH Wildtyps im Komplex mit Substanzen 1-4

Die Messpunkte aus sechzehn seriellen Verdünnungen der vier Liganden wurden jeweils gegen das gemessene und normalisierte Fluoreszenzsignal aufgetragen. Aus dem Fit der Daten konnte durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes die Dissoziationskonstante K_D berechnet werden. Die Amplitude (Amp) zeigt den Unterschied der Messwerte zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand an und sollte idealerweise stets größer als acht sein. Die Daten wurden als Duplikate gemessen und die Standardabweichung ist als blauer Balken angegeben.

Wie es für BH₄ bereits gezeigt wurde (Kapitel 4.2.2), geht der stabilisierende Effekt von pharmakologischen Chaperonen häufig mit einer Inhibition der Enzymaktivität einher. Daher sollten auch die inhibitorischen Eigenschaften der Liganden untersucht werden. Der Standard-Enzymaktivitätsassay (Kapitel 3.5.1.1) wurde pipettiert, die drei Liganden **1**, **3** und **4** jeweils als kompetitive Inhibitoren in ansteigender Konzentration von 0 bis 500 μ M zugegeben und die Menge an gebildetem Tyrosin mittels HPLC bestimmt. Der Fit der Daten mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung zeigte bereits eine Abnahme der PAH-Aktivität mit zunehmenden Konzentrationen der drei Liganden (Abbildung 44). Durch Auftragen der Messpunkte gegen den Logarithmus der Ligandkonzentration und einen exponentiellen Fit der Daten konnten die IC₅₀-Werte berechnet werden (Kapitel 3.5.3), woraus wiederum die Berechnung der Werte für die inhibitorische Konstante K_i erfolgen konnte. Ligand **1** zeigte mit einem K_i -Wert von 4,23 μ M den stärksten inhibierenden Einfluss auf den PAH-Wildtyp und das Ausmaß der Inhibition war mit dem Effekt von Sepiapterin (6,37 μ M) vergleichbar. Allerdings war die Inhibition durch Ligand **1** nur halb so stark wie der inhibierende Effekt, der

durch BH_4 -Bindung hervorgerufen wurde. Die Liganden **3** und **4** zeigten ein ähnliches Bindungsmuster im aktiven Zentrum der PAH (Kapitel 4.6.1). Dazu passten die sehr ähnlichen gemessenen Werte für die inhibitorischen Konstanten im zweistelligen micromolaren Bereich von $22,9 \mu\text{M}$ für Ligand **3** und $19,6 \mu\text{M}$ für Ligand **4**. Von den acht bisher untersuchten Liganden zeigte nur 6-MPH₄ keinen inhibierenden Effekt auf den PAH-Wildtyp (Kapitel 4.3.4 und 4.3.5). 6-MPH₄ ist der einzige Ligand ohne die für BH_4 beschriebenen Seitenketteninteraktionen, denn auch die drei neuen Liganden **1**, **3** und **4** verfügen jeweils über einen hydrophoben Rest, der in der durch die Aminosäurereste Y325, W326, A322, L255 und F254 definierten lipophilen Untertasche im aktiven Zentrum der PAH binden kann. Diese Wechselwirkungen scheinen somit eine wichtige Voraussetzung für die Entfaltung der inhibitorischen Wirkung zu sein.

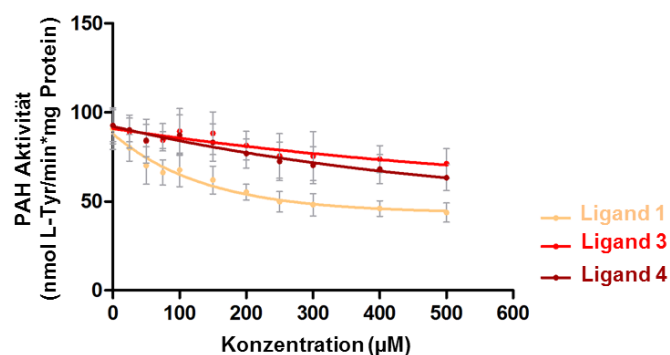


Abbildung 44. Inhibierung der Enzymaktivität des Wildtyps durch Substanzen 1, 3 und 4

Die Messpunkte aus elf seriellen Verdünnungen der drei Liganden im Konzentrationsbereich von 0-500 μM wurden jeweils gegen die PAH-Aktivität - gemessen als Bildung von nmol L-Tyr/min*mg Protein - aufgetragen und durch Anwendung einer einphasigen Exponentialfunktion gefittet. Alle Messpunkte wurden als Triplikate gemessen. Die Standardabweichung ist als grauer Fehlerbalken für jeden Messwert angegeben.

4.6.3 Etablierung eines neuen Hochdurchsatz-DSF-Assays

Der bereits beschriebene DSF-Assay (Kapitel 4.2.4) sollte angewendet werden, um die thermische Stabilität der vier neuen Substanzen zu untersuchen und sie mit der Wirkung von BH_4 zu vergleichen. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Liganden **1** und **2** die Umschlagspunkte um $7,2^\circ\text{C}$ bzw. $13,6^\circ\text{C}$ (Pey *et al.* 2008) erhöhen. Zu Substanzen **3** und **4** existieren diesbezüglich keine Literaturdaten. Nach Auswertung der gemessenen DSF-Daten erfolgte die Berechnung der $T_{\text{M}1}$ - und $T_{\text{M}2}$ -Werte für die Entfaltung der regulatorischen und katalytischen Domänen der PAH. Tabelle 27 zeigt, dass Ligand **1** die regulatorischen Domänen im gleichen Ausmaß stabilisiert wie BH_4 , während der stabilisierende Effekt auf die katalytischen Domänen der PAH geringer ausfällt. Die Liganden **2**, **3** und **4** zeigten keinen stabilisierenden Effekt auf den PAH-Wildtyp. Das Ergebnis des DSF-Assays war überraschend, da die Literaturdaten eine deutliche thermische Stabilisierung der PAH durch Bindung der Liganden **1** und **2** versprochen.

	T_{M1} (°C)	ΔT_{M1} (°C)	T_{M2} (°C)	ΔT_{M2} (°C)
Kontrolle	47,74	-	54,99	-
BH ₄	49,23	1,49	56,47	1,48
Ligand 1	49,26	1,52	55,90	0,91
Ligand 2	48,08	0,34	55,85	0,86
Ligand 3	47,85	0,11	54,37	-0,62
Ligand 4	48,39	0,65	54,79	-0,20

Tabelle 27. Berechnete Umschlagpunkte des Wildtyps im Komplex mit den Liganden 1-4

Die Werte basieren auf drei unabhängigen Messungen der thermischen Denaturierung des Wildtyps unter Verwendung des Fluoreszenzmarkers ANS und wurden durch Boltzman fit der berechneten *unfolded fraction* (Pey *et al.* 2008) ermittelt. Der durch Bindung der jeweiligen Liganden induzierte Temperaturunterschied zwischen dem Wildtyp ohne und mit Ligand wurde für den ersten (ΔT_{M1}) und zweiten (ΔT_{M2}) Übergang ermittelt und in einer separaten Spalte dargestellt.

Um die im Rahmen der Dissertation gemessenen Daten zu verifizieren, wurde daher ein zweiter unabhängiger DSF-Entfaltungssassay nach entsprechenden Literaturangaben (Niesen *et al.* 2007) an einem Gerät für *real-Time-quantitative-PCR* etabliert (Kapitel 3.6.2). Auch hier wird der temperaturabhängige Anstieg der Fluoreszenz aufgrund zunehmender Entfaltung des PAH-Wildtyps gemessen. Als Fluoreszenzmarker diente der Farbstoff SYPRO® Orange, der ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis aufweist und durch die hohe Anregungswellenlänge von 492 nm die Wahrscheinlichkeit verringert, dass die zu testende Liganden mit den optischen Eigenschaften des Farbstoffes interferieren, indem sie beispielsweise das Signal löschen. Der Vorteil an der Durchführung des DSF-Assays an einem Gerät für *Real-Time-quantitative-PCR* ist zudem, dass die Menge an einzusetzendem Protein vergleichsweise gering ist und die Methode auch als *Screening* nach neuen, stabilisierenden Liganden für die PAH im 96- oder 384-well-Format eingesetzt werden kann.

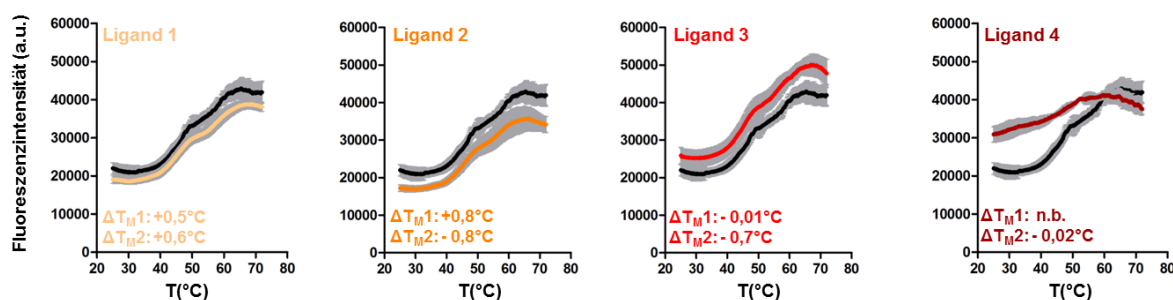


Abbildung 45. DSF-Assay des PAH-Wildtyps im Komplex mit den Liganden 1-4

Die ansteigenden Fluoreszenzkurven unter Verwendung des Fluoreszenzmarkers SYPRO® Orange (Niesen *et al.* 2007), zeigen die temperaturabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps ohne (schwarze Kurve) und im Komplex mit den vier Liganden. Die Kurven wurden für die Auswertung in zwei Abschnitte eingeteilt; den Bereich unterhalb von 50 °C (Entfaltung der regulatorischen Domänen) und den Bereich zwischen 50 und 65 °C (Entfaltung der katalytischen Domänen). Alle Messdaten aus den jeweiligen Bereichen wurden normalisiert und durch Anwendung der Boltzmann-Funktion konnten die Umschlagpunkte der einzelnen sigmoidalen Kurven berechnet werden. Die Differenz der Umschlagpunkte für die Entfaltung der regulatorischen (ΔT_{M1}) und katalytischen Domänen (ΔT_{M2}) bezieht sich auf den Wildtyp ohne und mit gebundenem Liganden. Für Ligand 4 konnte ΔT_{M1} nicht berechnet (n.b.) werden. Die gemittelten Werte basieren auf mindestens drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichung zwischen den einzelnen Messungen wird durch die grauen Fehlerbalken angezeigt.

Abbildung 45 zeigt das Ergebnis des DSF-Assays für den PAH-Wildtyp im Komplex mit den vier Liganden. Auch im neuen Assay ist die sequentielle Abfolge der Entfaltung von regulatorischen und katalytischen Domänen der PAH gut zu unterscheiden und die jeweiligen Umschlagpunkte können als T_{M1} und T_{M2} berechnet werden. Auch die mit dem neu etablierten Assay gemessenen Werte zeigten keinen stabilisierenden Effekt der Liganden **1** und **2** wie ursprünglich in der Literatur angegeben. Dafür stimmen die Ergebnisse gut mit den Daten aus Tabelle 27 überein, die mit einem anderen Fluoreszenzmarker (ANS) und an einem anderen Gerät erhoben wurden.

4.6.4 Biophysikalische Charakterisierung der vier Liganden

Die Rohdaten der thermischen Denaturierung mit ANS (Kapitel 4.6.3) waren die Grundlage für die Analyse der Hydrophobizität des Wildtyps im Komplex mit jeweils einem der vier Liganden. Interessanterweise führte die Bindung von Ligand **2** zur signifikanten Abnahme der Hydrophobizität (Abbildung 46A). Da die Analyse im Kapitel 4.6.1 ergab, dass die Bindung von Ligand **2** aufgrund der Größe nicht in der BH_4 -Bindungstasche erfolgen kann, muss die Bindung dieses Liganden an einer anderen Stelle im Enzym möglich sein. Die Bindung von Ligand **3** zeigte den gegenteiligen Effekt und induzierte eine signifikante Zunahme der Hydrophobizität um 25 %. Das deutet darauf hin, dass durch Bindung von Ligand **3** konformative Änderungen ausgelöst werden, die eine vermehrte Exposition hydrophober Gruppen an der Enzymoberfläche nach sich ziehen. Die Hydrophobizität des PAH-Wildtyps im Komplex mit Ligand **1** oder **4** zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp ohne Ligand. Die Berechnung des durch dynamische Lichtstreuung ermittelten hydrodynamischen Radius des Wildtyps im Komplex mit den Liganden **1**, **3** und **4** zeigte einen mit BH_4 vergleichbaren Effekt der Liganden **1** und **3** (Abbildung 46B). Auch sie überführen das Enzym durch ihre Bindung in eine kompaktere, *t-state* ähnliche Konformation. Ligand **4** hatte einen gegenteiligen Effekt auf den hydrodynamischen Radius und Ligand **2** konnte mit dieser Methode nicht analysiert werden, da die orange Farbe der Substanz die Messung beeinträchtigte.

Um mögliche lokale strukturelle Änderungen in der regulatorischen Domäne der PAH zu erkennen, die durch Bindung der Liganden induziert werden, wurden Emissionsspektren der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz aufgenommen (Abbildung 46C) und mit dem Effekt von BH_4 verglichen. Ligand **1** zeigte ein ähnlich starkes Quenching der intrinsischen Fluoreszenz wie BH_4 , allerdings mit zwei Peakmaxima im analysierten Wellenlängenbereich zwischen 300 und 400 nm. Bei den Liganden **2**, **3** und **4** war die Löschung des Fluoreszenzsignals weniger stark ausgeprägt und keiner der drei Liganden zeigte eine auffällige Verschiebung des Peakmaximums in den länger- oder kürzerwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums, was auf einen stärker lösemittel-exponierten N-Terminus der PAH bzw. eine kompaktere Konformation hindeuten würde. Die Bindung der vier Liganden im aktiven Zentrum der PAH hatte somit keine direkte Auswirkung auf die Konformation der regulatorischen Domäne. Hierin unterscheiden sich die vier potentiellen pharmakologischen Chaperone von BH_4 und den BH_4 -Derivaten BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄, die durch ihre

Bindung in der BH₄-Bindungstasche zu deutlichen konformativen Veränderungen führten, die sich bis in die regulatorische Domäne hinein auswirkten (Kapitel 4.3.8).

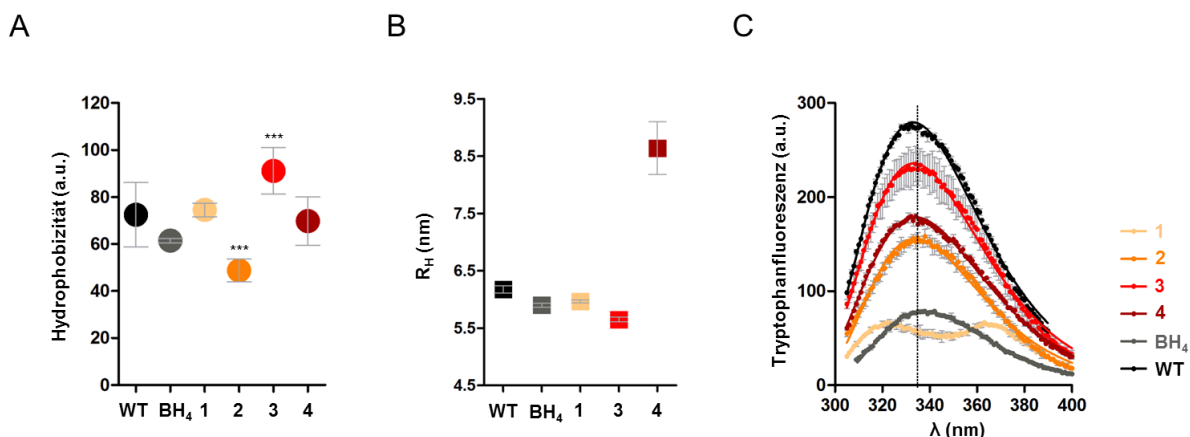


Abbildung 46. Biophysikalische Charakterisierung des Wildtyps mit Liganden 1-4

Die Abbildungen zeigen die Messdaten des PAH-Wildtyps (WT) im Komplex mit je 43 μM der vier Liganden und BH₄. Die Standardabweichung zwischen den Einzelwerten wird jeweils durch graue Fehlerbalken angezeigt. **(A)** Für die Messung der Hydrophobizität des Wildtyps ohne und mit gebundenen Liganden im nativen Zustand bei 25 °C diente ANS als Fluoreszenzmarker. Die Messwerte basieren auf mindestens neun Einzelwerten. Durch Varianzanalyse (Dunnett's test) verglichen wurden alle Messdaten des Wildtyps ohne und mit gebundenem Liganden (***, $p < 0,001$). **(B)** Im Boxplot aufgetragen sind die berechneten Mittelwerte für den hydrodynamischen Radius R_H in Nanometer des PAH-Wildtyps ohne und mit Ligand. Die Daten basieren auf Duplikaten. **(C)** Die Emissionsspektren der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des PAH-Wildtyps ohne und mit Liganden sind jeweils farbkodiert abgebildet. Die Spektren des Wildtyps im Komplex mit den Liganden **2**, **3** und **4** wurden zur Berechnung des Peakmaximums durch eine schiefe Normalverteilung (Rooney and Lee 1986) angenähert. Das Peakmaximum des Wildtyps ohne gebundenen Liganden (332,9 nm) wird durch die grau gestrichelte Linie dargestellt. Alle Emissionsspektren basieren auf drei unabhängigen Messungen bei 25 °C.

Zusammenfassend zeigen die Daten einen deutlich schwächeren Effekt der vier Liganden auf den PAH-Wildtyp als erwartet. Die besten Ergebnisse resultierten für Ligand **1**. Er konnte die temperaturinduzierte Entfaltung des Wildtyps trotz geringerer Bindungsaffinität in ähnlichem Ausmaß stabilisieren wie BH₄ und zeigte die stärksten inhibitorischen Eigenschaften. Auch der Einfluss auf Hydrophobizität, hydrodynamischen Radius und Tryptophanfluoreszenz war mit BH₄ vergleichbar. Ligand **2** kann aufgrund seiner Größe nicht in der BH₄-Bindungstasche binden und die in der Literatur beschriebene stabilisierende Wirkung gegenüber Hitzestress konnte trotz zweier unabhängiger Assays nicht bestätigen werden. Die Liganden **3** und **4** bilden ein sehr ähnliches Interaktionsnetzwerk im aktiven Zentrum der PAH aus und waren auch hinsichtlich ihrer inhibitorischen Eigenschaften vergleichbar. Ihre Bindung induzierte jedoch keine Stabilisierung des Wildtyps gegenüber Hitzestress und auch der Einfluss auf Hydrophobizität und hydrodynamischen Radius war nicht mit dem von BH₄ vergleichbar. Die Daten belegen einmal mehr, dass BH₄ weiterhin das effizienteste stabilisierende Molekül für die Therapie der Hyperphenylalaninämien bleibt.

4.7 Einfluss von 4,5-Diaminopyrimidin auf den PAH-Wildtyp

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde auch im Rahmen der Promotionsarbeit nach einer chemischen Verbindung gesucht, die als Ausgangssubstanz für weitere synthetische Modifikationen dienen könnte, um gezielt ein neues pharmakologisches Chaperon für die PAH zu designen. Die Anforderungen an dieses Molekül waren, dass es im aktiven Zentrum der PAH ein ähnliches Interaktionsnetzwerk ausbilden kann wie BH_4 , um eine vergleichbare stabilisierende Wirkung auszuüben. Zudem sollte es eine inhibierende Wirkung auf die Enzymaktivität zeigen, kostengünstig zu erwerben und über einen längeren Zeitraum in wässriger Lösung stabil sein. Bei 4,5-Diaminopyrimidin handelt es sich um ein Biomolekül, das diesen Anforderungen gerecht werden könnte. Derivate von Diaminopyrimidinen werden schon heute als pharmakologische Wirkstoffe eingesetzt, wodurch auch ihre biologische Verträglichkeit bereits umfassend belegt ist. Dies sind gute Voraussetzungen um sie auch für die Behandlung der Phenylketonurie in Betracht zu ziehen. Das Grundgerüst des Moleküls ist ein sechsgliedriger, heterocyclischer, aromatischer Pyrimidinring mit zwei Stickstoffatomen. Der virtuelle Fit von 4,5-Diaminopyrimidin in das aktive Zentrum der PAH zeigte, dass das Molekül dazu in der Lage ist die grundlegenden für BH_4 beschriebenen Wechselwirkungen auszubilden (Abbildung 47A und B). Zwar konnte keine Komplexierung der drei eingelagerten Wassermoleküle in der Region des Eisens nachgewiesen werden, dafür erfolgte die Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerkes in der Umgebung des Wassers 1142. Das aromatische Ringsystem von 4,5-Diaminopyrimidin war wie bei BH_4 parallel zu F254 in der katalytischen Domäne angeordnet, wurde durch die entsprechende π - π Wechselwirkung stabilisiert und somit an der richtigen Position in der BH_4 -Bindungstasche fixiert. Auch die Wechselwirkung mit den Aminosäureresten E286, L249 und G247 in der katalytischen Domäne war mit 4,5-Diaminopyrimidin als Ligand möglich.

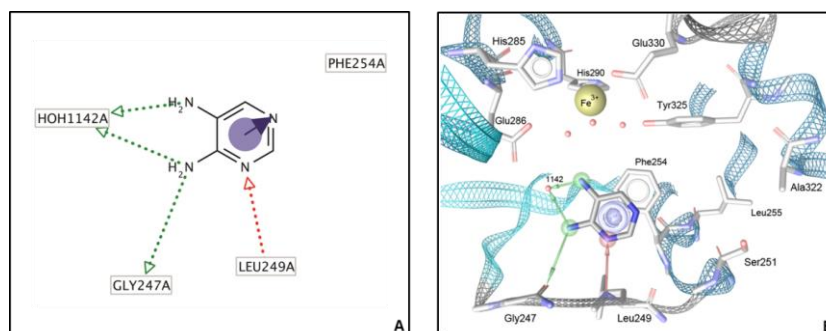


Abbildung 47. Interaktionsstudien von 4,5-Diaminopyrimidin

(A) Das Netzwerk der PAH-Ligand Interaktion ist als 2D-Modell dargestellt. Von Donorzentren für Wasserstoffbrückenbindungen zeigen grüne Pfeile auf die Bindungspartner G247 und das eingelagerte Wassermolekül 1142, während ein roter Pfeil auf das Akzeptorzentrum einer Wasserstoffbrückenbindung gerichtet ist. Der blaue Kreis symbolisiert die π - π -Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Ringsystem des Liganden und F254 in der katalytischen Domäne der PAH. (B) Das 3D-Modell zeigt die unterschiedlichen Wechselwirkungen von 4,5-Diaminopyrimidin in der Bindungstasche der PAH. Stickstoffatome sind blau markiert und Kohlenstoffatome grau. Das eingelagerte Eisen (III) ist als gelbe Kugel dargestellt. Die kleinen roten Kugeln symbolisieren die eingelagerten Wassermoleküle. Grüne und rote Pfeile markieren Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren.

4.7.1 Für 4,5-Diaminopyrimidin können Bindungs- und Inhibierungskonstanten gemessen werden

Die Bindung von 4,5-Diaminopyrimidin im aktiven Zentrum der PAH konnte mittels MST-Messungen bestätigt werden (Kapitel 4.3.3). Nach erfolgreichem Labeling der Lysinreste des PAH-Wildtyps durch kovalente Kopplung eines Fluoreszenzmarkers, erfolgte die Aufzeichnung der Bindungskurve aus 16 seriellen Verdünnungen von 4,5-Diaminopyrimidin im Komplex mit dem Wildtyp (Abbildung 48A) in einem Konzentrationsbereich von 0,0153-500 μM . Die gemessene Amplitude der Bindungskurve zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand war mit einem Wert von 10,3 ausreichend hoch, sodass die Berechnung der Dissoziationskonstante durch Plotten der Messdaten gegen den Logarithmus der Einzelkonzentration aus der resultierenden sigmoidalen Bindungskurve erfolgen konnte (Wienken *et al.* 2010). Die berechnete K_D von 87,2 μM zeigte eine moderate Bindungsaffinität von 4,5-Diaminopyrimidin, die mit den Affinitäten von Ligand **1** (99,4 μM) und **4** (83,5 μM) vergleichbar war (Kapitel 4.6.2).

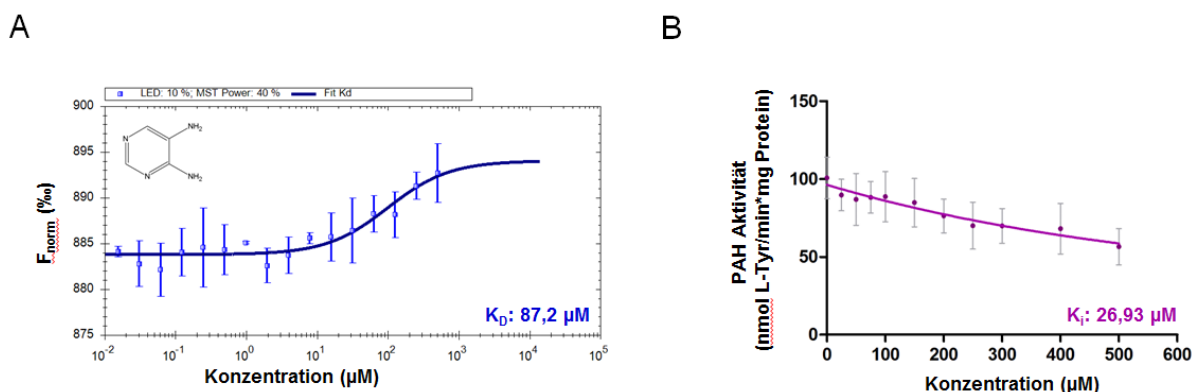


Abbildung 48. MST-Daten und Inhibierungsassay des Wildtyps mit 4,5-Diaminopyrimidin

(A) Die Abbildung zeigt die sigmoidale Bindungskurve der MST-Messung aus sechzehn seriellen Verdünnungen des Liganden, aufgetragen gegen das gemessene und normalisierte Fluoreszenzsignal. Aus dem Fit der Daten konnte durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes die Dissoziationskonstante K_D berechnet werden. Die Daten basieren auf drei unabhängigen Messungen und die Standardabweichung ist als blauer Fehlerbalken für jeden Messwert angegeben. (B) Die Abbildung zeigt die Inhibierung des PAH-Wildtyps durch ansteigende Konzentrationen an 4,5-Diaminopyrimidin. Die Messpunkte aus elf seriellen Verdünnungen des Liganden im Konzentrationsbereich von 0-500 μM wurden jeweils gegen die PAH-Aktivität - gemessen als Bildung von nmol L-Tyr/min*mg Protein – aufgetragen. Die Berechnung des IC_{50} -Wertes erfolgte durch Auftragen der Messpunkte gegen den Logarithmus der Ligandkonzentration und einen exponentiellen Fit der Daten, woraus unter Anwendung der Cheng-Prusoff Gleichung (Kapitel 3.5.3) die inhibitorische Konstante K_i berechnet werden konnte. Alle Messpunkte wurden als Triplikate gemessen. Die Standardabweichung ist als grauer Fehlerbalken für jeden Messwert abgebildet.

Ein Vergleich der Struktur von 4,5-Diaminopyrimidin mit BH_4 zeigt, dass die Anordnung der vier Stickstoffatome mit der Position der vier Stickstoffatome im Pyrimidopyrazingrundgerüst von BH_4 vergleichbar ist. Das ermöglicht die Ausbildung eines ähnlichen Interaktionsnetzwerkes im aktiven Zentrum der PAH. Aufgrund der fehlenden Seitenkette von 4,5-Diaminopyrimidin ist allerdings keine Wechselwirkung mit der lipophilen Untertasche möglich, die durch die Aminosäurereste Y325, W326, A322, und L255 gebildet wird. Diese fehlen auch im synthetischen Kofaktoranalogen 6-MPH₄. Interessanterweise übt 4,5-

Diaminopyrimidin trotz fehlender Seitenketteninteraktionen einen inhibierenden Effekt auf den PAH-Wildtyp aus (Abbildung 48B) und die berechnete K_i liegt mit 26,93 μM sogar im Bereich der inhibitorischen Konzentrationen der Liganden **3** und **4**.

4.7.2 Biophysikalische Charakterisierung von 4,5-Diaminopyrimidin

Die temperaturabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps ohne und mit 4,5-Diaminopyrimidin zeigte weder einen signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf (Abbildung 49A) noch in den Umschlagstemperaturen ΔT_{M1} (-0,45 °C) und ΔT_{M2} (-0,55 °C) im Vergleich zum Wildtyp. Aus den Rohdaten der thermischen Denaturierung bei 25 °C erfolgte die Analyse der Hydrophobizität des Wildtyps ohne Ligand und im Komplex mit 4,5-Diaminopyrimidin (Abbildung 49B), wobei sich die Werte kaum unterschieden und auch mit dem Wert nach BH_4 -Bindung vergleichbar waren. Einen starken Einfluss hatte die Bindung von 4,5-Diaminopyrimidin dagegen auf den hydrodynamischen Radius. Dieser war deutlich kleiner als der des Wildtyps ohne Ligand (Abbildung 49C) was darauf hindeutet, dass die Bindung des Liganden den Wildtyp in eine kompaktere *t-state*-ähnliche Konformation überführt. Der Effekt von 4,5-Diaminopyrimidin war dabei sogar stärker ausgeprägt als nach BH_4 -Bindung. Die Untersuchung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz erfolgte, um lokale Änderungen in der regulatorischen Domäne nach Bindung des Liganden zu identifizieren. Das Fluoreszenzemissionsspektrum (Abbildung 49D) zeigte jedoch kaum Unterschiede zum Spektrum des Wildtyps ohne Liganden auf, was darauf hindeutet, dass die Bindung von 4,5-Diaminopyrimidin kaum Einfluss auf den N-terminalen Bereich des PAH-Wildtyp-Enzyms hat.

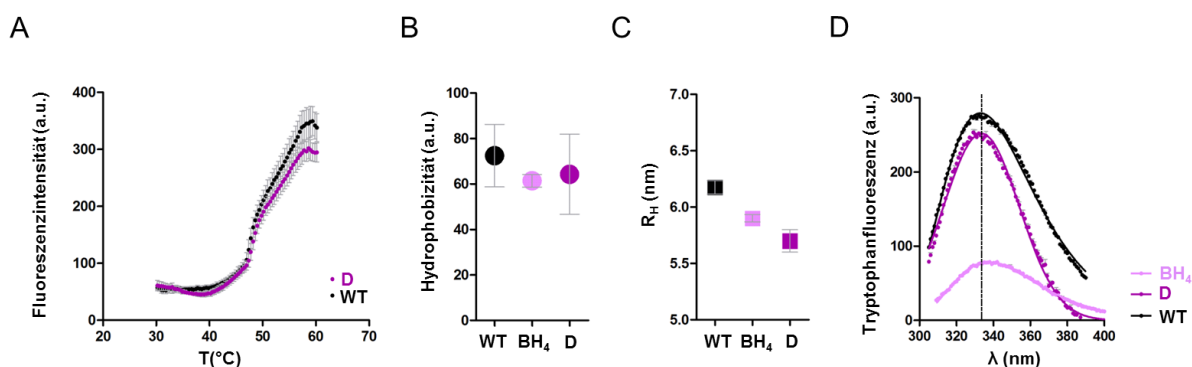


Abbildung 49. Biophysikalische Charakterisierung des Wildtyps mit 4,5-Diaminopyrimidin

(A) Die ansteigenden ANS-Fluoreszenzkurven zeigen die temperaturabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps ohne Ligand und im Komplex mit 43 μM 4,5-Diaminopyrimidin (D). Die Kurve des Wildtyps ist gemittelt aus den Rohdaten von elf Einzelmessungen und die Entfaltungskurve im Komplex mit dem Liganden basiert auf vier unabhängigen Einzelmessungen. Die Standardabweichung zwischen den einzelnen Messungen wird in den Abbildungen **A-D** jeweils durch die grauen Fehlerbalken angezeigt. (B) Die Abbildung zeigt die Hydrophobizität des Wildtyps ohne und mit gebundenen Liganden bei 25 °C mit ANS als Fluoreszenzmarker. Die Messwerte basieren auf mindestens neun Einzelwerten. (C) Im Boxplot aufgetragen sind die berechneten Mittelwerte für den hydrodynamischen Radius R_H in Nanometer des PAH-Wildtyps ohne und mit Liganden. Die Daten basieren auf Duplikaten. (D) Die Emissionsspektren der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des PAH-Wildtyps ohne und mit Liganden sind jeweils farbkodiert abgebildet. Die Spektren des Wildtyps ohne Ligand und im Komplex mit BH_4 wurden zur Berechnung des Peakmaximums durch eine schiefe Normalverteilung (Rooney and Lee 1986) angenähert, während das Peakmaximum des Wildtyps im Komplex mit 4,5-Diaminopyrimidin durch Fit einer Gaußfunktion berechnet wurde. Das Peakmaximum des PAH-Wildtyps ohne gebundenen Liganden lag bei 332,9 (gestrichelte Linie). Alle Emissionsspektren basieren auf drei unabhängigen Messungen bei 25 °C.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bindung von 4,5-Diaminopyrimidin in der BH₄-Bindungstasche wichtige Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten im aktiven Zentrum der PAH eingeht, die auch für BH₄ beschrieben wurden. 4,5-Diaminopyrimidin zeigte eine moderate Bindungsaffinität, die im Bereich der beiden in der Literatur bereits als pharmakologische Chaperone vorgeschlagenen Liganden **1** und **4** liegt. Trotz fehlender Seitenkette war das Molekül dazu in der Lage einen inhibierenden Effekt auf den Wildtyp auszuüben. Der stabilisierende Einfluss von 4,5-Diaminopyrimidin auf die thermische Denaturierung des Wildtyps oder die Konformation der regulatorischen Domäne der PAH war im Vergleich zu BH₄ gering, jedoch induzierte die Bindung des Liganden globale, konformative Änderungen die den hydrodynamischen Radius des Wildtyps deutlich verkleinerten und das Enzym dadurch in eine kompaktere Konformation überführten. 4,5-Diaminopyrimidin zeigte somit vielversprechende Ansätze, die durchaus dafür sprechen würden das Molekül als Ausgangsstruktur für weitere synthetische Modifikationen zu verwenden, um daraus neue pharmakologische Chaperone für die PAH abzuleiten.

4.8 Analyse des Effekts aller neun Liganden auf Expression und Aktivität des PAH-Wildtyps und der Variante I65T in Zellkultur

Die bereits diskutierten Daten bezogen sich auf Ergebnisse die an rekombinant gereinigten Enzymen erhoben wurden. In einem weiteren Schritt sollte der Einfluss aller neun bisher beschriebenen Liganden auf Proteinrestmenge und Enzymaktivität des PAH-Wildtyps in Zellkultur analysiert und mit dem Effekt von BH₄, beziehungsweise der BH₄-Vorstufe Sepiapterin, verglichen werden. Der Vergleich mit Sepiapterin ist im eukaryoten System besonders wichtig, denn BH₄ wird, sobald es von anderen Zellen als Hepatozyten aufgenommen wird, umgehend zu BH₂ oxidiert, während Sepiapterin zu BH₄ reduziert wird (Sawabe *et al.* 2004). Neben dem PAH-Wildtyp sollte auch der Einfluss der Liganden auf die PAH-Variante I65T untersucht werden, die einen Aminosäureaustausch in der regulatorischen Domäne der PAH aufweist. I65T zeigte in vorangegangenen Experimenten eine besonders niedrige Restaktivität und eine deutlich reduzierte Proteinstabilität und ist daher ein guter Kandidat um zu analysieren, welche Liganden einen positiven Effekt auf beide Parameter zeigen.

Wildtyp und Variante I65T wurden transient in COS-7 Zellen exprimiert (Kapitel 3.4) und mit BH₄, BH₂, Sepiapterin, 6-MPH₄, 4,5-Diaminopyrimidin sowie den Liganden 1-4 über 48 h inkubiert. Nach Zellernte und Zellaufschluss erfolgte die Vorbereitung der Aliquots für die Gelanalyse zur Bestimmung der Proteinrestmenge und für den Aktivitätsassay. Die Expression des Wildtyps mit den neun Liganden in Zellkultur zeigte nach Quantifizierung der Daten keinen großen Unterschied bezüglich der Proteinrestmenge (Abbildung 50). Für die PAH-Variante I65T zeigte sich ein völlig anderes Bild mit deutlichen Intensitätsunterschieden der Expressionsbanden für die einzelnen Proben. Während Sepiapterin den stärksten Einfluss aller Liganden in Zellkultur ausübte und zur signifikanten Zunahme der

Proteinrestmenge führte, war die Wirkung von BH₄, BH₂ und 6-MPH₄ im Vergleich zu Sepiapterin etwas schwächer, dennoch konnte eine Zunahme der I65T-Proteinrestmenge nachgewiesen werden. Auch die drei neuen Liganden **1**, **3**, **4** und sogar 4,5-Diaminopyrimidin konnten die Variante I65T durch ihre Bindung stabilisieren und die Menge an nachweisbarem Protein sogar signifikant erhöhen. Die geringste PAH-Proteinrestmenge zeigten die Proben ohne Ligand und im Komplex mit Ligand **2**.

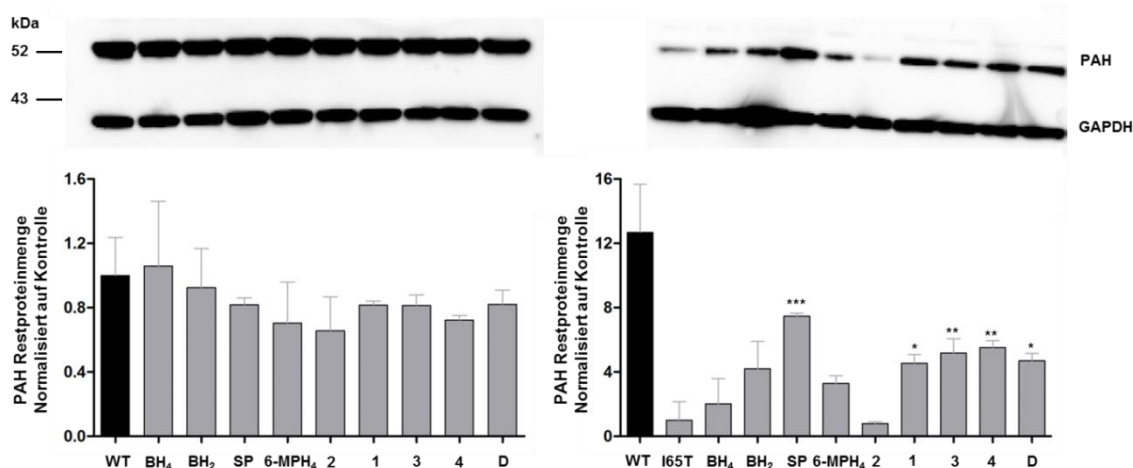


Abbildung 50. Analyse der Restproteinmenge nach Expression in COS-7 Zellen

Die mit Wildtyp (WT) oder I65T transient transfizierten COS-7 Zellen wurden mit jeweils 43 µM der Liganden BH₄, BH₂, Sepiapterin (SP), 6-MPH₄, Liganden **1-4** oder 4,5-Diaminopyrimidin (D) für 48 h inkubiert und anschließend lysiert. 25 µg Lysat wurden pro Geltasche aufgetragen und die transient exprimierte PAH durch Verwendung eines entsprechenden monoklonalen Antikörpers gegen PAH detektiert. Der gleichzeitige Nachweis von GAPDH diente als Ladungskontrolle. Das linke Balkendiagramm zeigt die Immunoquantifizierung des exprimierten PAH-Wildtyps, das rechte Balkendiagramm die Variante I65T. Die Daten wurden einer Varianzanalyse unterzogen (Dunnnett's test), bei der alle Werte des Wildtyps bzw. der Variante mit gebundenem Liganden mit der jeweiligen Kontrolle ohne Ligand verglichen wurden (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001). Die Standardabweichung ist für jede Bedingung als grauer Balken angegeben.

Die Zellkulturlysate, die zur Immunoquantifizierung eingesetzt wurden (Abbildung 50), dienten auch als Proben für den Enzymaktivitätsassay. Die Auswertung der Daten zeigte, dass die Bindung von Sepiapterin einen Anstieg der Enzymaktivität des Wildtyps induzierte, während die Bindung von Ligand **2** zur signifikanten Abnahme der Aktivität führte (Abbildung 51A). Alle anderen Liganden zeigten, passend zur vorhergehenden Blotanalyse, kaum Einfluss auf die Aktivität des Wildtyps. Die Aktivität der Variante I65T ohne Ligand war mit 8 % des Wildtyps deutlich reduziert (Abbildung 51B). Die Bindung von Sepiapterin führte zum signifikanten Anstieg der Enzymaktivität der Variante, sogar über den wichtigen Schwellenwert von 15 % hinaus. Auch die Liganden BH₂, **1**, **3**, **4** und 4,5-Diaminopyrimidin zeigten einen positiven Effekt auf die Restaktivität der Variante, während 6-MPH₄ und Ligand **2** keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatten.

Die Zellkulturdaten machten deutlich, dass die metabolische BH₄-Vorstufe Sepiapterin stets als interner Standard mitgeführt werden sollte, wenn es darum geht, neue potentielle pharmakologische Chaperone auf ihre stabilisierende Wirkung in Zellkultur zu testen. Drei

der vier in der Literatur als potentielle pharmakologische Chaperone für die PAH vorgeschlagenen Liganden (**1,3** und **4**) zeigten einen stabilisierenden Effekt auf die Variante I65T und konnten gleichzeitig deren Enzymrestaktivität erhöhen. Allerdings blieb ihre Wirkung weit hinter der von Sepiapterin zurück, vor allem in Bezug auf die Enzymfunktion. Erfreulich war, dass auch das im Rahmen der Promotionsarbeit als Ausgangssubstanz für weitere synthetische Modifikationen vorgeschlagene 4,5-Diaminopyrimidin sowohl die Proteinrestmenge als auch die Aktivität erhöhen konnte.

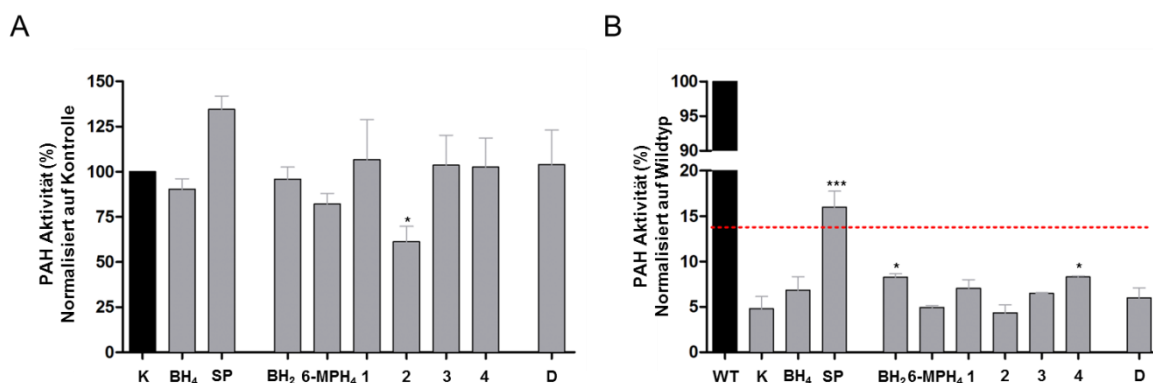


Abbildung 51. Analyse der PAH-Enzymrestaktivität nach Expression in COS-7 Zellen

Die mit Wildtyp (WT) oder I65T transient transfizierten COS-7 Zellen wurden mit jeweils 43 μ M der Liganden BH₄, Sepiapterin (SP), BH₂, 6-MPH₄, Liganden **1-4** oder 4,5-Diaminopyrimidin (D) für 48 h inkubiert und anschließend lysiert. 20 μ l Lysat wurden vor Durchführung des Aktivitätsassays mit 1 mM L-Phenylalanin für fünf Minuten pre-inkubiert und der Assay durch Zugabe von 75 μ M BH₄ gestartet. Nach 60 Minuten Laufzeit wurde die gebildete Menge an L-Tyrosin umgehend analysiert und das Ergebnis als Balkendiagramme für den PAH-Wildtyp (A) und die Variante I65T (B) dargestellt. Die Daten wurden einer Varianzanalyse unterzogen (Dunnett's test), bei der alle Werte des Wildtyps bzw. der Variante mit gebundenem Liganden mit der jeweiligen Kontrolle ohne Ligand verglichen wurden (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). Die Standardabweichung ist für jede Bedingung als grauer Balken eingezeichnet.

4.9 Hochdurchsatz-Screen zur Identifikation neuer pharmakologischer Chaperone

Seit 2014 bearbeitet unsere Arbeitsgruppe ein durch die Bayerische Forschungsförderung finanziertes Projekt zur Identifikation neuer pharmakologischer Chaperone zur Therapie der Proteinfaltungserkrankungen Phenylketonurie und Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase-Mangel (MCADM). Auch der MCADM wird wie die PKU im Rahmen des erweiterten Neugeborenen Screenings erfasst, das bei allen Neugeborenen am 3. Lebenstag durchgeführt wird. Am konkreten Beispiel der beiden Zielproteine PAH und MCAD sollen im Rahmen des Antrags spezifische, medikamentöse Behandlungsstrategien zur Korrektur der Proteinfaltung mittels pharmakologischer Chaperone entwickelt werden, wobei die molekulare Grundlage der Erkrankung auf Proteinebene gezielt adressiert wird.

Das Thema des Antrags fügte sich ideal in die bisherige Fragestellung der Promotionsarbeit ein und daher sollte die Promotion durch Bearbeitung einzelner Arbeitspakete des Antrags vervollständigt werden. Die bisher beschriebenen Daten zeigten vielversprechende Ansätze

für die als pharmakologische Chaperone für die PAH in der Literatur vorgeschlagenen Liganden. Es zeigte sich jedoch auch, dass keiner der bisher untersuchten Liganden das Wirksamkeitsniveau von BH_4 erreichte und damit der zugelassene Wirkstoff Sapropterindihydrochlorid weiterhin den stärksten therapeutischen Effekt im Sinne eines pharmakologischen Chaperones für die PKU aufweist. Es besteht also nach wie vor Forschungsbedarf auf dem Gebiet der PKU, vor allem, da Patienten mit homozygotem Genotyp für die *PAH*-Mutationen R408W bzw. IVS10-11G>A allein mehr als 25 % der PKU-Patienten im Bereich Europa und Mittlerer Osten abdecken (Danecka *et al.* 2015) und die betroffenen Patienten nicht von einer pharmakologischen Therapie mit BH_4 profitieren. Für dieses große Patientenkollektiv steht also noch kein pharmakologischer Therapieansatz zur Verfügung. Eine im Rahmen dieses Projektes identifizierte Wirksubstanz würde daher nicht in Konkurrenz zum bereits zugelassenen Medikament stehen, denn Träger dieser Mutationen werden derzeit ausschließlich diätetisch behandelt. Im Falle der Identifikation einer wirksamen Substanz für diese bisher schwer beeinflussbaren Genotypen, wäre der von den Zulassungsbehörden geforderte Nachweis des Nutzens für den Patienten erfolgversprechend, da die neue Substanz keine Vorteile gegenüber dem in diesen Fällen nichtwirksamen BH_4 , sondern nur im Vergleich zur Diät aufweisen müsste. Wegen der hohen Risiken einer lebenslangen streng phenylalaninarmen Diät, der hohen damit einhergehenden Belastungen und der daraus folgenden mangelhaften Adhärenz mit Auftreten neurologischer Symptome, wären die Erfolgsaussichten für die Zulassung daher sehr gut.

Aus diesem Grund hat sich unsere Arbeitsgruppe dazu entschlossen, einen weiteren breit angelegten *Screen* zur Identifikation neuer Leitsubstanzen für die PKU aufzusetzen, der durch die Bayerische Forschungsstiftung gefördert wurde. Das Vorhaben stellt gegenüber den bisherigen Ansätzen eine deutliche technologische und methodische Fortentwicklung dar, indem das Studiendesign auf einem methodisch breiten Ansatz mit Analyse vieler Parameter, der Durchführung des primären *Screens* sowohl am gereinigten Protein als auch in kultivierten Zellen, sowie der Testung an varianten PAH-Proteinen aufbaut. Die Kombination aller hier genannten Punkte führt zu einer hohen Validität der identifizierten *hit compounds*. Darüber hinaus wird mit der Analyse von bis zu sechs verschiedenen Zielproteinen das Spektrum der potentiell von der Therapie profitierenden Patienten in Bezug auf den zu Grunde liegenden Genotyp sehr breit gesteckt.

Zu Beginn sollte eine Datenbank mit über 8,8 Millionen Substanzen virtuell nach Liganden durchsucht werden, die aufgrund ihrer strukturellen Voraussetzungen an das PAH-Protein binden. Der Einfluss der daraus resultierenden Kandidatensubstanzen auf die thermische Stabilität von Wildtyp- und varianten PAH-Proteinen sollte im Rahmen der Dissertation analysiert werden und die Quantifizierung des Effektes durch Berechnung der Umschlagspunkte erfolgen, die eine Aussage zur thermischen Stabilität des Proteins in Abwesenheit und Anwesenheit der Liganden erlaubt. Nach Abschluss dieses primären *Screens* sollten *hit compounds* für die weiteren Arbeitsschritte ausgewählt werden, die eine Stabilisierung eines der Zielproteine um mindestens 2 °C erreichen konnten. Die Bindungsaffinität der identifizierten *hit compounds* sollte in einem anschließenden Schritt mittels MST bestimmt werden. In Kombination mit den parallel durch meine Kollegin Anna

Waldhuber durchgeführten Experimenten in Zellkultur (Zell-Screen) sollte es gelingen final einzelne, erfolgversprechende Kandidaten als Leitsubstanzen für die PAH zu identifizieren.

4.9.1 Auswahl von geeigneten *PAH*-Mutationen für den Screen

Zur Auswahl der Zielproteine standen Daten zur Verfügung, die bereits in unserer Arbeitsgruppe erhoben worden waren. Auf dieser Basis konnten die PAH-Varianten I65T, R261Q, R408W und Y414C als geeignete Zielproteine identifiziert werden. Die Mutation I65T zeigt die dritthäufigste Allelfrequenz und ist die häufigste BH₄-responsive Mutation weltweit. Sie führt zur Ausprägung eines milden klinischen Phänotyps. R261Q zeigt die vierthäufigste Allelfrequenz weltweit und ist je nach Mutation in *trans* nicht konsistent mit BH₄-Responsivität assoziiert. Daher variieren die Phänotypen abhängig von der Allelkombination stark zwischen milden Formen und schwerer Ausprägung. Die häufigste Mutation weltweit ist R408W, die homozygot ausschließlich zur Ausprägung schwerer Phänotypen führt und nicht mit einer BH₄-Responsivität assoziiert ist. Die Variante R408W zeigt im Gegensatz zu I65T und R261Q eine starke Aggregationstendenz, wobei neueste experimentelle Daten unserer Arbeitsgruppe bei Expression in Zellkultur eine minimal erhaltene Ausbildung von funktionellen Tetrameren zeigten, sodass diese Variante als Vertreter der zu Proteinaggregation führenden, bisher nicht durch BH₄ therapierbaren Mutationen untersucht werden soll – allerdings nur in Zellkultur, da eine rekombinante Expression in *E. coli* bisher nicht erfolgreich war (Gersting *et al.* 2008). Für die Charakterisierung in Zellkultur wurde auch die sehr weit verbreitete Mutation IVS10-11G>A ins Arbeitsprogramm aufgenommen. Alle ausgewählten Varianten zeigen Proteinfehlfaltung in unterschiedlicher Ausprägung und Charakteristik und durch die Auswahl einer Mutation aus jeder funktionellen Domäne der PAH wird eine möglichst breite Abdeckung struktureller Defekte der Zielproteine abgebildet, sodass bei einer weiteren Entwicklung zum Medikament eine möglichst große Patientengruppe von der Therapie profitieren kann.

4.9.2 Expression von Wildtyp und Varianten im Expressionsvektor pMAL-c2X DEST_TEV

Die Klonierung des PAH-Wildtyps und der drei Varianten I65T, R261Q und Y414C in einen Expressionsvektor mit N-terminaler Schnittstelle für die TEV-Protease, erfolgte durch Lars Mitschke aus unserer Arbeitsgruppe unter Anwendung der Invitrogen™ Gateway®-Klonierungstechnologie (Kapitel 3.2.1).

Im Rahmen der Promotionsarbeit erfolgte die Anzucht der MBP-PAH-Fusionsproteine von Wildtyp und Varianten in *E. coli*, sowie die Aufreinigung der Enzyme über Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.3). Nach proteolytischer Abspaltung des MBP-Fusionspartners durch die TEV-Protease, konnten in einem sich direkt anschließenden zweiten Gelfiltrationsschritt PAH und MBP-Fusionspartner erfolgreich separiert und bis zu 20 mg des geschnittenen Enzyms isoliert werden (Abbildung 52). Der Einsatz der TEV-Protease ermöglichte im Vergleich zu den zuvor verwendeten Faktor Xa Konstrukten die

Aufreinigung der Zielproteine in großen Mengen unter geringem Kostenaufwand, da die Protease im eigenen Labor gereinigt werden konnte.

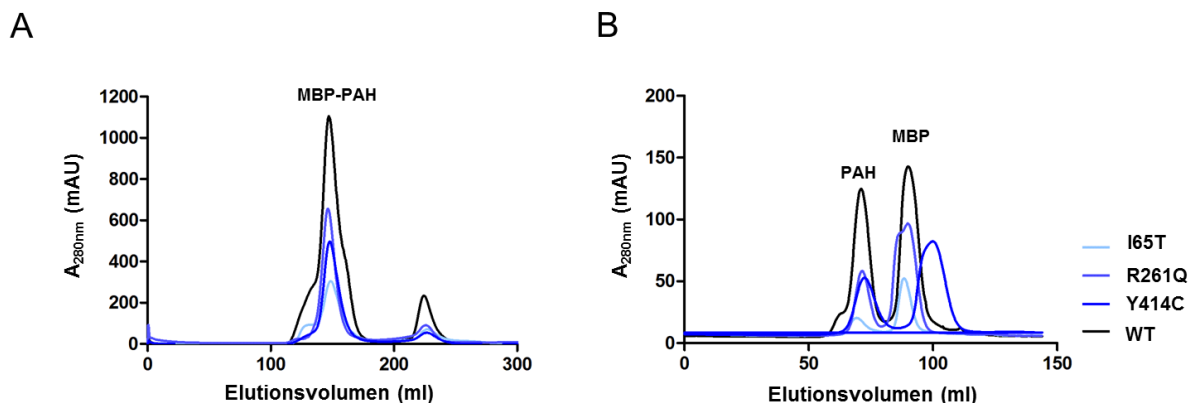


Abbildung 52. Oligomerisierungsprofile der Enzyme mit und ohne MBP-Fusionspartner

(A) Die Größenausschlusschromatographie zeigt die Absorption der MBP-PAH Fusionsproteine bzw. (B) PAH-Tetramere und ihres Fusionspartners MBP nach Inkubation der Fusionsproteine mit der TEV-Protease (Absorptionswellenlänge 280 nm).

4.9.3 Virtueller Screen zur Identifikation niedermolekularer Substanzen

In Zusammenarbeit mit der Biotechfirma *4SC Discovery GmbH* in München, wurden virtuelle Screens an den vorhandenen 3D-Kristallstrukturen der PAH durchgeführt um niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, die an zuvor definierte Bereiche der PAH binden. Hierbei wurden als Zielstrukturen nicht nur die bekannten Bindestellen im Zentrum des Proteins für Substrat bzw. Kofaktor ausgewählt, sondern mit Hilfe eines von der Firma entwickelten Algorithmus auch potentielle neue Bindetaschen identifiziert, gegen die dann eine Bibliothek von über 8,8 Millionen kommerziell erhältliche chemische Verbindungen getestet wurde. Dieser Ansatz erhöht einerseits die Wahrscheinlichkeit bindende Moleküle zu identifizieren, andererseits wird gleichzeitig das Spektrum der möglichen bindungsinduzierten strukturellen Effekte vergrößert, da die Bindung von Molekülen an verschiedene Zielstrukturen im Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit auch unterschiedliche konformative Umlagerungen induziert.

Auf Basis dieses virtuellen Screens konnten mehr als 1.000 potentiell bindende Substanzen für die PAH identifiziert werden. Sie wurden zunächst von erfahrenen Medizinalchemikern selektiert, um reaktive, problematische oder bereits patentierte Verbindungen auszuschließen und gleichzeitig den verfügbaren chemischen Raum möglichst breit abzudecken. Final wurden insgesamt 300 Substanzen ausgewählt und bei Zulieferern als Reinsubstanzen bestellt. Tatsächlich konnten 234 Substanzen geliefert werden, so dass eine umfangreiche chemische Substanzbibliothek für die PAH zur Verfügung stand. Ziel war es, alle 234 Kandidatensubstanzen auf ihr Potenzial als Wirkstoffkandidat an Hand der Korrektur der molekularen Pathophysiologie und auf Grundlage ihrer pharmakologischen

Charakterisierung experimentell *in vitro* und *in vivo* zu testen. Auf diese Weise sollten robuste Leitsubstanzen identifiziert werden, die dem weiteren Entwicklungsprozess durch industrielle Partner zugeführt werden können.

4.9.4 DSF-Screen

4.9.4.1 Planung des DSF-Screens

Der Einfluss der 234 zu testenden Kandidatensubstanzen auf die thermische Stabilität von PAH-Wildtyp und Varianten sollte zunächst in einem Hochdurchsatz-DSF-Screen analysiert werden. Die Etablierung des DSF-Entfaltungsassays an einem Gerät für *Real-Time-quantitative-PCR* mit einem 96-well Blockmodul erfolgte bereits zu einem früheren Zeitpunkt (Kapitel 4.6.3). Trotzdem wurde vor Beginn des großen Screens die thermische Entfaltung des neuen, durch die TEV-Protease geschnittenen Wildtyps, in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mg/ml analysiert, um für den Screen die optimale Proteinkonzentration festlegen zu können. SYPRO® Orange diente dabei als Fluoreszenzmarker, denn die hohe Anregungswellenlänge des Farbstoffes von 492 nm verringert die Wahrscheinlichkeit, dass eine große Anzahl an Kandidatensubstanzen mit den optischen Eigenschaften des Farbstoffes interferiert. Nach Auswertung der entsprechenden Thermogramme zeigte die Konzentration von 0,18 mg/ml Protein die besten Ergebnisse und wurde daher als Standardkonzentration für den Screen festgelegt.

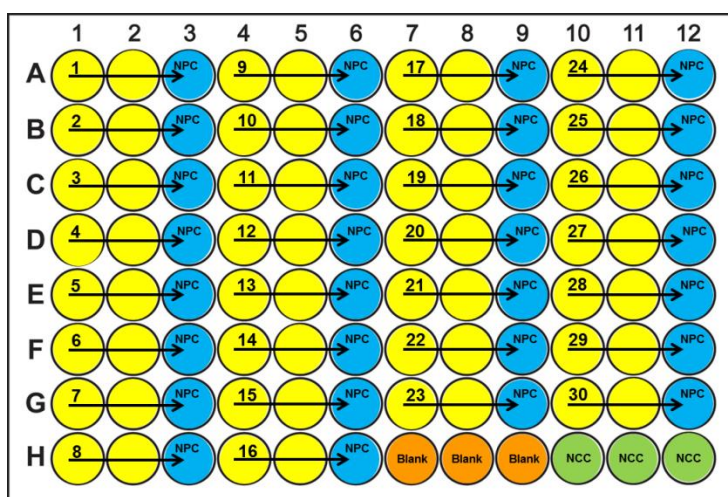


Abbildung 53. Beispielbelegung einer 96-well Platte im DSF-Screen

Pro 96-well Platte können 30 Kandidatensubstanzen als Duplikate analysiert werden (gelbe wells, 1-30). Für jeden Liganden wird eine Kontrollprobe ohne Protein zur Baselinekorrektur mitgeführt (NPC, *no protein control*; blaue wells). Als Laufkontrolle für jede Platte dient das jeweilige zu analysierende Protein ohne Ligand (NCC, *no compound control*; grüne wells). „Blank“-Proben zur Basislinienkorrektur der NCC-Probe enthalten ausschließlich Assaypuffer mit SYPRO® Orange (orange wells).

Im nächsten Schritt ging es darum die richtige Belegung der 96-well Platten für den *Screen* zu definieren (Abbildung 53). Jeder Ligand sollte als Duplikat in einer finalen Konzentration von 30 μM getestet werden. Zudem musste jede 96-well Platte zwei Kontrollen beinhalten; bei der ersten Kontrolle handelte es sich jeweils um das Enzym ohne gebundenen Liganden (*NCC*, *no compound control*). Sie diente bei der finalen Auswertung als Referenz für die Berechnung der thermischen Verschiebung. Die zweite Kontrolle war der jeweilige Ligand ohne zugegebenes Enzym (*NPC*, *no protein control*). Diese Kontrolle erlaubte eine Aussage über die Eigenfluoreszenz des Liganden im Assay. Zusätzlich wurde auf jeder Platte der Assaypuffer als Blank pipettiert. Mit diesem Setup konnten pro 96-well Platte 30 Liganden getestet werden, sodass für den Wildtyp zur Testung aller 234 Kandidatensubstanzen acht 96-well Platten vermessen wurden. Für den *Screen* der drei PAH-Varianten waren weitere 24 96-well Platten erforderlich, so dass im Rahmen des gesamten Screens 32 96-well Platten gemessen und ausgewertet wurden.

4.9.4.2 Durchführung des DSF-Assays und Berechnung der Umschlagpunkte

Die Schmelzkurven des PAH-Wildtyps zeigten auch mit SYPRO® Orange als Fluoreszenzmarker den typischen Verlauf (Abbildung 54A) der bisherigen Schmelzkurven aus niedriger Anfangsfluoreszenz zu Beginn der Messung, einem Maximum bei vollständiger Entfaltung sowie die Abnahme des Fluoreszenzsignals aufgrund von Aggregationsprozessen in der Probe. Ziel des primären DSF-Screens war es, den Effekt aller 234 Kandidatensubstanzen auf die thermische Stabilität und das Entfaltungsmuster von PAH-Wildtyp und varianten PAH Proteinen in Abwesenheit und Anwesenheit der Liganden zu analysieren und *hit compounds* zu finden, die eine Stabilisierung der Umschlagpunkte um mindestens 2 $^{\circ}\text{C}$ erzielen können.

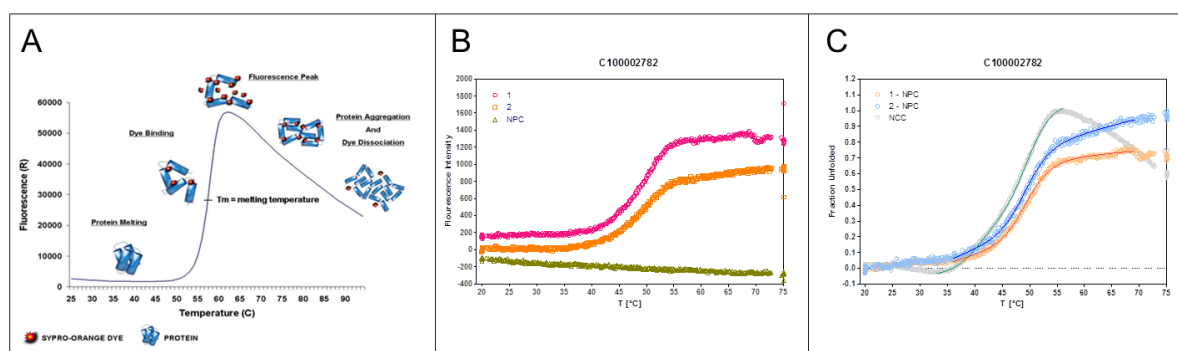


Abbildung 54. DSF-Assay mit SYPRO® Orange

(A) Die Abbildung zeigt die einzelnen Phasen einer schematischen Bindung und Dissoziation des Fluoreszenzmarkers SYPRO® Orange an ein Protein in Abhängigkeit von der Temperatur (Quelle: www.bio.anl.gov). (B) Das Diagramm zeigt die Rohdaten einer Beispielmessung für die Entfaltung der PAH im Komplex mit einer der Kandidatensubstanzen (C100002782). Die pinke und orange Kurve zeigen die beiden Replikate der Messung. Die NPC-Kontrolle ist in grün dargestellt. (C) Die Auswertung der Daten erfolgte durch Subtraktion der NPC-Kontrolle von den beiden Replikaten sowie Normalisierung der korrigierten Messwerte (blaue und orange gepunktete Kurve) und einem biphasischen Fit der Kurven (blaue und orange durchgezogenen Linien) zur Berechnung der Umschlagpunkte. Die graue Kurve zeigt die NCC-Kontrolle ohne zugegebenen Liganden.

Bei der Analyse der Rohdaten (Abbildung 54B) lag der Hauptaugenmerk auf der NPC-Probe, deren Eigenfluoreszenz das Messsignal nicht zu stark beeinträchtigen durfte, um mögliche Fehlinterpretationen nach Normalisierung der Schmelzkurven zu vermeiden. Von den 234 Kandidatensubstanzen wurden 26 Substanzen identifiziert, die das Fluoreszenz-Signal zu stark beeinflussten und daher nicht weiter charakterisiert wurden. Die Berechnung der zwei Umschlagpunkte T_{M1} und T_{M2} (Kapitel 4.2.4) für die verbleibenden Substanzen erfolgte nach Normalisierung der Daten durch Annäherung an eine biphasische Funktion (Abbildung 54C). Ein Vergleich der beiden Umschlagpunkte der jeweiligen Proteine im Komplex mit einem Liganden mit der zugehörigen NCC-Kontrolle erlaubte final eine Aussage über die thermische Stabilität des Proteins (Gleichung 4.1).

$$\Delta T_M = T_M (\text{Ligand}) - T_M (\text{NCC}) \quad (4.1)$$

Die Ergebnisse des DSF-Screens nach Berechnung aller Umschlagpunkte für den PAH-Wildtyp und die drei Varianten sind in Abbildung 55A zusammengefasst. Die vier benachbarten Spalten sind nach Wildtyp und Varianten sortiert und die jeweiligen Differenzen der Umschlagpunkte 1 und 2 sind einander gegenüber gestellt. Liganden mit $\Delta T_M > 0$ zeigten einen stabilisierenden Effekt auf mindestens eines der vier Enzyme durch Verschiebung der Schmelzkurve zu höheren Temperaturen (grüne Bereiche). Bei einer destabilisierenden Wirkung war der ΔT_M -Wert negativ (rote Bereiche). Zeigte ein Ligand keinen Effekt auf die thermische Stabilität, war $\Delta T_M = 0$ (schwarze Bereiche). Die Farbintensität korreliert dabei mit der Stärke der Effekte. Hellgrüne Bereiche symbolisieren beispielsweise eine Erhöhung der Schmelztemperatur um mindestens 5 °C.

Abbildung 55B fasst die berechneten ΔT_{M1} - und ΔT_{M2} -Werte für den PAH-Wildtyp und die Varianten in einem kartesischen Koordinatensystem zusammen, wobei Liganden die keinen oder nur einem geringen Effekt zeigten sich in der Mitte häufen. Die im ersten Quadranten liegenden Punkte sind den Liganden zuzuordnen, die im DSF-Screen sowohl T_{M1} als auch T_{M2} stabilisierten (Abbildung 55B und C). Liganden die beide Umschlagstemperaturen herabsetzten liegen im dritten Quadranten. Die in den Quadranten zwei und vier eingruppierten Liganden führten entweder zur Erhöhung von T_{M1} oder T_{M2} , wobei der jeweils andere Umschlagpunkt destabilisiert wurde. Die Ergebnisse aus Abbildung 55 fassen die Vielschichtigkeit der Effekte auf Wildtyp und Varianten gut zusammen.

4.9.4.3 Bioinformatische Analyse der DSF-Daten

Neben der Einteilung der Liganden in stabilisierende und destabilisierende Gruppen (Abbildung 55), erfolgte zusätzlich die bioinformatische Auswertung des DSF-Datensatzes durch den Bioinformatiker unserer Arbeitsgruppe, Mathias Woidy. Die Auswertung sollte neben den berechneten T_M -Werten auch die strukturellen Eigenschaften aller Liganden berücksichtigen und sie basierend auf ihren unterschiedlichen Effekten bzw. Kombinationen der Effekte auf Wildtyp und Varianten in verschiedene Cluster einteilen. Für die Clusteranalyse in Abbildung 56A und D wurde anhand der ΔT_M -Werte berechnet, wie stark

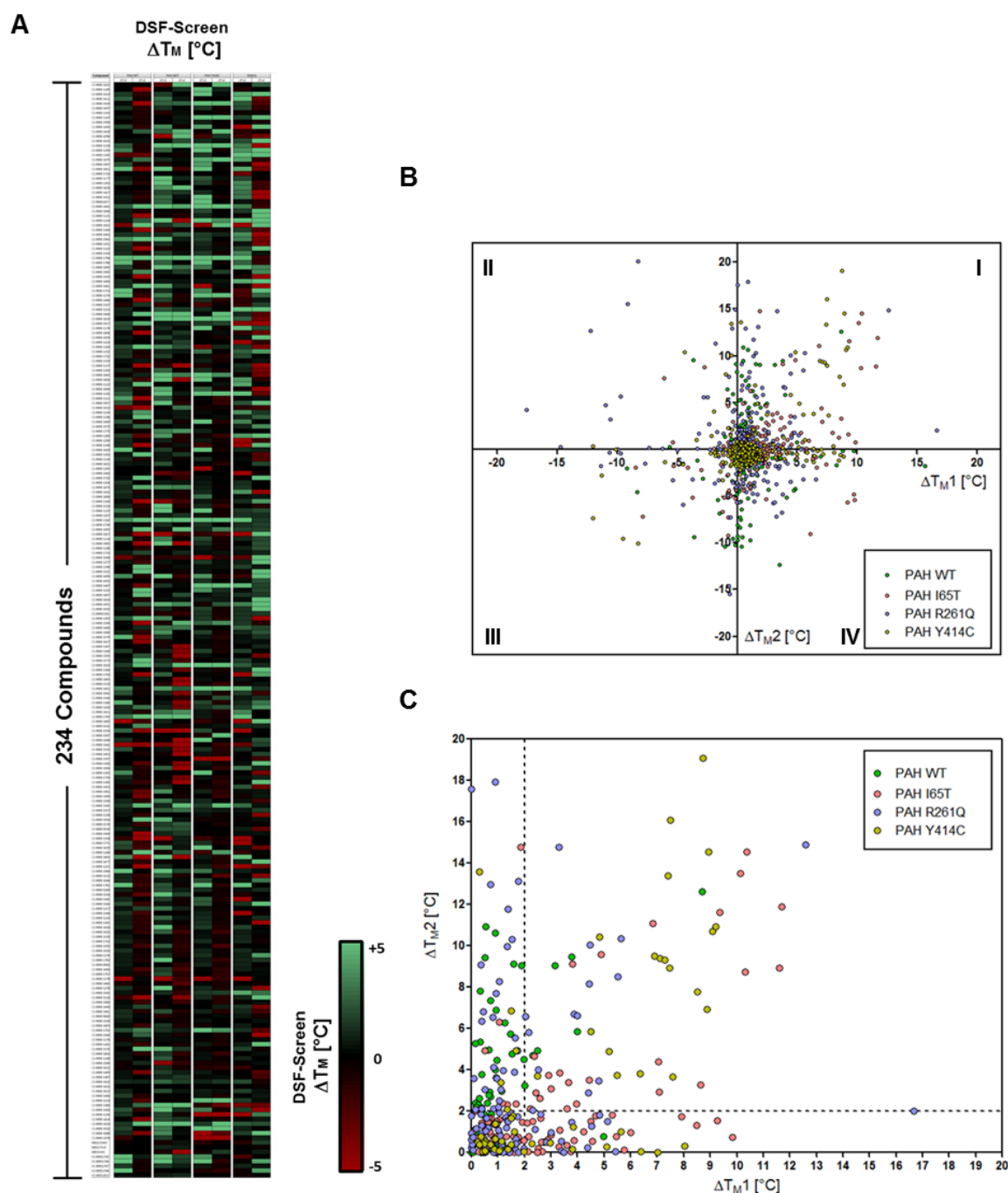


Abbildung 55. Ergebnisse des DSF-Screens

(A) Die Abbildung zeigt die berechneten ΔT_{M1} - (linke Spalten) und ΔT_{M2} -Werte (rechte Spalten) für den PAH-Wildtyp (WT) und die drei Varianten I65T, R261Q und Y414C. Der Farbcode markiert den Effekt des jeweiligen Liganden. Grüne Bereiche beschreiben eine durch den Liganden induzierte Stabilisierung, rote Bereiche symbolisieren den gegenteiligen Effekt und bei schwarzen Bereichen war $\Delta T_M = 0$. (B) Zusammenfassung aller ΔT_M -Werte in einem kartesischen Koordinatensystem, das sich in vier Quadranten (I, II, III und IV) einteilen lässt. Grüne Punkte symbolisieren Liganden, die einen Effekt auf den Wildtyp zeigten. Rote Punkte stehen für den Einfluss auf I65T, blaue Punkte für den Effekt auf R261Q und gelbe Punkte repräsentieren die Wirkung auf Y414C. Im ersten Quadranten sind Liganden eingruppiert, die beide Umschlagpunkte stabilisieren. Im dritten Quadranten liegen die Liganden, die beide Umschlagpunkte erniedrigen. Quadrant zwei und vier zeigt die Liganden, die entweder T_{M1} oder T_{M2} stabilisieren. (C) Die Abbildung ist eine vergrößerte Darstellung des ersten Quadranten aus Abbildung B und zeigt ausschließlich Liganden mit stabilisierendem Einfluss auf beide T_M -Werte. Die gestrichelten Linien symbolisieren den Cut-off bei $\Delta 2$ °C, der Temperaturdifferenz die mindestens erforderlich war um einen Liganden als „stabilisierend“ einzustufen.

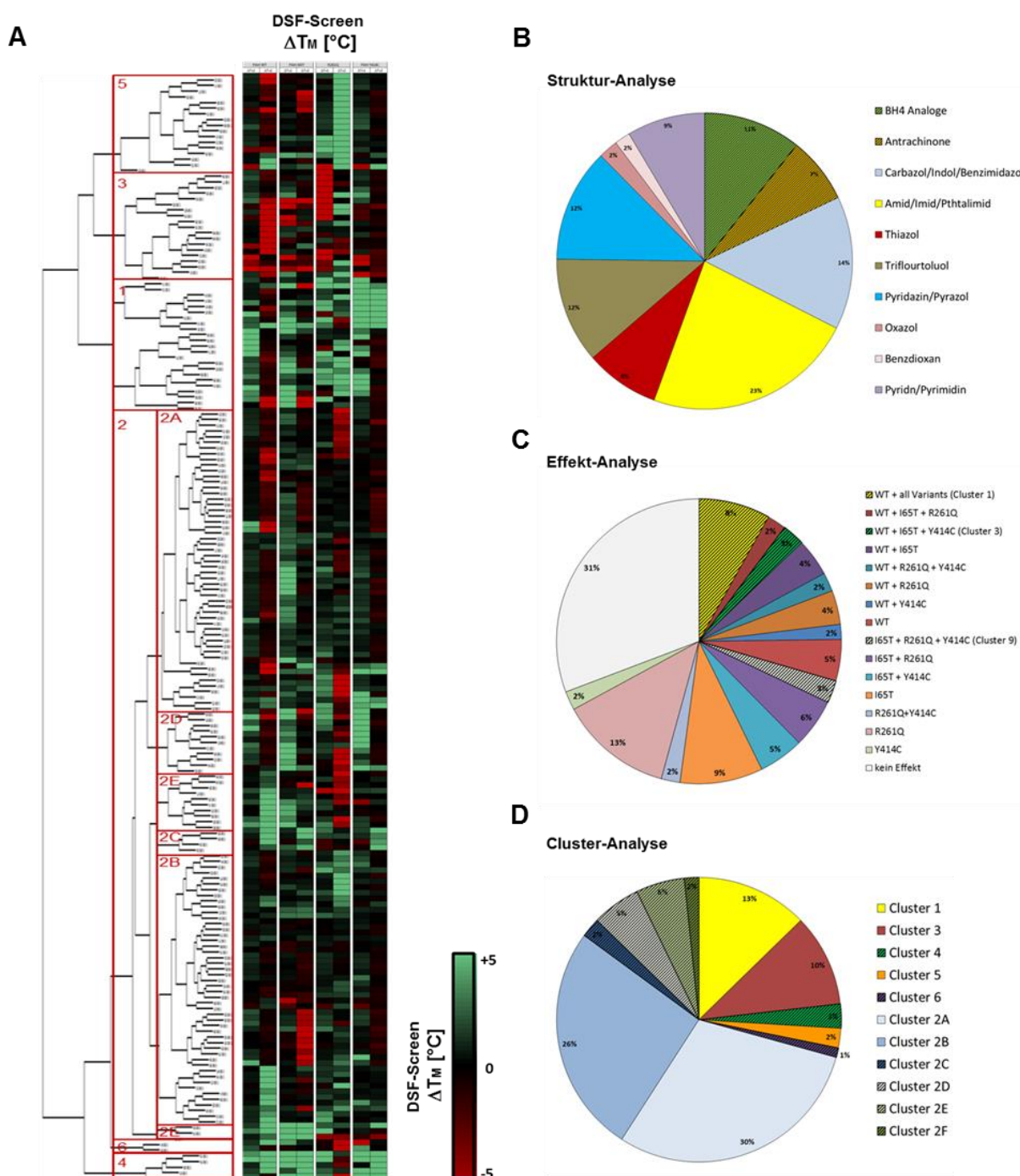


Abbildung 56. Bioinformatische Auswertung des DSF-Screens

(A) Die Abbildung zeigt die berechneten ΔT_{M1} - (linke Spalten) und ΔT_{M2} -Werte (rechte Spalten) für den PAH-Wildtyp (WT) und die drei Varianten I65T, R261Q und Y414C in Abhängigkeit von in Clustern (1-6 und 2A-2F) gruppierten Liganden. Der Effekt des jeweiligen Liganden ist nach dem Farbverlauf der Legende dargestellt, wobei grün eine durch den Liganden induzierte Stabilisierung beschreibt und rote Bereiche den gegenteiligen Effekt symbolisieren. (B) Die Struktur-Analyse teilt die 234 Liganden anhand ihres strukturellen Grundgerüsts in unterschiedliche Gruppen ein, deren Anteil sich prozentual unterscheidet. (C) Durch die Effekt-Analyse wurden Liganden identifiziert, die sich auf unterschiedlichste Enzymgruppierungen positiv auswirken. (D) Die Cluster-Analyse zeigt im prozentualen Überblick den Anteil der jeweiligen Liganden im entsprechenden Cluster aus der Clusteranalyse der 234 Liganden an.

sich ein Ligand von einem anderen unterscheidet und das Ergebnis in einer Distanzmatrix niedergeschrieben, in welcher ähnliche Liganden in gleiche Zweige sortiert wurden. Die Clusteranalyse zeigte vielversprechende Liganden in den Clustern 4, 6, 2C, 2E und 2F (Abbildung 56A). Für die Strukturanalyse (Abbildung 56B) wurden die 234 Liganden hinsichtlich ihres Grundgerüsts in verschiedene Gruppen, wie beispielsweise BH₄-Derivate, Oxazole, Thiazole etc., eingeteilt. Dann konnte analysiert werden welches Grundgerüst einen positiven Effekt im DSF-Screen zeigte und vermehrt stabilisierend wirkte. Die Strukturanalyse belegte, dass dies für die Liganden mit Antrachinon-Gruppe und die Gruppe der BH₄-Homologen besonders zutreffend war. Durch die Effekt-Analyse (Abbildung 56C) wurden Liganden identifiziert, die einen positiven Effekt auf den PAH-Wildtyp einschließlich aller Varianten (Effekt-Cluster 1), oder auf alle Varianten (Effekt-Cluster 9) bzw. auf den Wildtyp in Kombination mit I65T und Y414C (Effekt-Cluster 3) zeigten.

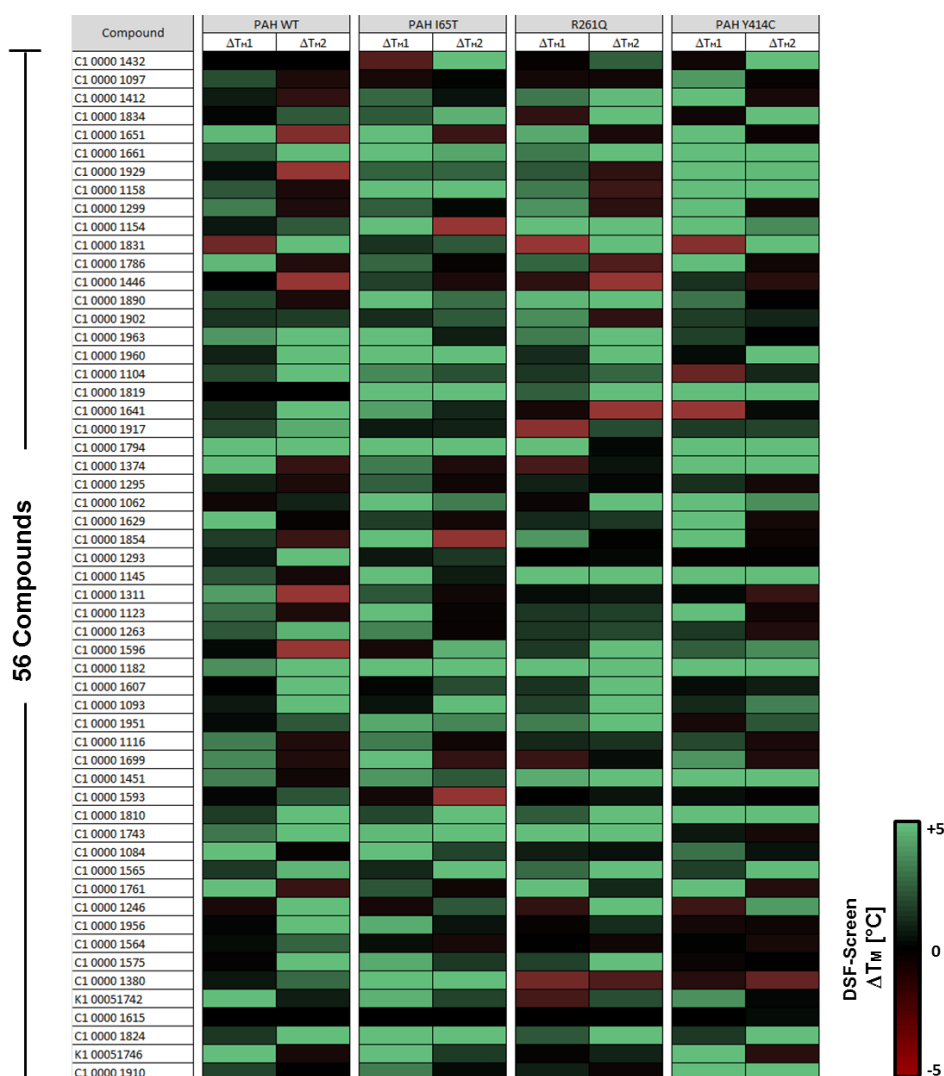


Abbildung 57. Ergebnis des DSF-Screens

Die Spalten repräsentieren die berechneten ΔT_m1 - (linke Spalten) und ΔT_m2 - (rechte Spalten) Werte des PAH-Wildtyps (WT) und der Varianten I65T, R261Q und Y414C. Das Ausmaß des Effektes des jeweiligen Liganden ist nach dem Farbverlauf der Legende dargestellt.

Durch den umfassenden DSF-Screen und die anschließende bioinformatische Auswertung der Daten wurden aus den insgesamt 234 getesteten Kandidatensubstanzen 51 Liganden identifiziert, die einen positiven Effekt auf die thermische Stabilität der gereinigten Proteine des PAH-Wildtyps und/oder der Varianten zeigten. Zusätzlich zu diesen 51 Liganden wurden weitere fünf Liganden als Kontrollen für die weitere Charakterisierung ausgewählt, die keinen Effekt im DSF-Screen zeigten. Somit war das Ergebnis des DSF-Screens eine finale Liste mit insgesamt 56 Liganden, die in Abbildung 57 dargestellt ist.

4.9.5 Messung der Bindungskonstanten von 74 Kandidatensubstanzen

Die Etablierung der MST-Messung am PAH-Wildtyp erfolgte bereits im Zusammenhang mit der Charakterisierung der Bindungseigenschaften von BH₄ (Kapitel 4.3.3). Dabei wurden Protein-Labeling, Pufferbedingungen, Laserintensität und die Auswahl geeigneter Kapillaren getestet und erfolgreich optimiert, um jetzt die Bindungskonstanten der 56 *hits* aus dem DSF-Screen zu messen. Aus dem parallel durch meine Kollegin Anna Waldhuber durchgeführten Zell-Screen resultierten 18 weitere Kandidatensubstanzen, die sich *in vivo* stabilisierend auf PAH-Wildtyp und/oder Varianten auswirkten, so dass insgesamt die Bindungseigenschaften von 74 Liganden mittels MST analysiert wurden. Für acht Liganden konnte die Bindung an den PAH-Wildtyp nachgewiesen und quantifiziert werden. Darüber hinaus ergaben sich drei weitere potenzielle Binder. 49 Liganden zeigten keine Bindung im MST-Screen. Für 14 Liganden war eine abschließende Quantifizierung nicht möglich (keine Sättigung, Fluoreszenzeffekte, niedrige Messsignale). Für die elf verbleibenden Liganden sind die Bindungskonstanten in nachfolgender Tabelle 28 gelistet.

Ligand	MST K _D [μM]
C1 0000 0141	3,26
C1 0000 1641	11,9
C1 0000 1295	22,5
C1 0000 1854	24,1
C1 0000 1615	29,6
C1 0000 1607	30,7
C1 0005 1746	120,2
C1 0000 1158	130,7
C1 0000 1890	143,8
C1 0000 1432	149
C1 0000 1412	276,3

Tabelle 28. Mit MST gemessene Bindungskonstanten K_D

Durch Kombination der Ergebnisse aus DSF-, Zell- und MST-Screen kann die Anzahl der Kandidatensubstanzen von bisher 74, auf inzwischen elf eingegrenzt werden. Die Daten aus den drei Screen-Verfahren sind nachfolgend in Abbildung 58 zusammengestellt.

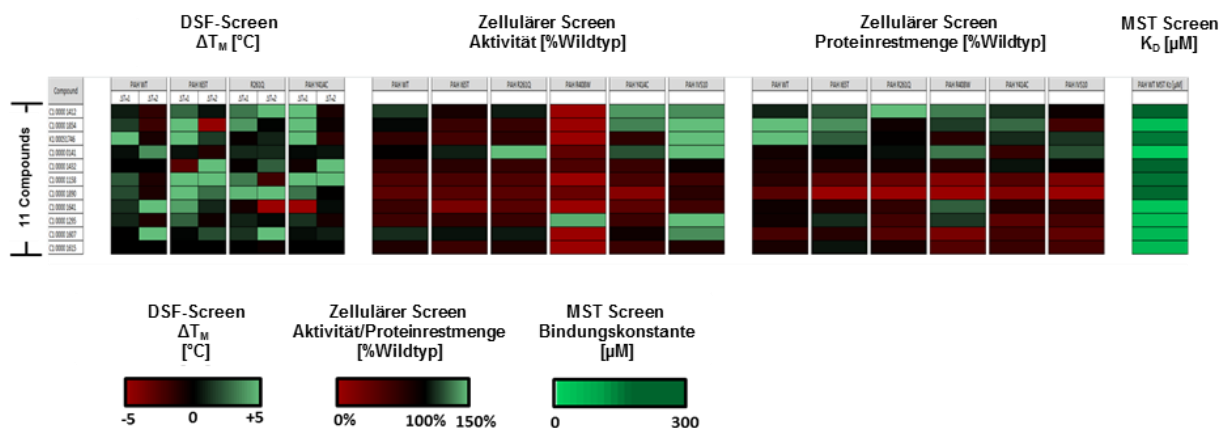


Abbildung 58. Ergebnisse aus DSF-, Zell- und MST-Screen

Die Spalten im DSF-Screen repräsentieren jeweils die berechneten ΔT_{m1} - (linke Spalten) und ΔT_{m2} - (rechte Spalten) Werte des PAH-Wildtyps (WT) und der drei PAH-Varianten I65T, R261Q und Y414C. Die Spalten aus dem zellulären Screen (Erhebung der Daten durch Anna Waldhuber) zeigen, sortiert nach Aktivität und Proteinrestmenge, jeweils die Daten des PAH-Wildtyps und der fünf PAH-Varianten I65T, R261Q, R408W, Y414C und IVS10 (von links nach rechts). Der Effekt des jeweiligen Liganden ist nach dem Farbverlauf der Legende dargestellt, wobei grün eine Stabilisierung im DSF-Screen bzw. eine durch den Liganden induzierte Erhöhung der Aktivität oder der Proteinrestmenge darstellt. Rote Bereiche beschreiben die gegenteiligen Effekte auf die gemessenen Parameter. Die Bindungseigenschaften der Liganden wurden im MST-Screen bestimmt, wobei hellgrün hinterlegte Liganden eine niedrige K_D und somit eine hohe Bindungsaffinität aufwiesen.

4.9.6 Ergebnis des Screens nach neuen pharmakologischen Chaperonen

Basierend auf dem virtuellen Screen einer Datenbank von über 8,8 Millionen kommerziell erhältlicher Substanzen wurden 234 Liganden identifiziert, die an das PAH-Protein binden können. Um eine kombinierte Analyse der Wirkeffekte aller 234 Liganden auf biophysikalische Parameter und therapeutische Endpunkte auf zellulärer Ebene auf PAH-Wildtyp und Varianten durchführen zu können, wurden drei unterschiedliche Screens im Labor etabliert. Nach Analyse aller Liganden im DSF-, Zell- und MST-Screen (Abbildung 59) konnten aus den ursprünglichen 234 Substanzen drei Liganden identifiziert werden (gelbe Schnittmenge), die sowohl bei Anlegen von Hitzestress einen stabilisierenden Einfluss auf die gereinigten Zielproteine hatten (DSF-Screen), als auch auf zellulärer Ebene Wirkeffekte zeigten (Zell-Screen) und deren Bindung an das PAH-Protein experimentell bestätigt werden konnte (MST-Screen). Bei diesen drei identifizierten Liganden könnte es sich um erfolgversprechende Leitsubstanzen für die zukünftige Behandlung der PKU handeln, die durch externe Partner weiter charakterisiert und einem pharmakologischen Entwicklungsprozess zugeführt werden sollen.

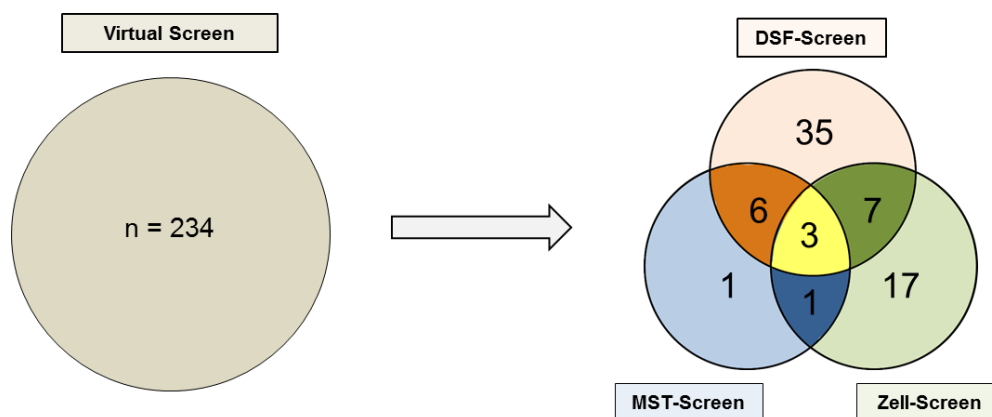


Abbildung 59. Ergebnis der drei unabhängigen Screens

Der virtuelle *Screen* selektierte 234 Substanzen aus einer Datenbank, die an die PAH binden (linke Abbildung). Die Anzahl der Liganden mit positivem Effekt innerhalb des jeweiligen *Screen*-Verfahrens ist in der rechten Abbildung dargestellt. Liganden, die in unterschiedlichen *Screen*-Verfahren positive Ergebnisse zeigten, sind in den Schnittmengen positioniert und mit dunkler Farbe hervorgehoben. Die gelbe Schnittmenge aus drei Liganden entspricht einem positiven *hit* im Rahmen aller drei Screens.

5 Diskussion

Stand der Forschung zu Beginn der Dissertation

Die PKU gehört zur großen Gruppe der monogenetischen Erkrankungen, die derzeit mehr als 6.000 bekannte Krankheiten umfasst, die sich in ihrer Häufigkeit stark unterscheiden. Teilweise existieren nur wenige beschriebene Fälle weltweit, bei anderen Erkrankungen ist dagegen mehr als 1 von 10.000 Menschen betroffen, so dass insgesamt 1 von 500 Neugeborenen an einer monogenetischen Erkrankung leidet. Für viele dieser Krankheiten sind derzeit keine oder nur belastende und risikoreiche Therapien verfügbar. Es besteht also dringender Handlungsbedarf in Bezug auf neue Behandlungsoptionen. In den vergangenen Jahren konnte bei einer überraschend großen Zahl monogenetischer Erkrankungen mutationsbedingte Fehlfaltung mit Funktionsverlust der betroffenen Proteine als gemeinsames molekulares Prinzip der Krankheitsentstehung identifiziert werden. Es handelt sich um eine genetisch determinierte Veränderung der Raumstruktur der Proteine, die zu Destabilisierung, Aggregation, beschleunigtem Abbau und letztlich zu einer Reduktion der intrazellulär verfügbaren Menge an funktionellem Protein führt. Diese Erkrankungen werden Proteinfaltungserkrankungen mit *loss-of-function* genannt. Sie unterscheiden sich pathophysiologisch von den klassischen neurodegenerativen Krankheitsbildern (M. Alzheimer, M. Parkinson, Chorea Huntington), die als Gruppe der *gain-of-toxic-function*-Erkrankungen klassifiziert werden, bei denen die Proteinfehlfaltung zur Bildung toxischer Aggregate und dadurch zum neuronalen Zelltod führt. Unsere Arbeitsgruppe konnte neben anderen Gruppen weltweit zeigen, dass es sich auch bei der PKU um eine Proteinfaltungserkrankung mit *loss of function* handelt (Waters 2003, Pey *et al.* 2004a, Gersting *et al.* 2008). Nachdem die molekularen Mechanismen der Krankheitsentstehung für die PKU damit umfassend aufgeklärt worden waren, sollte ein neuer therapeutischer Ansatz entwickelt werden, der eine gute Alternative zur bisher eingesetzten strengen phenylalaninarmen Diät darstellt. Der angestrebte Lösungsansatz sah vor, die mutationsbedingte Proteinfehlfaltung der PAH durch spezifische Bindung niedermolekularer Verbindungen über eine Stabilisierung des betroffenen Enzyms zu korrigieren. Das sollte u.a. im Rahmen der Dissertation am Beispiel des natürlichen Kofaktors der PAH, Tetrahydrobiopterin (BH₄), analysiert werden. Ausgangspunkt für diesen Lösungsansatz war die klinische Zufallsbeobachtung, dass HPA-Patienten ohne BH₄-Defizienz auf die Gabe pharmakologischer Dosen von BH₄ eine Reduktion der Phenylalaninkonzentration im Blut zeigten (Kure *et al.* 1999). Eine erste systematische klinische Studie unserer Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass 80 % aller Patienten mit milden PKU-Phänotypen von einer pharmakologischen Therapie mit BH₄ profitieren (Muntau *et al.* 2002). Die BH₄-Gabe führte sowohl zur Reduktion der Phenylalaninkonzentration im Blut, als auch zur Normalisierung der PAH-Enzymaktivität *in vivo*, was wiederum eine deutliche Erhöhung der diätetischen Phenylalanintoleranz zur Folge hatte. 2007 wurde Sapropterindihydrochlorid, die synthetische Form von BH₄, als erstes pharmakologisches Chaperon zur Therapie der HPA in den USA zugelassen. Ein Jahr später erfolgte auch die Zulassung als *orphan drug* in Europa. Ab dem Zeitpunkt der Zulassung des Medikaments wurde therapeutisch in den

Phenylalaninstoffwechsel eingegriffen, ohne den genauen Mechanismus der Wechselwirkung von Sapropterindihydrochlorid mit dem Phenylalaninhydroxylase-System zu kennen. Dennoch war es dadurch zum ersten Mal möglich, den biochemischen und molekularen Phänotyp von Patienten mit BH₄-responsiver PKU medikamentös zu therapieren, was einen Paradigmenwechsel in Bezug auf die Therapie genetischer Erkrankungen mit Proteinfehlfaltung darstellte.

Diese für die Stoffwechselmedizin wichtige Erkenntnis, dass pharmakologische Dosen des natürlichen Kofaktors im Patienten zur deutlichen Absenkung der pathologischen Phenylalaninkonzentration führen, war für unsere Arbeitsgruppe der Ausgangspunkt für ein umfangreiches Forschungsprojekt, in das die hier vorgelegte Dissertation eingebunden war. Die Schwerpunkte der Dissertation waren (i) die Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung zwischen der PAH und ihrem natürlichen Kofaktor BH₄, um die Einflüsse der beiden strukturellen Elemente des Kofaktors, Pyrimidopyrazin-Ringsystem und Dihydroxypropylseitenkette, auf das Enzym zu analysieren. Hierzu wurde neben BH₄ auch der Einfluss der BH₄-Derivate BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ sowie bereits publizierter Kandidatensubstanzen auf den PAH-Wildtyp und drei PAH-Varianten untersucht. (ii) die Durchführung eines breit angelegten Screening-Ansatzes zur Identifikation weiterer pharmakologischer Chaperone für die PAH.

Sapropterindihydrochlorid, das erste pharmakologische Chaperon auf dem Markt

BH₄ spielt als natürlicher Kofaktor eine Schlüsselrolle in der Regulation der PAH-Enzymfunktion und setzt sich aus den beiden strukturell unterschiedlichen Elementen des Pyrimidopyrazin-Grundgerüsts und der Dihydroxypropylseitenkette zusammen. Einerseits katalysiert BH₄ als Kofaktor die Hydroxylierungsreaktion von Phenylalanin zu Tyrosin, andererseits hemmt es in hohen Konzentrationen die Enzymaktivität der PAH. Im Rahmen der Dissertation konnte durch den vergleichenden Einsatz der in Grundgerüst oder Seitenkette abweichenden BH₄-Derivate (BH₂, Sepiapterin, 6-MPH₄) gezeigt werden, dass für die Ausübung dieser beiden gegensätzlichen Effekte das Vorliegen der zwei strukturell unterschiedlichen Elemente des Kofaktors wichtig ist.

Das Pyrimidopyrazin Ringsystem ist dabei für die Ausübung der Kofaktoraktivität verantwortlich, die in einem breiten Konzentrationsbereich für BH₄ und 6-MPH₄ mit Hilfe von *PAH activity landscapes* dargestellt werden konnte. BH₂ und Sepiapterin waren dagegen aufgrund ihres höher oxidierten Grundgerüsts nicht dazu in der Lage, die Hydroxylierungsreaktion von Phenylalanin zu katalysieren. Die Dihydroxypropylseitenkette an C6 ist dagegen für die Ausübung der Inhibierung unerlässlich, da diese eine Folge der Interaktion der Dihydroxypropylseitenkette mit S23 in der IARS ist (Teigen and Martinez 2003). Dies konnte durch die entsprechenden Inhibierungsassays mit BH₄, BH₂ und Sepiapterin belegt werden. 6-MPH₄ mit deutlich verkürzter Seitenkette zeigte hingegen selbst in hohen Konzentrationen keinen inhibierenden Effekt auf die PAH. Zu diesen Ergebnissen passten auch die durchgeführten *molecular modeling* Studien. Sie machten deutlich, dass

das im aktiven Zentrum der PAH ausgebildete Interaktionsnetzwerk von BH₄ und den drei Derivaten sehr ähnlich ist und nur im Fall von 6-MPH₄ die Hauptinteraktionen der Seitenkette fehlten. Diese Erkenntnisse konnten experimentell durch Messung der Dissoziationskonstanten bestätigt werden, denn BH₄, BH₂ und Sepiapterin zeigten ähnliche und sehr starke Enzym-Ligand Interaktionen mit Bindungskonstanten im einstelligen micromolaren Bereich, während die Bindungsstärke von 6-MPH₄ deutlich schwächer war.

Die Auswertung der Daten zu Hydrophobizität und intrinsischer Tryptophanfluoreszenz ergab Hinweise sowohl auf globale, intramolekulare Verschiebungen als auch auf lokale Änderungen in der regulatorischen Domäne der PAH durch Bindung der Liganden. Hierbei konnte, wie bereits bei Auswertung der Aktivitätsdaten, erneut eine gegensätzliche Wirkung von Pyrimidopyrazin-Ringsystem und Dihydroxypropylseitenkette auf das Enzym belegt werden, die sich besonders in der gegensätzlichen Wirkung von Sepiapterin und 6-MPH₄ manifestierte. Die Bindung von Sepiapterin führte zu einer signifikanten Abnahme der an der Proteinoberfläche exponierten hydrophoben Gruppen des PAH-Wildtyps, während 6-MPH₄ den gegenteiligen Effekt zeigte. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass ein Anstieg der Hydrophobizität durch Bindung des Substrats L-Phenylalanin ausgelöst werden kann, denn durch die L-Phe Bindung werden konformative Änderungen in den *hinge-bending* Regionen 111-117 und 218-226 induziert, die eine Verschiebung der flexiblen, regulatorischen sowie äußerst starren katalytischen Domänen innerhalb des Enzyms verursachen (Stokka *et al.* 2004). Diese konformativen Änderungen sind letztendlich ausschlaggebend für die Aktivierung der PAH und arretieren das Enzym in einer *r-state* ähnlichen, flexiblen Konformation. Die Ergebnisse der Dissertation legen die Vermutung nahe, dass diese intramolekularen Verschiebungen, die mit einer Erhöhung der Hydrophobizität einhergehen, durch das Vorliegen der 2-Hydroxy-1-oxopropyl Seitenkette von Sepiapterin erschwert werden. Die Bindung von 6-MPH₄ dagegen ermöglicht dem Enzym, auch in Abwesenheit des Substrats eine *r-state* ähnliche Konformation einzunehmen, was durch Zunahme der Hydrophobizität nach 6-MPH₄-Bindung belegt wird. Diese Ergebnisse stimmen auch gut mit den Ergebnissen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenzspektren überein, die über solvatochrome Veränderungen des W120-Restes in der regulatorischen Domäne der PAH Auskunft geben. Auch hier zeigte sich ein gegenläufiger Effekt von Sepiapterin und 6-MPH₄. Während die Bindung von Sepiapterin zur hypsochromen Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von W120 führte, bewirkte 6-MPH₄ eine bathochrome Verschiebung des Peaks in den längerwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Die 6-MPH₄ Bindung im aktiven Zentrum der PAH induzierte somit konformative, intramolekulare Veränderungen im Enzym, die sich bis in die regulatorische Domäne der PAH auswirkten und zu einer besseren Lösemittelzugänglichkeit des W120-Restes, einschließlich eines weniger kompakten N-Terminus, führten. Diese konformativen Änderungen sind vermutlich auch vergleichbar mit den Verschiebungen, die durch die Bindung von L-Phe im aktiven Zentrum der PAH ausgelöst werden.

Wie bereits aus der Literatur bekannt war (Knappskog and Haavik 1995), konnte auch im Rahmen der Dissertation gezeigt werden, dass die Bindung von L-Phe einen Anstieg der messbaren Fluoreszenzintensität induzierte, während die Bindung von BH₄ (Dobrowolski *et*

al. 2009) und 6-MPH₄ mit einer Löschung des Fluoreszenzsignals einherging. Des Weiteren war bekannt (Teigen and Martinez 2003), dass die Dihydroxypropylseitenkette des Kofaktors für die Wechselwirkung mit der IARS am N-Terminus der PAH verantwortlich ist, wodurch der N-Terminus teilweise in das aktive Zentrum der PAH gezogen wird und hierdurch die L-Phe-Bindestelle blockiert. Hierbei wurde immer davon ausgegangen, dass es dadurch zu einer Abnahme des hydrodynamischen Radius der PAH kommen muss. Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation konnte erstmals mit Hilfe von DLS-Experimenten belegt werden, dass durch die Bindung von BH₄ im aktiven Zentrum der PAH globale, konformative Änderungen innerhalb des Enzyms ausgelöst werden, die den Wildtyp in eine kompaktere, *t-state* ähnliche Konformation überführen und eine Abnahme des hydrodynamischen Radius nach sich ziehen. Die Bindung von Sepiapterin mit einer höher oxidierten 2-Hydroxy-1-oxopropyl Seitenkette im aktiven Zentrum der PAH könnte die Wechselwirkung mit S23 noch verstärken, was die Abnahme der Hydrophobizität einschließlich reduzierter Lösemittelzugänglichkeit von W120 im Sepiapterin-PAH Komplex sowie eine deutlichen Abnahme des Stokes-Radius erklären könnte. Auch BH₄ führte zur Abnahme des hydrodynamischen Radius, allerdings waren die erzielten Auswirkungen auf die Hydrophobizität und die W120-Fluoreszenz nicht so stark wie im Fall von Sepiapterin. Die Bindung von BH₄ und Sepiapterin überführte das Enzym somit nachweislich in eine stabilere (weniger aktive) Konformation, was sich auch am Anstieg der messbaren Aktivierungsenergie des PAH-BH₄ und PAH-Sepiapterin Komplexes zeigte.

Den besten Schutz gegen angelegten Hitzestress bot der natürliche Kofaktor der PAH und nicht dessen Derivate. Dies wurde mittels thermischer DSF-Assays belegt, die eine Quantifizierung des Einflusses von Liganden auf die Stabilität der PAH ermöglichen. Die durch Bindung der Liganden induzierten konformativen Änderungen können sich direkt auf die Entfaltung des Enzyms auswirken und zur Erhöhung oder Erniedrigung der entsprechenden Schmelztemperatur führen. Das Ausmaß des Effektes ist dabei nicht nur auf den direkten Kontakt zwischen Enzym und Ligand beschränkt, sondern auch auf weitreichende intramolekulare Veränderungen, die die Flexibilität der PAH verändern, indem die Bindung der Liganden die Translations- und Rotationsfreiheitsgrade des Systems herabsetzen. In diesem Zusammenhang war es möglich, den Einfluss niedermolekularer Verbindungen auf unterschiedliche Domänen des Proteins zu analysieren, denn die Entfaltung der PAH erfolgt sequentiell in zwei Schritten. Zunächst entfalten die regulatorischen Domänen der PAH und bei höheren Temperaturen die katalytischen Domänen, bevor das Enzym bei noch höheren Temperaturen irreversibel aggregiert. Der Einfluss der Liganden auf die entsprechenden Bereiche konnte daher gut quantifiziert werden.

Im Rahmen der Dissertation konnte durch die unterschiedlichen biophysikalischen Experimente gezeigt werden, dass der pharmakologische Chaperon-Effekt von BH₄ auf den durch den Kofaktor ausgelösten intramolekularen Verschiebungen der regulatorischen und katalytischen Domänen basiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die BH₄-Bindung ein Netzwerk verschiedenster Aminosäuren der PAH adressiert, das die Bindung des Kofaktors kommuniziert und die teilweise gegensätzlichen strukturellen Veränderungen innerhalb des

Enzyms induziert, die schlussendlich dazu führen, dass die PAH eine stabile, *t-state* ähnliche Konformation einnimmt. Die beiden strukturellen Elemente des Kofaktors (Seitenkette und Ring) sind dabei eine zwingende Voraussetzung für die Induktion der konformativen Umlagerungen. Wir konnten zeigen, dass die strukturellen Elemente jeweils eine definierte physiologische Rolle bei der Ausübung der Kofaktorfunktion oder bei der Inhibition der Enzymaktivität spielen. Anhand der vergleichenden Analyse der BH₄-Derivate zeigte sich, dass nur BH₄ die beiden gegensätzlichen Eigenschaften aus Katalyse und Inhibition die für die Regulierung der PAH-Aktivität erforderlich sind, perfekt in einem Molekül vereint.

Weitere *molecular modeling* Studien sind notwendig, um das BH₄-Aminosäurenetzwerk zu identifizieren, das für die intramolekulare Kommunikation der BH₄-Bindung zuständig ist und dieses dann über Klonierung und Charakterisierung der entsprechenden PAH-Varianten zu bestätigen.

Charakterisierung von PAH-Varianten

Um den Effekt von BH₄ nicht nur auf den PAH-Wildtyp zu testen, wurden drei PAH-Varianten zur Charakterisierung ausgewählt, die jeweils eine der drei funktionellen Domänen der PAH repräsentieren. Im Rahmen der biophysikalischen Charakterisierung der Varianten im nativen Zustand, also ohne gebundene Liganden, zeigte jede der Varianten mindestens ein charakteristisches Merkmal. Bei der strukturell präaktivierten Variante R68S aus der regulatorischen Domäne war die Hydrophobizität im Grundzustand stark erhöht und das Peakmaximum der Tryptophanfluoreszenz bereits ohne Ligand zu längeren Wellenlängen verschoben (Gersting *et al.* 2010). Die Variante R261Q zeigt einen Aminosäureaustausch in der katalytischen Domäne und nahm ohne Ligandenbindung eine *t-state* ähnliche Konformation mit einem geringeren hydrodynamischen Radius als der PAH-Wildtyp ein. Charakteristisch für die Variante Y417H aus der Oligomerisierungsdomäne war ein stark destabilisierter N-Terminus nach Anlegen von Hitzestress. Alle drei Varianten wiesen somit unterschiedliche strukturelle Veränderungen auf Proteinebene auf, die erneut belegten, dass es sich bei der PKU um eine Proteinfaltungserkrankung mit Funktionsverlust der betroffenen Proteine handelt. Zudem war die Enzymrestaktivität der Varianten gegenüber dem Wildtyp reduziert (Gersting *et al.* 2010, Staudigl *et al.* 2011) was dazu führte, dass die betroffenen Patienten im Neugeborenen-Screening auffielen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der PAH-Varianten im Komplex mit BH₄ und den BH₄-Derivaten zeigten, dass der durch Proteinfehlfaltung induzierte Phänotyp am eindrucksvollsten durch BH₄ korrigiert werden konnte, da die Bindung des natürlichen Kofaktors die Proteine stabilisierte. Gerade durch die Analyse der Varianten im Komplex mit 6-MPH₄ wurde deutlich, wie wichtig die Seitenkette an C6 für die Stabilisierung der PAH ist. Während die 6-MPH₄-Bindung im Fall des PAH-Wildtyps zu einer weiteren Abnahme des hydrodynamischen Radius führte, konnte dieser Effekt bei den Varianten nicht beobachtet werden. Die 6-MPH₄ Bindung führte sogar teilweise zur Destabilisierung der regulatorischen oder katalytischen Domänen während der thermischen Entfaltung der Varianten und bei

allen drei Varianten zum Anstieg der Hydrophobizität, induziert durch konformative Änderungen, die durch Bindung des Liganden ausgelöst werden. Wie bereits für den Wildtyp beschrieben, zeigte sich auch im Fall der Varianten, dass das Pyrimidopyrazin-Grundgerüst und die Seitenkette kumulative oder gegensätzliche Effekte auf die unterschiedlichen Regionen der PAH ausübten. Das Ausmaß der Effekte war dabei abhängig von der durch die Mutation hervorgerufene Schwere des Phänotyps.

Im Hinblick auf die angestrebte personalisierte Medizin auf dem Gebiet der Stoffwechselerkrankungen zeigten die Ergebnisse zu den PAH-Varianten, dass die zukünftig zur Therapie der PKU eingesetzten stabilisierenden, niedermolekularen Verbindungen je nach vorliegender Mutation, Modifikationen im Grundgerüst oder der Seitenkette enthalten sollten, die den gewünschten Effekt auf die Variante noch verstärken. Eine gezielte Stabilisierung der regulatorischen Domäne kann beispielsweise den molekularen Phänotyp verbessern, der durch Mutationen im entsprechenden Genabschnitt hervorgerufen wird. Im besten Fall wird sich die Stabilisierung nicht nur auf die regulatorische Domäne auswirken, sondern auch auf andere Regionen des Proteins, die durch Seitenketteninteraktionen mit der regulatorischen Domäne in Kontakt stehen.

Neue potentielle pharmakologische Chaperone

In den letzten Jahren wurden neue Substanzen publiziert (Pey *et al.* 2008, Santos-Sierra *et al.* 2012), die als potentielle pharmakologische Chaperone zur Behandlung der PKU gehandelt wurden. Ein im Rahmen der Dissertation durchgeführter Vergleich der vier vielversprechendsten Kandidaten mit BH₄ – bzw. der metabolische BH₄-Vorstufe Sepiapterin - *in vitro* und *in vivo* zeigte jedoch, dass alle vorgeschlagenen Kandidatensubstanzen schwächer wirksam als BH₄ waren und dass das Therapeutikum Sapropterindihydrochlorid daher nach wie vor der Standard zur pharmakologischen Therapie der Hyperphenylalaninämien bleibt.

Das im Rahmen der Dissertation vorgeschlagene 4,5-Diaminopyrimidin zeigte vielversprechende Effekte im Vergleich zu BH₄ und könnte als Ausgangsstruktur dienen, um anhand weiterer hypothesengesteuerter Modifikationen neue Leitsubstanzen zur Behandlung der PKU zu designen. Denn anhand der bereits diskutierten Einflüsse von Pyrimidopyrazin-Grundgerüst und Dihydroxypropylseitenkette könnte eine optimierte Leitsubstanz aus einem reduzierten Grundgerüst sowie an den beiden Kohlenstoffatomen der Seitenkette C1' und C2' modifizierten funktionellen Gruppen bestehen, die dazu dienen, die jeweils gewünschten Effekte weiter zu verstärken. Das tiefgreifende mechanistische Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehung von BH₄ als pharmakologisches Chaperon ist die Voraussetzung, um im Rahmen der personalisierten Ansätze bei der Behandlung der PKU eine verbesserte Wirkung von BH₄ oder weiterer, neuer Leitsubstanzen zu erzielen.

Nachdem es im ersten Teil der Dissertation darum ging, die Struktur-Funktionsbeziehung von BH₄ zu analysieren, widmete sich der zweite Teil der Arbeit der Suche und Validierung neuer Kandidatensubstanzen, die den molekularen Phänotyp der Proteinfehlfaltung gezielt

adressieren und korrigieren. Neben dem bereits zugelassenen Medikament Sapropterindihydrochlorid soll damit langfristig ein Präparat entwickelt werden, das über günstigere pharmakokinetische Eigenschaften verfügt um somit den Anteil an Patienten, die im NBS identifiziert werden weiter zu erhöhen, die mit einer pharmakologischen statt mit einer belastenden diätetischen Therapie behandelt werden können. Im Rahmen dieses großangelegten Screens, wurden der PAH-Wildtyp und zusätzliche Varianten des durch die Erkrankung betroffenen Proteins mit unterschiedlich schwerem molekularen und klinischen Phänotyp als individuelle Zielproteine ausgewählt. Durch die Auswahl der zu Grunde liegenden Mutationen konnte ein breites Spektrum des klinischen Phänotyps, von mild bis schwer, als auch ein breites Spektrum der molekularen und strukturellen Veränderungen, von leichter bis schwerer Destabilisierung bis hin zur Aggregation, abgedeckt werden. Auf diese Weise konnte die Wirksamkeit von Kandidatensubstanzen in Bezug auf die Wiederherstellung verschiedener molekularer Störungen gleichzeitig getestet werden. Zudem wurde so ermittelt, ob unterschiedliche molekulare Phänotypen durch die spezifischen Effekte unterschiedlicher Substanzen adressiert werden müssen. Ausgehend von einem virtuellen *Screen*, der basierend auf Molekül-Simulationen aus einer Datenbank von über 8,8 Millionen kommerziell erhältlicher Substanzen 234 Liganden identifizierte, die potenziell an das PAH-Protein binden können, konnten durch drei unabhängige Screening-Ansätze (DSF-, Zell- und MST-Screen) drei vielversprechende Kandidatensubstanzen identifiziert werden, die an das Zielprotein binden, einen positiven Effekt auf die Enzymfunktion haben und den Wirkmechanismus der bindingsinduzierten Stabilisierung zeigen. Diese gleichzeitige Analyse von Bindung und Wirkung eines pharmazeutischen Wirkstoffs war bisher einmalig und erhöht dadurch die Chancen, dass die drei finalen *hit compounds* tatsächlich auch ein therapeutisches Potential besitzen.

Ausblick

Neben den bereits bestehenden Therapieoptionen der Enzymsubstitution mit PEG-PAL (MacDonald and D'Cunha 2007, Sarkissian *et al.* 2008, Sarkissian *et al.* 2011), dem Einsatz von großen neutralen Aminosäuren (Pietz *et al.* 1999, Matalon *et al.* 2007, van Vliet *et al.* 2016) sowie gentherapeutischen Ansätzen (Ding *et al.* 2006, Thony 2010, Yagi *et al.* 2011), muss die Forschung auf diesem Gebiet weiter gehen, um auch für Patienten mit schweren, nicht BH₄-responsiven Erkrankungsformen alternative Therapiestrategien zu entwickeln. Richtungsweisend in diesem Zusammenhang war kürzlich die Entwicklung einer neuen biochemischen Methode, die es ermöglicht, DNA an spezifischen Stellen zu schneiden und zu verändern (Gasiunas *et al.* 2012, Jinek *et al.* 2012). Mit dem CRISPR/Cas9-System können u.a. einzelne Nukleotide innerhalb eines Gens gezielt verändert werden, was diese Methode besonders für den Einsatz zur Therapie monogenetischer Erkrankungen wie der PKU qualifiziert. Der Arbeitsgruppe um Nenad Blau ist es im vergangenen Jahr gelungen das CRISPR/Cas9-System auch im Bereich der PKU anzuwenden, indem sie die häufigste (Allelfrequenz 21,4 %), mit einem schweren Phänotyp assoziierte PAH-Mutation R408W

therapierte (Pan *et al.* 2016). Die in COS-7 Zellen durchgeführten Experimente belegten den Anstieg der Enzymrestaktivität für die unter normalen Bedingungen nur schwer zu exprimierende PAH-Variante R408W. Das Ergebnis ist für alle Arbeitsgruppen, die sich mit der PKU beschäftigen richtungsweisend, denn es eröffnet zum ersten Mal die Möglichkeit auch Patienten mit schweren, nicht BH₄-responsiven Erkrankungsformen zu therapieren und ihnen langfristig ein Leben ohne belastende Diät zu ermöglichen. Generell ist der Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems ein weiterer großer Schritt in Richtung personalisierter Medizin und wird hoffentlich in Zukunft auf dem Gebiet der angeborenen Stoffwechselstörungen mit Erfolg für den Patienten zum Einsatz kommen.

6 Zusammenfassung

Sapropterindihydrochlorid, die synthetische Form des natürlichen Kofaktors der PAH, wird seit 2007 als Wirkstoff zur Behandlung bei BH₄-responsiven Patienten mit milderer Formen der Phenylketonurie durch PAH-Defizienz eingesetzt und wirkt stabilisierend auf das fehlgefaltete Enzym. Das Medikament entfaltet seine Wirkung durch pharmakologische Korrektur des auf Proteinfehlfaltung basierenden *loss of function* Phänotyps und führt zur Verbesserung der Enzymfunktion. Mittlerweile profitiert ein signifikanter Anteil an Patienten von der Therapie mit dem ersten pharmakologischen Chaperon. Da Patienten mit schwerem Phänotyp nicht auf die BH₄-Therapie ansprechen und Sapropterindihydrochlorid zudem über unvorteilhafte pharmakokinetische Eigenschaften verfügt, ist die Entwicklung alternativer pharmazeutischer Produkte auch weiterhin erforderlich. Die gezielte medizinisch-chemische Entwicklung neuer Wirkstoffe für PKU-Patienten ist aber erst dann möglich, wenn die Wirkung von BH₄ auf struktureller Ebene im Detail verstanden ist.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit ging es daher zunächst um die Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung von BH₄, um zu analysieren, welche der beiden strukturellen Elemente des BH₄-Moleküls – das kondensierte Pyrimidopyrazingrundgerüst oder die 1,2-Dihydroxypropylseitenkette – für die spezifischen Aspekte des Chaperon-Effektes verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden die strukturellen Einflüsse von BH₄ und den sich spezifisch von BH₄ unterscheidenden Derivaten BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ auf den PAH-Wildtyp und die drei BH₄-responsive PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H analysiert. Die Aminosäuresubstitutionen der PAH-Varianten sind in den drei unterschiedlichen Domänen des Enzyms lokalisiert und liegen jeweils im Interface zwischen je zwei angrenzenden Untereinheiten des Tetramers, wodurch sie in ein Netzwerk aus Seitenketteninteraktionen eingebettet sind, die konformative Änderungen nach Bindung von Substrat und oder Kofaktor über das gesamte Protein hinweg kommunizieren. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Bindung der untersuchten Substanzen im aktiven Zentrum der PAH zwei unterschiedliche molekulare Bewegungen im Protein induzieren, wobei das Pyrimidopyrazingrundgerüst die Induktion einer kompakten, dem MWG-Model (Monod *et al.* 1965) folgenden, *t-state* ähnlichen Konformation vermittelt, während die Seitenkette die Lösemittelzugänglichkeit hydrophober Gruppen reduziert. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß dieser molekularen Bewegungen vom Redoxzustand des Grundgerüsts und der Seitenkette abhängig ist. Die Analyse der PAH-Varianten ergab, dass die native Konformation der jeweiligen Apoenzyme im Vergleich zum Wildtyp aufgrund der Mutationen im *PAH*-Gen bereits verändert war und sich in den varianten Enzymen durch gezielte medizinisch-chemische Verstärkung der Einflüsse von Kofaktorgrundgerüst sowie -seitenkette unterschiedliche therapeutische Effekte auslösen lassen. Zusammenfassend konnte innerhalb des ersten Teilprojekts der Promotionsarbeit gezeigt werden, dass einzelne strukturelle Teilbereiche des BH₄-Moleküls für spezifische Aspekte des Chaperon-Effektes verantwortlich sind und diese genotypspezifisch entfalten. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die beiden strukturell unterschiedlichen Elemente des Kofaktors für das zukünftige Wirkstoffdesign auf dem Gebiet der PKU eine wichtige Rolle spielen werden und die aus der

Analyse der Struktur-Funktionsbeziehung von BH₄ gewonnenen Erkenntnisse in Zukunft dazu dienen könnten, in einem medizinisch-chemischen Ansatz die gezielte Entwicklung neuer, pharmakologischer Wirkstoffe für unterschiedliche Patientengruppen der Phenylketonurie zu forcieren. Die Aufklärung des Struktur-Funktionsmechanismus von BH₄ am Beispiel der PAH ließe sich in Zukunft möglicherweise auch für andere BH₄-abhängige Enzyme nutzen, um die damit einhergehenden Erkrankungen besser zu verstehen und zu therapieren. Unabhängig davon sollten sich die am Beispiel der Phenylketonurie gewonnenen Erkenntnisse auch auf weitere angeborene Stoffwechselerkrankungen ausweiten lassen, denen ein Funktionsverlust der betroffenen, krankheitsverursachenden Enzyme zu Grunde liegt.

Neben der Untersuchung des Chaperon-Effekts von BH₄ wurde der Effekt von vier neuen, in der Literatur als potentielle pharmakologische Chaperon-Alternativen zu BH₄ gehandelten Substanzen sowie dem im Rahmen der Promotionsarbeit neu vorgeschlagenen 4,5-Diaminopyrimidin mit der Wirkung von BH₄ auf den PAH-Wildtyp verglichen. Es wurde deutlich, dass keine der fünf Substanzen *in vitro* und *in vivo* die stabilisierende Wirkung von BH₄ erreicht und der natürliche Kofaktor der PAH somit vorerst das einzige pharmakologische Chaperon zur Therapie der BH₄-responsiven Form der PKU bleibt. Daher ging es im zweiten großen Teilprojekt der Promotionsarbeit darum, im eigenen Labor neue stabilisierende Leitsubstanzen für die PAH zu identifizieren und zu validieren, die langfristig als alternative pharmakologische Chaperone neben BH₄ als Therapeutikum eingesetzt werden können. Zunächst wurde durch externe Partner eine Datenbank von über 8,8 Millionen kommerziell erhältlicher Substanzen durch ein virtuelles *Screening* analysiert, indem die Substanzen auf Grundlage der 3D-Struktur des PAH-Wildtyps in die Bindestellen für Substrat und Kofaktor gefittet wurden. Hierdurch konnten 234 vielversprechende Liganden identifiziert werden, deren Einfluss auf den PAH-Wildtyp und ausgewählte PAH-Varianten *in vitro* und *in vivo* durch drei unabhängige *Screening*-Ansätze in unserem Labor untersucht wurde. Final konnten wir drei der 234 Substanzen als zukünftige erfolgversprechende Leitsubstanzen identifizieren, die nun in einen pharmakologischen Entwicklungsprozess in Kooperation mit externen Partnern überführt werden.

Zusammenfassend hat die hier vorliegende Promotionsarbeit entscheidend dazu beigetragen, den Struktur-Funktionsmechanismus von BH₄ aufzuklären und weitere pharmakologische Chaperone für die Therapie von Patienten mit Phenylketonurie – Kinder und Erwachsene – zu identifizieren.

7 Abkürzungen

6-MPH ₄	6-Methyltetrahydropterin
A_{280}	Absorption bei 280 nm
ANS	8-anilinonaphthalin-1-sulfonsäure
BH ₂	7,8-dihydro-L-biopterin
BH ₄	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Da	Dalton
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSF	Differential Scanning Fluorimetry
DTT	1,4-Dithiothreitol
D_T	Translatationaler Diffusionskoeffizient
E_A	Aktivierungsenergie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
ΔG	Änderung der Gibbs-Energie
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Plancksches Wirkungsquantum
ΔH	Änderung der Reaktionsenthalpie
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

HRP	Horseradish (Meerrettich) Peroxidase
IARS	intrinsische autoregulatorische Sequenz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
J	Joule
k	Geschwindigkeitskonstante
K	Kelvin
k _B	Boltzmann-Konstante
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitorische Konstante
λ	Wellenlänge
LB	Luria-Broth
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MBP	Maltose-Bindeprotein
MCAD	Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
MCADM	Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase-Mangel
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
6-MPH ₄	6-Methyltetrahydropterin
MST	MicroScale Thermophorese
M _w	Molekulargewicht
MWC	Monod-Wyman-Changeux
NBS	Neugeborenen-Screening
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAH	Phenylalaninhydroxylase
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
L-Phe	L-Phenylalanin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Universelle Gaskonstante
R _H	Hydrodynamischer Radius
ΔS	Änderung der Reaktionsentropie
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMW	small molecular weight
SP	Sepiapterin
T	absolute Temperatur in Kelvin
TBS	Tris-buffered saline
TEV	Tobacco Etch Virus
TH	Tyrosinhydroxylase
TPH	Tryptophanhydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
L-Tyr	L-Tyrosin
UpM	Umdrehungen pro Minute

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Das Phenylalaninhydroxylase System	2
Abbildung 2. Struktur des PAH Monomers und des funktionellen Tetramers	3
Abbildung 3. Schema eines Phenylalaninhydroxylase-Monomers	4
Abbildung 4. Schematische Darstellung des 2-His-1-carboxyl <i>facial triad</i> Motivs	5
Abbildung 5. BH ₄ -abhängige Aminosäurehydroxylasen	7
Abbildung 6. Schema für die durch die PAH katalysierte Reaktion	8
Abbildung 7. Energiediagramm für Proteinfaltung und Fehlfaltung	15
Abbildung 8. Schematische Darstellung der Gateway®-Klonierung.....	29
Abbildung 9. Oligomerisierungsprofile des PAH-Wildtyps und SDS-PAGE	60
Abbildung 10. <i>Activity landscape</i> des PAH-Wildtyps mit BH ₄ und L-Phe.....	61
Abbildung 11. UV-CD-Spektrum des PAH-Wildtyps	62
Abbildung 12. Thermische Denaturierung des PAH-Wildtyps	63
Abbildung 13. Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung des PAH-Wildtyps	64
Abbildung 14. Intrinsisches Tryptophanfluoreszenzemissionsspektrum des PAH-Wildtyps ..	65
Abbildung 15. Entfaltungskinetiken des PAH-Wildtyps und Arrhenius-Plot	66
Abbildung 16. Strukturformel von 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin	67
Abbildung 17. Strukturformeln von BH ₄ und BH ₄ -Derivaten	67
Abbildung 18. Bindungsnetzwerk von BH ₄ im aktiven Zentrum des PAH-Wildtyps	69
Abbildung 19. Bindungsnetzwerk von Sepiapterin und 6-MPH ₄	70
Abbildung 20. MST-Messungen des Wildtyps im Komplex mit BH ₄ und BH ₄ -Derivaten	71
Abbildung 21. <i>Activity landscape</i> des PAH-Wildtyps mit 6-MPH ₄ und L-Phe.....	73
Abbildung 22. Inhibierung des PAH-Wildtyps durch BH ₂ und Sepiapterin (SP)	74
Abbildung 23. Umschlagspunkte und Hydrophobizität des PAH-Wildtyps.....	75
Abbildung 24. DLS Ergebnisse des PAH-Wildtyps	76
Abbildung 25. Intrinsische Tryptophanfluoreszenzemissionsspektren des PAH-Wildtyps	77
Abbildung 26. Entfaltungskinetiken des PAH-Wildtyps	78
Abbildung 27. Arrhenius-Plot und Aktivierungsenergien des PAH-Wildtyps.....	79
Abbildung 28. Aminosäureinteraktionen im PAH-Wildtyp.....	81
Abbildung 29. Oligomerisierungsprofile der Enzyme ohne und mit Fusionspartner.....	82
Abbildung 30. SDS-Gel zur Dokumentation einzelner Reinigungsschritte.....	83
Abbildung 31. Thermische Denaturierung von PAH-Wildtyp und Varianten	84
Abbildung 32. Hydrodynamischer Radius von PAH-Wildtyp und Varianten	85
Abbildung 33. Intrinsische Tryptophanfluoreszenzemissionsspektren der Enzyme.....	86
Abbildung 34. Entfaltungskinetiken, Arrhenius-Plot und Aktivierungsenergien.....	87

Abbildung 35. Hydrophobizität von PAH-Wildtyp und Varianten	90
Abbildung 36. Hydrodynamische Radien von PAH-Wildtyp und Varianten	91
Abbildung 37. Intrinsische Tryptophanfluoreszenzemissionsspektren der Enzyme.....	93
Abbildung 38. Arrhenius-Plots von PAH-Wildtyp und Varianten.....	94
Abbildung 39. Aktivierungsenergien von PAH-Wildtyp und Varianten.....	95
Abbildung 40. Strukturformeln von neuen pharmakologischen Chaperonen für die PAH.....	97
Abbildung 41. Interaktionsstudien von Substanz 1	98
Abbildung 42. Interaktionsstudien der Substanzen 3 und 4	99
Abbildung 43. MST-Daten des PAH Wildtyps im Komplex mit Substanzen 1-4	101
Abbildung 44. Inhibierung der Enzymaktivität des Wildtyps durch Substanzen 1, 3 und 4 ..	102
Abbildung 45. DSF-Assay des PAH-Wildtyps im Komplex mit den Liganden 1-4.....	103
Abbildung 46. Biophysikalische Charakterisierung des Wildtyps mit Liganden 1-4	105
Abbildung 47. Interaktionsstudien von 4,5-Diaminopyrimidin	106
Abbildung 48. MST-Daten und Inhibierungsassay des Wildtyps mit 4,5-Diaminopyrimidin .	107
Abbildung 49. Biophysikalische Charakterisierung des Wildtyps mit 4,5-Diaminopyrimidin.	108
Abbildung 50. Analyse der Restproteinmenge nach Expression in COS-7 Zellen.....	110
Abbildung 51. Analyse der PAH-Enzymrestaktivität nach Expression in COS-7 Zellen.....	111
Abbildung 52. Oligomerisierungsprofile der Enzyme mit und ohne MBP-Fusionspartner....	114
Abbildung 53. Beispielbelegung einer 96-well Platte im DSF-Screen	115
Abbildung 54. DSF-Assay mit SYPRO® Orange	116
Abbildung 55. Ergebnisse des DSF-Screens.....	118
Abbildung 56. Bioinformatische Auswertung des DSF-Screens.....	119
Abbildung 57. Ergebnis des DSF-Screens.....	120
Abbildung 58. Ergebnisse aus DSF-, Zell- und MST-Screen	122
Abbildung 59. Ergebnis der drei unabhängigen Screens	123

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Chemikalien	21
Tabelle 2. Verwendete <i>E. coli</i> Bakterienstämme	21
Tabelle 3. Verwendete Vektoren	22
Tabelle 4. Verwendete Enzyme	22
Tabelle 5. Verwendete Zellkulturmaterialien	22
Tabelle 6. Verwendete Kits und Größenstandards	23
Tabelle 7. Verwendete Antikörper	23
Tabelle 8. Eingesetzte Antibiotika	24
Tabelle 9. Verwendete Materialien	26
Tabelle 10. Verwendete Geräte	27
Tabelle 11. Verwendete Software	28
Tabelle 12. Oligonucleotide zur Erzeugung eines <i>attB-Gateway</i> -PCR-Produkts	29
Tabelle 13. PCR-Pipettierschema zur Erzeugung einer <i>attB-Site</i> flankierten cDNA	30
Tabelle 14. Thermocycler-Protokoll zur Generierung des <i>attB</i> -PCR-Produkts	30
Tabelle 15. Pipettierschema für die BP-Rekombinationsreaktion	31
Tabelle 16. Pipettierschema für die LR-Rekombinationsreaktion	32
Tabelle 17. Pipettierschema für die SDM zur Erzeugung varianter <i>PAH Entry Clones</i>	32
Tabelle 18. Thermocycler-Protokoll zur Durchführung der ortsspezifischen Mutagenese	33
Tabelle 19. Oligonukleotide für die ortsspezifische Mutagenese	33
Tabelle 20. Pipettierschema für einen Restriktionsansatz	34
Tabelle 21. Ablauf der Immundetektion	42
Tabelle 22. Klonierte Konstrukte während der Promotionsarbeit	58
Tabelle 23. Kinetische und thermodynamische Parameter für die Entfaltung des Wildtyps	66
Tabelle 24. Berechnete Geschwindigkeitskonstanten und thermodynamische Parameter	80
Tabelle 25. Berechnete Umschlagpunkte nach thermischer Denaturierung der Varianten	89
Tabelle 26. Berechnete Geschwindigkeitskonstanten und thermodynamische Parameter	96
Tabelle 27. Berechnete Umschlagpunkte des Wildtyps im Komplex mit den Liganden 1-4	103
Tabelle 28. Mit MST gemessene Bindungskonstanten K_D	121

10 Literaturverzeichnis

1. Almas B, Toska K, Teigen K, et al. A kinetic and conformational study on the interaction of tetrahydropteridines with tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* 2000;39:13676-86.
2. Andersen OA, Flatmark T, Hough E. High resolution crystal structures of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase in its catalytically active Fe(II) form and binary complex with tetrahydrobiopterin. *J Mol Biol* 2001;314:279-91.
3. Andersen OA, Flatmark T, Hough E. Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J Mol Biol* 2002;320:1095-108.
4. Andersen OA, Stokka AJ, Flatmark T, Hough E. 2.0Å resolution crystal structures of the ternary complexes of human phenylalanine hydroxylase catalytic domain with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine or L-norleucine: substrate specificity and molecular motions related to substrate binding. *J Mol Biol* 2003;333:747-57.
5. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 1973;181:223-30.
6. Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, et al. Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. *Am J Hum Genet* 2017;100:257-266.
7. Arturo EC, Gupta K, Heroux A, et al. First structure of full-length mammalian phenylalanine hydroxylase reveals the architecture of an autoinhibited tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:2394-9.
8. Ayling JE, Helfand GD, Pirson WD. Phenylalanine hydroxylase from human kidney. *Enzyme* 1975;20:6-19.
9. Baaske P, Wienken CJ, Reineck P, Duhr S, Braun D. Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010;49:2238-41.
10. Bailey SW, Ayling JE. Pyrimidines as cofactors for phenylalanine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;85:1614-21.
11. Bailey SW, Dillard SB, Ayling JE. Role of C6 chirality of tetrahydropterin cofactor in catalysis and regulation of tyrosine and phenylalanine hydroxylases. *Biochemistry* 1991;30:10226-35.
12. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008;319:916-9.
13. Bassan A, Blomberg MR, Siegbahn PE. Mechanism of aromatic hydroxylation by an activated FeIV=O core in tetrahydrobiopterin-dependent hydroxylases. *Chemistry* 2003;9:4055-67.
14. Bernier V, Lagace M, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2004;15:222-8.
15. Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 1953;265:812-3.
16. Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenyl-ketonuric child. *Acta Paediatr* 1954;43:64-77.
17. Bigham EC, Smith GK, Reinhard JF, Jr., Mallory WR, Nichol CA, Morrison RW, Jr. Synthetic analogues of tetrahydrobiopterin with cofactor activity for aromatic amino acid hydroxylases. *J Med Chem* 1987;30:40-5.
18. Bjorgo E, Knappskog PM, Martinez A, Stevens RC, Flatmark T. Partial characterization and three-dimensional-structural localization of eight mutations in exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene associated with phenylketonuria. *Eur J Biochem* 1998;257:1-10.
19. Blau N. Differenzialdiagnose der Hyperphenylalaninämien – Screening auf angeborene Stoffwechselkrankheiten. In: Zeitschrift Kinder- und Jugendmedizin Schattauer GmbH, 2006:225 – 232.
20. Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2004;82:101-11.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
22. Buchner J. Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2002;59:1587-8.
23. Cantor CR, Schimmel PR. *Biophysical Chemistry Vol II.*, San Francisco, 1980b.
24. Chehin R, Thorolfsson M, Knappskog PM, et al. Domain structure and stability of human phenylalanine hydroxylase inferred from infrared spectroscopy. *FEBS Lett* 1998;422:225-30.

25. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology* 1973;22:3099-108.
26. Costas M, Mehn MP, Jensen MP, Que L, Jr. Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. *Chem Rev* 2004;104:939-86.
27. Danecka MK, Woidy M, Zschocke J, Feillet F, Muntau AC, Gersting SW. Mapping the functional landscape of frequent phenylalanine hydroxylase (PAH) genotypes promotes personalised medicine in phenylketonuria. *J Med Genet* 2015;52:175-85.
28. Daubner SC, Moran GR, Fitzpatrick PF. Role of tryptophan hydroxylase phe313 in determining substrate specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:639-41.
29. Davis MD, Parniak MA, Kaufman S, Kempner E. The role of phenylalanine in structure-function relationships of phenylalanine hydroxylase revealed by radiation target analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:491-5.
30. DePristo MA, Weinreich DM, Hartl DL. Missense meanderings in sequence space: a biophysical view of protein evolution. *Nat Rev Genet* 2005;6:678-87.
31. Dickson PW, Jennings IG, Cotton RG. Delineation of the catalytic core of phenylalanine hydroxylase and identification of glutamate 286 as a critical residue for pterin function. *J Biol Chem* 1994;269:20369-75.
32. Ding Z, Georgiev P, Thony B. Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2006;13:587-93.
33. Dobrowolski SF, Heintz C, Miller T, et al. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population. *Mol Genet Metab* 2011;102:116-21.
34. Dobrowolski SF, Pey AL, Koch R, et al. Biochemical characterization of mutant phenylalanine hydroxylase enzymes and correlation with clinical presentation in hyperphenylalaninaemic patients. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:10-21.
35. Doskeland AP, Flatmark T. Recombinant human phenylalanine hydroxylase is a substrate for the ubiquitin-conjugating enzyme system. *Biochem J* 1996;319 (Pt 3):941-5.
36. Doskeland AP, Martinez A, Knappskog PM, Flatmark T. Phosphorylation of recombinant human phenylalanine hydroxylase: effect on catalytic activity, substrate activation and protection against non-specific cleavage of the fusion protein by restriction protease. *Biochem J* 1996;313 (Pt 2):409-14.
37. Doskeland AP, Vintermyr OK, Flatmark T, Cotton RG, Doskeland SO. Phenylalanine positively modulates the cAMP-dependent phosphorylation and negatively modulates the vasopressin-induced and okadaic-acid-induced phosphorylation of phenylalanine 4-monooxygenase in intact rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1992;206:161-70.
38. Duhr S, Braun D. Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19678-82.
39. Eiken HG, Knappskog PM, Apold J, Flatmark T. PKU mutation G46S is associated with increased aggregation and degradation of the phenylalanine hydroxylase enzyme. *Hum Mutat* 1996;7:228-38.
40. Enns GM, Koch R, Brumm V, Blakely E, Suter R, Jurecki E. Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: revisiting the evidence. *Mol Genet Metab* 2010;101:99-109.
41. Erlandsen H. Molecular mechanism of tetrahydrobiopterin-responsiveness. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, 2006.
42. Erlandsen H, Bjorgo E, Flatmark T, Stevens RC. Crystal structure and site-specific mutagenesis of pterin-bound human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 2000;39:2208-17.
43. Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC, Hough E. Crystallographic analysis of the human phenylalanine hydroxylase catalytic domain with bound catechol inhibitors at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 1998;37:15638-46.
44. Erlandsen H, Fusetti F, Martinez A, Hough E, Flatmark T, Stevens RC. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat Struct Biol* 1997;4:995-1000.
45. Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999;68:103-25.
46. Fan JQ. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:355-60.
47. Fan JQ. A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biol Chem* 2008;389:1-11.

48. Fan JQ, Ishii S. Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. Yin and Yang of enzyme inhibitors. *FEBS J* 2007;274:4962-71.
49. Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nature medicine* 1999;5:112-5.
50. Fitzpatrick PF. The aromatic amino acid hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 2000;74:235-94.
51. Fitzpatrick PF. Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry* 2003;42:14083-91.
52. Flatmark T, Stevens RC. Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms. *Chem Rev* 1999;99:2137-2160.
53. Folling A. Ueber Ausscheidung von Phenylbrenztraubensaure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitaet. In: *Ztschr Physiol Chem*. 1934:169–176.
54. Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem* 1998;273:16962-7.
55. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E2579-86.
56. Germain DP, Hughes DA, Nicholls K, et al. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *The New England journal of medicine* 2016;375:545-55.
57. Gersting SW, Kemter KF, Staudigl M, et al. Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *Am J Hum Genet* 2008;83:5-17.
58. Gersting SW, Staudigl M, Truger MS, et al. Activation of phenylalanine hydroxylase induces positive cooperativity toward the natural cofactor. *J Biol Chem* 2010;285:30686-97.
59. Gibbs BS, Wojchowski D, Benkovic SJ. Expression of rat liver phenylalanine hydroxylase in insect cells and site-directed mutagenesis of putative non-heme iron-binding sites. *J Biol Chem* 1993;268:8046-52.
60. Gjetting T, Petersen M, Guldberg P, Guttler F. Missense mutations in the N-terminal domain of human phenylalanine hydroxylase interfere with binding of regulatory phenylalanine. *Am J Hum Genet* 2001;68:1353-60.
61. Gregersen N. Protein misfolding disorders: pathogenesis and intervention. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:456-70.
62. Guerin T, Walsh GA, Donlon J, Kaufman S. Correlation of rat hepatic phenylalanine hydroxylase, with tetrahydrobiopterin and GTP concentrations. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1047-54.
63. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet* 1998;63:71-9.
64. Guthrie R, Susi A. A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics* 1963;32:338-43.
65. Hegg EL, Que L, Jr. The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur J Biochem* 1997;250:625-9.
66. Iwaki M, Phillips RS, Kaufman S. Proteolytic modification of the amino-terminal and carboxyl-terminal regions of rat hepatic phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 1986;261:2051-6.
67. Jennings IG, Cotton RG, Kobe B. Functional analysis, using in vitro mutagenesis, of amino acids located in the phenylalanine hydroxylase active site. *Arch Biochem Biophys* 2000;384:238-44.
68. Jervis GA. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;82:514-5.
69. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337:816-21.
70. Jones G, Willett P. Docking small-molecule ligands into active sites. *Current opinion in biotechnology* 1995;6:652-6.
71. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 1997;267:727-48.
72. Kappock TJ, Caradonna JP. Pterin-Dependent Amino Acid Hydroxylases. *Chem Rev* 1996;96:2659-2756.
73. Kappock TJ, Harkins PC, Friedenber S, Caradonna JP. Spectroscopic and kinetic properties of unphosphorylated rat hepatic phenylalanine hydroxylase expressed in Escherichia coli. Comparison of resting and activated states. *J Biol Chem* 1995;270:30532-44.
74. Kaufman S. The phenylalanine hydroxylating system. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1993;67:77-264.

75. Kaufman S, Mason K. Specificity of amino acids as activators and substrates for phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 1982;257:14667-78.
76. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 1997;61:1309-17.
77. Kemsley JN, Mitic N, Zaleski K.L., Caradonna J.P., Solomon E.I. Circular Dichroism and Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy of the Catalytically Competent Ferrous Active Site of Phenylalanine Hydroxylase and Its Interaction with Pterin Cofactor. *J Am Chem Soc* 1999;121(7):1528–1536.
78. Kemsley JN, Wasinger EC, Datta S, et al. Spectroscopic and kinetic studies of PKU-inducing mutants of phenylalanine hydroxylase: Arg158Gln and Glu280Lys. *J Am Chem Soc* 2003;125:5677-86.
79. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry* 2013;82:323-55.
80. Kleppe R, Uhlemann K, Knappskog PM, Haavik J. Urea-induced denaturation of human phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 1999;274:33251-8.
81. Knappskog PM, Flatmark T, Aarden JM, Haavik J, Martinez A. Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase. Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. *Eur J Biochem* 1996;242:813-21.
82. Knappskog PM, Haavik J. Tryptophan fluorescence of human phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1995;34:11790-9.
83. Kobe B, Jennings IG, House CM, et al. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol* 1999;6:442-8.
84. Koshland DE, Jr., Nemethy G, Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 1966;5:365-85.
85. Kure S, Hou DC, Ohura T, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999;135:375-8.
86. Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual review of biochemistry* 1989;58:913-49.
87. Leandro P, Gomes CM. Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2008;8:901-11.
88. Lee P, Treacy EP, Crombez E, et al. Safety and efficacy of 22 weeks of treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2851-9.
89. Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2007;370:504-10.
90. Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab* 1999;67:308-16.
91. Lo MC, Aulabaugh A, Jin G, et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal Biochem* 2004;332:153-9.
92. Longo N, Harding CO, Burton BK, et al. Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2014;384:37-44.
93. Lottspeich F, Zorbas H. Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, 1998.
94. MacDonald MJ, D'Cunha GB. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem Cell Biol* 2007;85:273-82.
95. Malnasi-Csizmadia A, Hegyi G, Tolgyesi F, Szent-Gyorgyi AG, Nyitrai L. Fluorescence measurements detect changes in scallop myosin regulatory domain. *Eur J Biochem* 1999;261:452-8.
96. Martinez A, Knappskog PM, Olafsdottir S, et al. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem J* 1995;306 (Pt 2):589-97.
97. Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, et al. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine. *J Inher Metab Dis* 2007;30:153-8.
98. McKinney J, Teigen K, Froystein NA, et al. Conformation of the substrate and pterin cofactor bound to human tryptophan hydroxylase. Important role of Phe313 in substrate specificity. *Biochemistry* 2001;40:15591-601.
99. Miranda FF, Teigen K, Thorolfsson M, et al. Phosphorylation and mutations of Ser(16) in human phenylalanine hydroxylase. Kinetic and structural effects. *J Biol Chem* 2002;277:40937-43.

100. Miranda FF, Thorolfsson M, Teigen K, Sanchez-Ruiz JM, Martinez A. Structural and stability effects of phosphorylation: Localized structural changes in phenylalanine hydroxylase. *Protein Sci* 2004;13:1219-26.
101. Mitnaul LJ, Shiman R. Coordinate regulation of tetrahydrobiopterin turnover and phenylalanine hydroxylase activity in rat liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:885-9.
102. Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 1965;12:88-118.
103. Mu TW, Ong DS, Wang YJ, et al. Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases. *Cell* 2008;134:769-81.
104. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 1987;155:335-50.
105. Muntau AC, Beblo, S., Koletzko, B. Phenylketonurie und Hyperphenylalaninämie. In: Monatsschrift Kinderheilkunde. Springer-Verlag 2000, 2000:179-193.
106. Muntau AC, Gersting SW. Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:649-58.
107. Muntau AC, Leandro J, Staudigl M, Mayer F, Gersting SW. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *J Inherit Metab Dis* 2014;37:505-23.
108. Muntau AC, Roschinger W, Habich M, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *The New England journal of medicine* 2002;347:2122-32.
109. Nennstiel-Ratzel U, Holscher G, Ehrensperger-Reeh P, von Kries R, Wildner M. Prevention of Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) in Bavaria - evaluation of a prevention campaign. *Klin Padiatr* 2010;222:45-50.
110. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols* 2007;2:2212-21.
111. Pan Y, Shen N, Jung-Klawitter S, et al. CRISPR RNA-guided FokI nucleases repair a PAH variant in a phenylketonuria model. *Scientific reports* 2016;6:35794.
112. Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of biomolecular screening* 2001;6:429-40.
113. Parenti G, Pignata C, Vajro P, Salerno M. New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (review). *International journal of molecular medicine* 2013;31:11-20.
114. Patel D, Kopec J, Fitzpatrick F, McCorvie TJ, Yue WW. Structural basis for ligand-dependent dimerization of phenylalanine hydroxylase regulatory domain. *Scientific reports* 2016;6:23748.
115. Pey AL, Desviat LR, Gamez A, Ugarte M, Perez B. Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat* 2003;21:370-8.
116. Pey AL, Martinez A. The activity of wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase and its regulation by phenylalanine and tetrahydrobiopterin at physiological and pathological concentrations: an isothermal titration calorimetry study. *Mol Genet Metab* 2005;86 Suppl 1:S43-53.
117. Pey AL, Perez B, Desviat LR, et al. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* 2004a;24:388-99.
118. Pey AL, Thorolfsson M, Teigen K, Ugarte M, Martinez A. Thermodynamic characterization of the binding of tetrahydropterins to phenylalanine hydroxylase. *J Am Chem Soc* 2004b;126:13670-8.
119. Pey AL, Ying M, Cremades N, et al. Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J Clin Invest* 2008;118:2858-67.
120. Pey ALaM, A. The Phenylalanine Hydroxylase System. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft 2006.
121. Pietz J, Kreis R, Rupp A, et al. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest* 1999;103:1169-78.
122. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual review of biochemistry* 2009;78:959-91.
123. Rajan RS, Tsumoto K, Tokunaga M, Tokunaga H, Kita Y, Arakawa T. Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases. *Current medicinal chemistry* 2011;18:1-15.
124. Ramus SJ, Forrest SM, Pitt DB, Saleeba JA, Cotton RG. Comparison of genotype and intellectual phenotype in untreated PKU patients. *J Med Genet* 1993;30:401-5.

125. Rooney EK, Lee AG. Fitting fluorescence emission spectra of probes bound to biological membranes. *J Biochem Biophys Methods* 1986;12:175-89.
126. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.
127. Santos-Sierra S, Kirchmair J, Perna AM, et al. Novel pharmacological chaperones that correct phenylketonuria in mice. *Hum Mol Genet* 2012.
128. Sarkissian CN, Gamez A, Wang L, et al. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20894-9.
129. Sarkissian CN, Kang TS, Gamez A, Scriver CR, Stevens RC. Evaluation of orally administered PEGylated phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of Phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2011;104:249-54.
130. Sawabe K, Wakasugi KO, Hasegawa H. Tetrahydrobiopterin uptake in supplemental administration: elevation of tissue tetrahydrobiopterin in mice following uptake of the exogenously oxidized product 7,8-dihydrobiopterin and subsequent reduction by an anti-folate-sensitive process. *Journal of pharmacological sciences* 2004;96:124-33.
131. Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, et al. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 1994;263:1444-6.
132. Scholtz JM, Qian H, York EJ, Stewart JM, Baldwin RL. Parameters of helix-coil transition theory for alanine-based peptides of varying chain lengths in water. *Biopolymers* 1991;31:1463-70.
133. Scriver CR, Hurtubise M, Konecki D, et al. PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do. *Hum Mutat* 2003;21:333-44.
134. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999;15:267-72.
135. Scriver CRK, S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency in the Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill, 2001.
136. Seidel SA, Wienken CJ, Geissler S, et al. Label-free microscale thermophoresis discriminates sites and affinity of protein-ligand binding. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012;51:10656-9.
137. Shanmuganathan M, Britz-McKibbin P. Inhibitor screening of pharmacological chaperones for lysosomal beta-glucocerebrosidase by capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem* 2011;399:2843-53.
138. Shiman R. Relationship between the substrate activation site and catalytic site of phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 1980;255:10029-32.
139. Shiman R. Phenylalanine hydroxylase and dihydropterin reductase. New York: Wiley and Sons, 1985.
140. Smith I, Knowles J. Behaviour in early treated phenylketonuria: a systematic review. *Eur J Pediatr* 2000;159 Suppl 2:S89-93.
141. Solomon EI, Decker A, Lehnert N. Non-heme iron enzymes: contrasts to heme catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3589-94.
142. Spaapen LJ, Rubio-Gozalbo ME. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Mol Genet Metab* 2003;78:93-9.
143. Staudigl M, Gersting SW, Danecka MK, et al. The interplay between genotype, metabolic state and cofactor treatment governs phenylalanine hydroxylase function and drug response. *Hum Mol Genet* 2011;20:2628-41.
144. Stokka AJ, Carvalho RN, Barroso JF, Flatmark T. Probing the role of crystallographically defined/predicted hinge-bending regions in the substrate-induced global conformational transition and catalytic activation of human phenylalanine hydroxylase by single-site mutagenesis. *J Biol Chem* 2004;279:26571-80.
145. Stokka AJ, Flatmark T. Substrate-induced conformational transition in human phenylalanine hydroxylase as studied by surface plasmon resonance analyses: the effect of terminal deletions, substrate analogues and phosphorylation. *Biochem J* 2003;369:509-18.
146. Teigen K, Dao KK, McKinney JA, et al. Tetrahydrobiopterin binding to aromatic amino acid hydroxylases. Ligand recognition and specificity. *J Med Chem* 2004;47:5962-71.
147. Teigen K, Froystein NA, Martinez A. The structural basis of the recognition of phenylalanine and pterin cofactors by phenylalanine hydroxylase: implications for the catalytic mechanism. *J Mol Biol* 1999;294:807-23.
148. Teigen K, Martinez A. Probing cofactor specificity in phenylalanine hydroxylase by molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn* 2003;20:733-40.

149. Thony B. Long-term correction of murine phenylketonuria by viral gene transfer: liver versus muscle. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:677-80.
150. Thony B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 2000;347 Pt 1:1-16.
151. Thorolfsson M, Fojan P, Petersen S.B. and Martinez, A. The effect of tetrahydrobiopterin on the thermostability of human phenylalanine hydroxylase as studied by circular dichroism spectroscopy. *Pteridines* 2000;11:29-31.
152. Thorolfsson M, Ibarra-Molero B, Fojan P, Petersen SB, Sanchez-Ruiz JM, Martinez A. L-phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry* 2002;41:7573-85.
153. Thorolfsson M, Teigen K, Martinez A. Activation of phenylalanine hydroxylase: effect of substitutions at Arg68 and Cys237. *Biochemistry* 2003;42:3419-28.
154. Trefz FK, Burton BK, Longo N, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pediatr* 2009;154:700-7.
155. Tropak MB, Blanchard JE, Withers SG, Brown ED, Mahuran D. High-throughput screening for human lysosomal beta-N-Acetyl hexosaminidase inhibitors acting as pharmacological chaperones. *Chem Biol* 2007;14:153-64.
156. Ulloa-Aguirre A, Janovick JA, Brothers SP, Conn PM. Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease. *Traffic* 2004;5:821-37.
157. van Spronsen FJ, van Wegberg AMJ, Ahring K, et al. Issues with European guidelines for phenylketonuria - Authors' reply. *The lancet Diabetes & endocrinology* 2017;5:683-684.
158. van Vliet D, Bruinenberg VM, Mazzola PN, et al. Therapeutic brain modulation with targeted large neutral amino acid supplements in the Pah-enu2 phenylketonuria mouse model. *The American journal of clinical nutrition* 2016;104:1292-1300.
159. Waters PJ. How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression. *Hum Mutat* 2003;21:357-69.
160. Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Scriver CR. Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol Genet Metab* 2000;69:101-10.
161. Waters PJ, Parniak MA, Hewson AS, Scriver CR. Alterations in protein aggregation and degradation due to mild and severe missense mutations (A104D, R157N) in the human phenylalanine hydroxylase gene (PAH). *Hum Mutat* 1998;12:344-54.
162. Wegele H, Muller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 2004;151:1-44.
163. Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature communications* 2010;1:100.
164. Woo SL, Lidsky AS, Guttler F, Chandra T, Robson KJ. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* 1983;306:151-5.
165. Yagi H, Ogura T, Mizukami H, et al. Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J Gene Med* 2011;13:114-22.
166. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* 2003;21:345-56.
167. Zurfluh MR, Zschocke J, Lindner M, et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 2008;29:167-75.

11 Veröffentlichungen

Publikationen

Gersting, S. W., Kemter, K. F., Staudigl, M., **Messing, D. D.**, Danecka, M. K., Lagler, F. B., Sommerhoff, C. P., Roscher, A. A., Muntau, A. C. (2008) Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *American Journal of Human Genetics* 83(1):5-17

Maier, E. M., Gersting, S. W., Kemter, K. F., Jank, J. M., Reindl, M., **Messing, D. D.**, Truger, M. S., Sommerhoff, C. P., Muntau, A. C. (2009) Protein misfolding is the molecular mechanism underlying MCADD identified in newborn screening. *Human Molecular Genetics* 18(9):1612-23

Gersting, S. W., Lagler, F. B., Eichinger, A., Kemter, K. F., Danecka, M. K., **Messing, D. D.**, Staudigl, M., Domdey, K. A., Zsifkovits, C., Fingerhut, R., Glossmann, H., Roscher, A. A., Muntau, A. C. (2010) Pahenu1 is a mouse model for tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency and promotes analysis of the pharmacological chaperone mechanism in vivo. *Human Molecular Genetics* 19(10):2039-49

Gersting, S. W., Staudigl, M., Truger, M. S., **Messing, D. D.**, Danecka, M. K., Sommerhoff, C. P., Kemter, K. F., Muntau, A. C. (2010) Activation of phenylalanine hydroxylase induces positive cooperativity toward the natural cofactor. *Journal of Biological Chemistry* 285(40):30686-97

Staudigl, M., Gersting, S. W., Danecka, M. K., **Messing, D. D.**, Woidy, M., Pinkas, D., Kemter, K. F., Blau, N., Muntau, A. C. (2011) The interplay between genotype, metabolic state and cofactor treatment governs phenylalanine hydroxylase function and drug response. *Human Molecular Genetics* 20(13):2628-41

Santos-Sierra, S., Kirchmair, J., Perna, A. M., **Reiß, D. D.**, Kemter, K. F., Röschinger, W., Glossmann, H., Gersting, S. W., Muntau, A. C., Wolber, G., Lagler, F. B. (2012) Novel pharmacological chaperones that correct phenylketonuria in mice. *Human Molecular Genetics* 21(8):1877-87

Jank JM, Maier EM, **Reiß D.D.**, Haslbeck M, Kemter KF, Truger MS, Sommerhoff CP, Ferdinandusse S, Wanders RJ, Gersting SW, Muntau AC (2014) The Domain-Specific and Temperature-Dependent Protein Misfolding Phenotype of Variant Medium-Chain acyl-CoA Dehydrogenase. *PLoS One*, 2014 Apr 9;9(4):e93852

Vorträge

Reiß, DD. *Biophysical methods for characterization of protein misfolding.* Forschungskolleg am Dr. von Haunerschen Kinderspital in München, Deutschland, 2007

Reiß, DD. *Structure-function relationship of BH₄ and its derivatives reveals distinct and genotype specific pharmacological chaperone effects.* SSIEM Symposium in Genf, Schweiz, 2011

Reiß, DD. *Pharmacological chaperone therapy in MCAD deficiency: rationale for mutant specific target sites.* 44th EMG Meeting in München, Deutschland, 2012

12 Danksagung

Zum Abschluss meiner Dissertation möchte ich mich gerne bei den Menschen bedanken, die mir in den letzten Jahren alle beratend zur Seite gestanden sind und auf unterschiedliche Weise zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Professor Dr. med. Ania C. Muntau bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, mich als Naturwissenschaftlerin in das spannende und abwechslungsreiche Gebiet der Stoffwechselmedizin einzuarbeiten und mir aufgrund der breitgefächerten Thematik unseres Labors ermöglichte, mich in unterschiedliche Fragestellungen zu vertiefen. Des Weiteren möchte ich mich bei meinem direkten Betreuer PD Dr. med. Søren W. Gersting für die hilfreichen Diskussionen, die Förderung und Forderung sowie die schöne und lehrreiche Zeit im Labor bedanken.

Vielen Dank an meinen externen Fachvertreter Herrn Professor Dr. Horst Domdey für die stets hilfsbereite und unterstützende Begleitung während der Promotion.

Ein großes Dankeschön geht an unsere TAs Heike und Heidi für die Unterstützung während der vielen Schritte rund um die Proteinreinigung, für die Routinezellkultur, die Übernahme der Bestellungen und vor allem für die Ordnung im Labor!

Vielen Dank an Mathias Woidy für die bioinformatische Auswertung der *activity landscapes* und des Screens. Danke an Dr. Dennis Breitsprecher und die Firma NanoTemper Technologies für die Möglichkeit die MST-Daten in den Laboren vor Ort zu messen. Vielen Dank an Dr. Jeremie Mortier für die Molecular Modeling-Studien und die Erklärungen dazu.

Ich werde die Zeit meiner Promotion als manchmal anstrengende, aber meist sehr schöne Zeit meines Lebens in Erinnerung behalten und das liegt an meinen sehr netten Kollegen, die ich inzwischen ausnahmslos zu meinen guten Freunden zählen kann! Liebe Alexandra, Amelie, Anca, Anna W., Esther, Francesca, Johanna, Julia, Kathi und Sonja, lieber Andy, Daniel und Marcus: vielen Dank für die schönen gemeinsamen Stunden im Kubus tagsüber bei der Arbeit und abends beim gemütlichen Zusammensitzen, Reden und Feiern.

Anna und Marta, wir haben unsere Promotion in der Molekularen Pädiatrie gemeinsam begonnen und jetzt fast gemeinsam zu Ende gebracht. Vielen Dank Euch beiden für die immer motivierenden Worte, die Hilfe bei Fragestellungen im Labor, die gemütlichen Kaffeepausen, die Mädelsabende und die alles in allem wunderschöne Zeit in München. Ich werde es vermissen, Euch nicht mehr so oft zu sehen!

Ein riesengroßes Dankeschön gilt meinen Eltern Ančica und Wilhelm, meinem Bruder Roman und meinen Schwiegereltern Ingrid und Herbert. Vielen Dank für Eure Unterstützung und dass ihr nie aufgehört habt an mich zu glauben!

An letzter aber wichtigster Stelle möchte ich mich bei meiner kleinen Familie bedanken: lieber Fabian, Du hast in den letzten Jahren immer hinter mir gestanden und warst trotz einiger Nachtschichten im Labor immer verständnisvoll. Vielen Dank für Deine Geduld, Deine Hilfe, Deine Nachsicht und die immer wieder motivierenden Worte wenn ich sie so nötig gebraucht habe. Vielen Dank für Deine Kraft und Deine Stärke und den Glauben daran, die Promotion zu einem guten Ende zu bringen. Vielen Dank für all die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse und unsere beiden wunderbaren Söhne Julius und Lukas. Die Promotion ist die Vergangenheit und uns Vieren gehört die Zukunft und ich freue mich schon sehr darauf!