

Endbericht des Projektes 5959, Regulatorprotein der GTP cyclohydrolase I

A. Klonierung und Expression des humanen GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein (GFRP) aus humanen THP-1 Myelomonocytozellen

Nachdem die Sequenz des GFRP aus Rattenleber bekannt geworden war, versuchten wir mit Primern gegen die Rattensequenz das GFRP mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion zu verstärken. Wir waren auf Anhieb erfolgreich und bekamen ein sehr homologes menschliches Protein. Bald darauf erschien die Sequenz des menschlichen GFRP Gens in der Genbank. Unser Leserahmen war mit diesem in der deduzierten Aminosäuresequenz zu 100 % identisch. Wir exprimierten nun das humane GFRP Protein mit Hilfe des Pet 21a Vektors in E.coli. Mit ebenfalls rekombinanter, humaner GTP-cyclohydrolase I aus E.coli konnten wir die Eigenschaften des humanen Regulatorproteins studieren. Wir fanden, daß ähnlich dem Rattenprotein die humane GTP-cyclohydrolase I in Gegenwart des GFRP durch Tetrahydrobiopterin (BH₄) gehemmt wird (Fig. 1), und diese Hemmung spezifisch durch L-Phenylalanin, nicht aber durch andere Aminosäuren wie L-Tyrosin, L-Tryptophan oder L-Arginin aufgehoben wird (Fig. 2). Phenylalanin bildet dabei einen Stimulator der Aktivität bei allen Tetrahydrobiopterinkonzentrationen (Fig 3).

B. Einfluß von Zytokinen auf die Expression des humanen GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein (GFRP)

Als nächstes untersuchten wir den Einfluß von Interferon-gamma und bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) auf die Expression des GFRP in THP-1 Zellen. Wir fanden in Northern blots, daß beide Stimuli die GTP cyclohydrolase I induzieren. Das Regulatorprotein GFRP hingegen wird durch LPS Zugabe herunterreguliert und ist im Northern Blot praktisch nicht mehr sichtbar (Fig. 4). Um zu testen, ob sich dieser Befund aus den Northern Blots auch in Aktivitäten an ganzen Zellen nachweisen läßt, stimulierten wir THP-1 Zellen mit Interferon-gamma und Interferon-gamma plus LPS in Gegenwart von normalem Medium und mit Zusatz von 2 mM Phenylalanin. Phenylalanin steigerte die Pteridinsynthese nur in den Zellen, die mit Interferon-gamma alleine behandelt worden waren. Diese Zellen enthielten auch noch meßbare Mengen von GFRP mRNA (s. Fig. 4).

In den Zellen, die mit Interferon-gamma und LPS behandelt worden waren, hat Phenylalanin keinen stimulierenden Effekt mehr (Fig. 5). Bei dieser Behandlung war auch keine mRNA für GFRP mehr in den Zellen nachweisbar (Fig. 4). Parallel gemessene Zell-Viabilität zeigt, daß die Einflüsse von Phenylalanin nicht auf Effekte auf das Zellüberleben zurückzuführen sind (Fig. 5). Ein weiteres, interessantes Ergebnis war, daß die Hemmung der GTP cyclohydrolase I mit 2,4-diamino-6-hydroxy pyrimidin (DAHP) nur in Gegenwart des Regulatorproteins GFRP vermittelt wird (Fig. 6)

C. Feedbackregulation an der GTP cyclohydrolase I von *Escherichia coli*

E. coli unterscheidet sich grundsätzlich von Säugetieren im Pteridinstoffwechsel dadurch, daß aus dem ersten Zwischenprodukt der Biosynthese von Pteridinen aus GTP, dem 7,8-Dihydroneopterintriphosphat, nicht Tetrahydrobiopterin sondern Tetrahydrofolsäure synthetisiert wird. *E. coli* enthält auch keine Phenylalaninhydroxylase. Wir waren daher interessiert zu sehen, welche Aminosäuren einen Einfluß auf die Hemmung der *E. coli* GTP cyclohydrolase I ausüben können. Da die komplette Sequenz des Genoms von *E. coli* bekannt ist, untersuchten wir auch, ob *E. coli* ein dem menschlichen Regulatorprotein verwandtes Protein enthält. Dazu verwendeten das Programm tblastx des NCBI-Blast - Servers (blast@ncbi.nlm.nih.gov) und die Datenbasis *E. coli*. Dieses Programm übersetzt die *E. coli* Sequenz in alle 6 möglichen Leserahmen und vergleicht diese mit der Proteinsequenz. Diese eher Rechenzeit-aufwendige Vorgangsweise ist notwendig, da GFRP ein kleines Protein ist (80 Aminosäuren), und kleine Leserahmen nicht immer sicher erkannt werden können. Wir fanden, daß *E. coli* kein dem menschlichen Regulatorprotein ähnliches Peptid codiert. Mit rekombinanter, homogen gereinigter GTP cyclohydrolase I aus *E. coli* testeten wir die Feedback-Hemmung durch Folsäurederivate. Wir fanden, daß *E. coli* GTP cyclohydrolase I durch Tetrahydrobiopterin und mehrere Tetrahydrofolsäurederivate gehemmt wird (Fig. 7), wobei das Ausmaß der Hemmung dem der humanen GTP cyclohydrolase I mit GFRP entspricht (vgl. Fig. 1). Auffällig war dabei, daß lediglich 5-Methyl Tetrahydrofolat kein guter Feedback-Hemmer ist (Fig. 7).

Wir verglichen nun die Wirkung der 20 codierten Aminosäuren auf die Feedback-Hemmung von Tetrahydrofolat auf die *E. coli* GTP cyclohydrolase I (Fig. 8). Wir sahen, daß L-Cystein spezifisch die Feedbackhemmung durch Tetrahydrofolat aufheben kann. Eine

Dosis-Wirkungskurve zeigte, daß dabei das D- und das L-Enantiomer gleich wirksam sind (Fig. 9). Cystein wirkt dabei spezifisch, weder Homocystein, Cystin, Cystathion noch Mercaptoethanol vermögen die gleiche Wirkung zu vermitteln (Fig. 10).

Im Säugetier-Organismus hebt Phenylalanin die Feedbackhemmung von Tetrahydrobiopterin auf die GTP-cyclohydrolase I auf, wodurch mehr Tetrahydrobiopterin für den Abbau dieser Aminosäure bereitgestellt wird. Vergleichbare Substrate Tetrahydrofolat-abhängiger Reaktionen in *E. coli* wären Serin (das mit Tetrahydrofolat zu Glycin verstoffwechselt wird), dUMP (das Folatabhängig zu dUMP methyliert wird), und Homocystein (das Folatabhängig zu dTMP methyliert wird). Alle drei Verbindungen zeigen aber keine Wirkung auf die Feedbackhemmung (Fig. 10).

Den Befund, daß spezifisch Cystein die Feedbackhemmung aufheben kann, interpretieren wir wie folgt: Wenn zu viel Homocystein durch einen Mangel an Tetrahydrofolat akkumuliert, so wird dieses zu Cystein (über Cystathion) abgebaut. Hohes Cystein verringert die Feedbackhemmung von Tetrahydrofolat auf die GTP cyclohydrolase I, wodurch eine höhere intrazelluläre Tetrahydrofolatkonzentration ermöglicht wird, die dann die Remethylierung von Homocystein zu Methionin begünstigt.

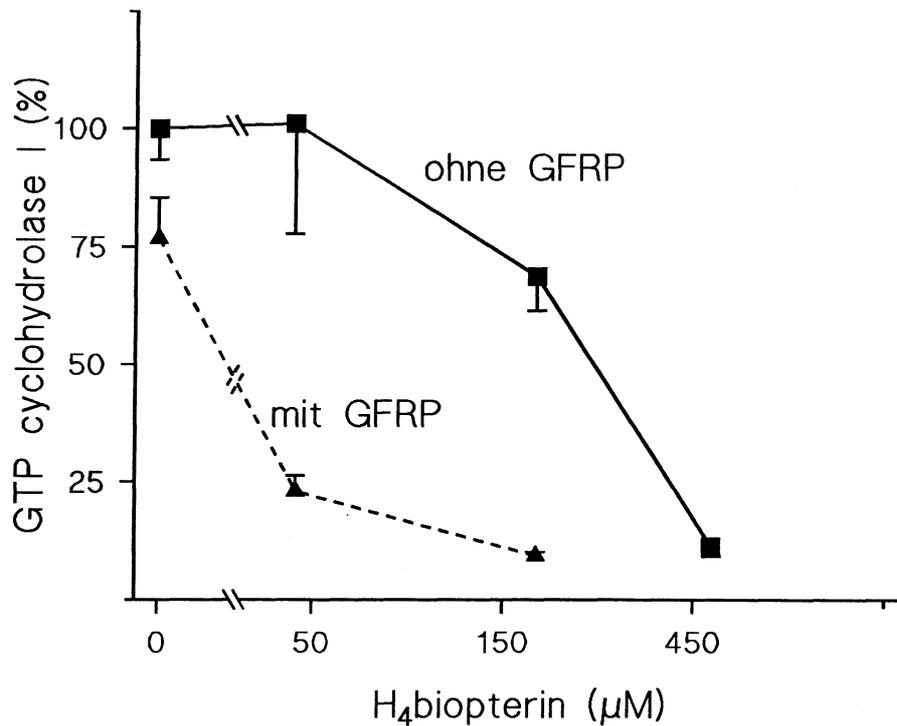
D. Expression des GTP cyclohydrolase I Feedback-Regulatorproteins in der hph-1 Maus.

Um ein Tiermodell für Hyperphenylalaninaemie zu schaffen war gezielt ein Mausstamm hergestellt worden, der Hyperphenylalaninaemie zeigt, den man hph1 nannte. Es zeigte sich, daß dieser Mausstamm jedoch keine Defekt in der Phenylalaninhydroxylase aufwies, sondern einen partiellen Defekt der Expression der GTP cyclohydrolase I zeigte. Die molekulare Ursache dieses Defektes konnte jedoch noch nicht gefunden werden.

In Zusammenarbeit mit Simon Heales vom Department of Neurology der University of London untersuchten wir die Arbeitshypothese, ob etwa eine Veränderung der Expression des GFRP oder eine Mutation in diesem Protein die Ursache für die gestörte Tetrahydrobiopterin Biosynthese in diesem Mausstamm darstellen könnte. Mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) verstärkten wir den Leserahmen des GFRP aus Mäusen, die die hph-1 Mutation tragen, und aus Kontrollmäusen, die eine normale GTP-cyclohydrolase I Aktivität aufweisen. Mit der so erhaltenen Sonde untersuchten wir die Expression des GFRP in hph-1

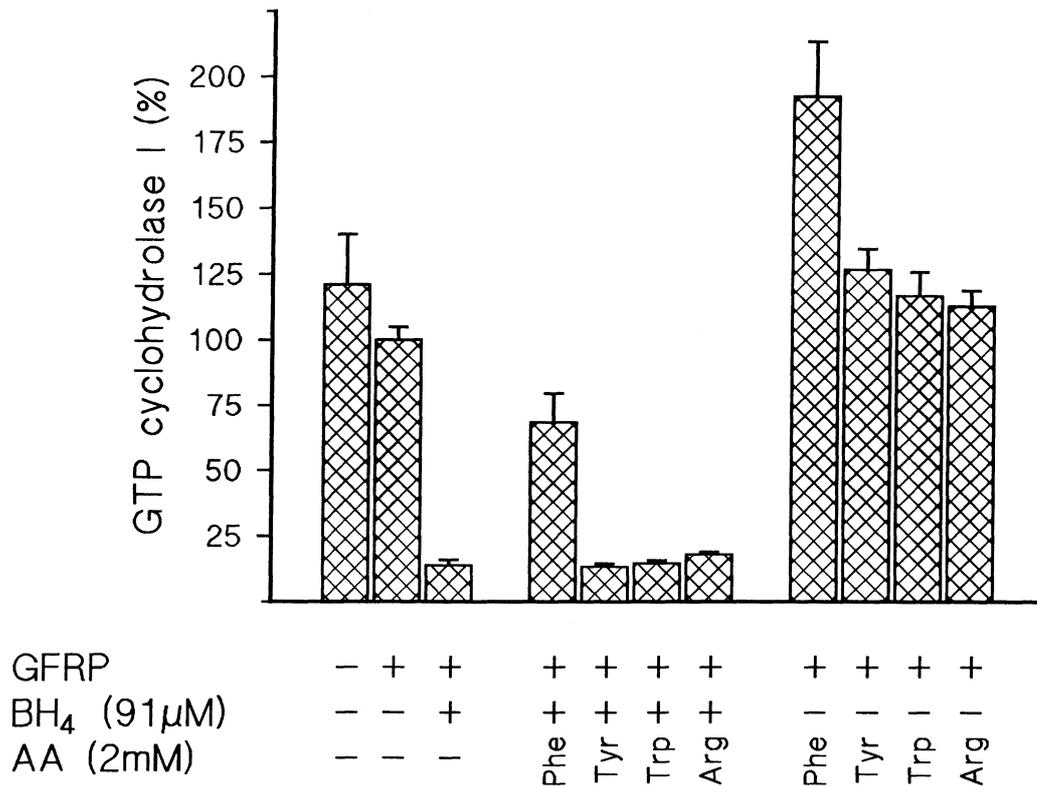
Mäusen im Vergleich zu Kontrollen (Fig. 11). Wir fanden, daß die hph-1 Mäuse eine normale Expression des GFRP aufwiesen, und konnten die bereits in der Literatur bekannte, verminderte GTP cyclohydrolase I Expression bestätigen (Fig 11). Die Nucleinsäuresequenzen der PCR Produkte wiesen an einer Stelle eine Mutation auf, die sich jedoch nicht in einem geänderten Leserahmen äußert. Diese Daten zeigten, daß in hph-1 Mäusen ein GFRP mit dem richtigen Leserahmen in normalen Mengen exprimiert wird. Wir fanden also keinen Hinweis, daß eine Mutation im GFRP Gen für die unterschiedliche GTP cyclohydrolase I Expression verantwortlich sein könnte.

Figur 1: Feedbackhemmung humaner, rekombinanter GTP-cyclohydrolase I durch Tetrahydrobiopterin mit und ohne GFRP



Humane GTP-cyclohydrolase I cDNA wurde aus einer Library gewonnen, die wir aus mit Interferon-gamma stimulierten THP-1 Zellen hergestellt hatten. Ein Klon, der den gesamten Leserahmen enthielt, wurde mit Hilfe NcoI und XhoI in den Pet16b Vektor (Novagen) umklont. Nach Stimulation mit Isopropyl-Thiogalaktosid (IPTG) wurden die Bakterien mit einer French-Press geöffnet, zentrifugiert, und die GTP cyclohydrolase I mit Hilfe von zwei Chromatographieschritten (DEAE und anschließend Hydroxylapaptit) gereinigt. Der Leserahmen des humanen GFRP wurde ebenfalls aus THP-1 Zellen mit PCR und mit Hilfe des TA Cloning Kit (Invitrogen) gewonnen. Nach Verdau mit NdeI und XhoI wurde es in einem Pet21a Vektor (Novagen) umklont, und die Expression des Proteins mit IPTG induziert. Als Kontrolle dienten Bakterien, die mit dem Vektor, jedoch ohne Insert, gleich behandelt worden waren. GTP cyclohydrolase I Aktivität wurde im Standard GTP cyclohydrolase I Puffer, der 0.3 M KCl enthielt, gemessen. Als Maß für die GTP cyclohydrolase I Aktivität wurde Neopterin nach Oxidation mit Jod und Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase bestimmt.

Figur 2: Einfluß ausgewählter Aminosäuren auf die Feedbackhemmung von Tetrahydrobiopterin an rekombinanter humaner GTP cyclohydrolase I in Gegenwart des rekombinanten humanen Regulatorproteins GFRP



Die Aktivität des GTP cyclohydrolase I wurde mit gereinigter, humaner rekombinanter GTP-cyclohydrolase I wie in Figur 1 beschrieben bestimmt. Die Aminosäuren wurden in ihrer L-Form in 2 mM Endkonzentration zugegeben, die Aminosäureabkürzungen entsprechen dem IUPAC three-letter code. Man sieht, daß L-Phenylalanin ein selektiver Stimulator des GTP cyclohydrolase I - GFRP komplexes ist. Ohne GFRP hat Phenylalanin keinen Einfluß auf die GTP-cyclohydrolase I aktivität.

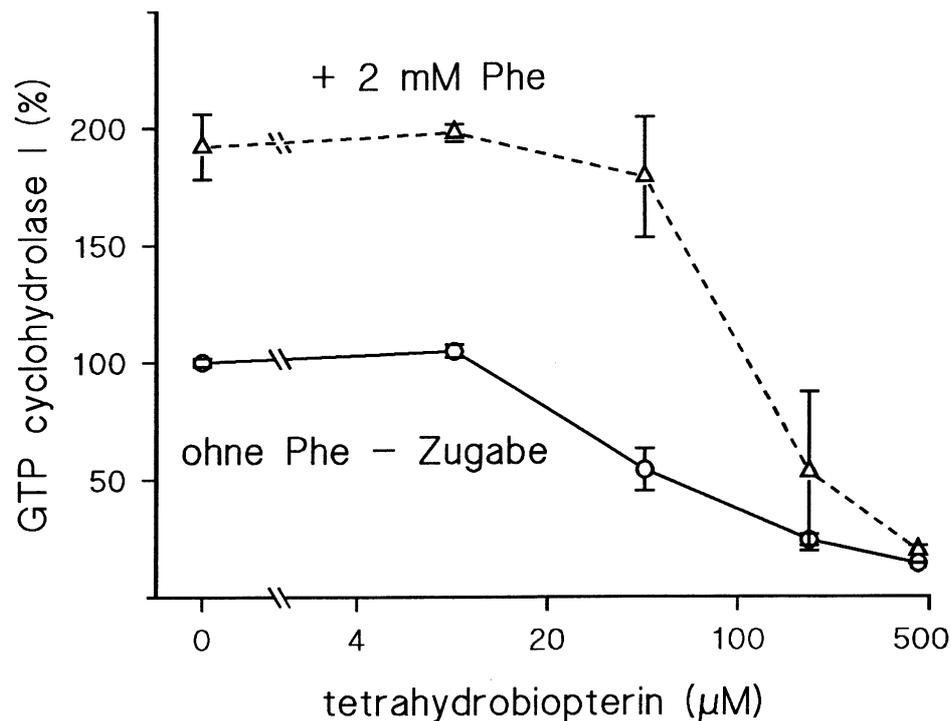
Abkürzungen:

GFRP: GTP cyclohydrolase I Feedback - Regulatorprotein

BH₄: 5R-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin

AA: Aminosäure

Figur 3: Abhängigkeit der Stimulation des GTP cyclohydrolase I - GFRP Komplexes durch Phenylalanin von der Konzentration des Feedback-Hemmers



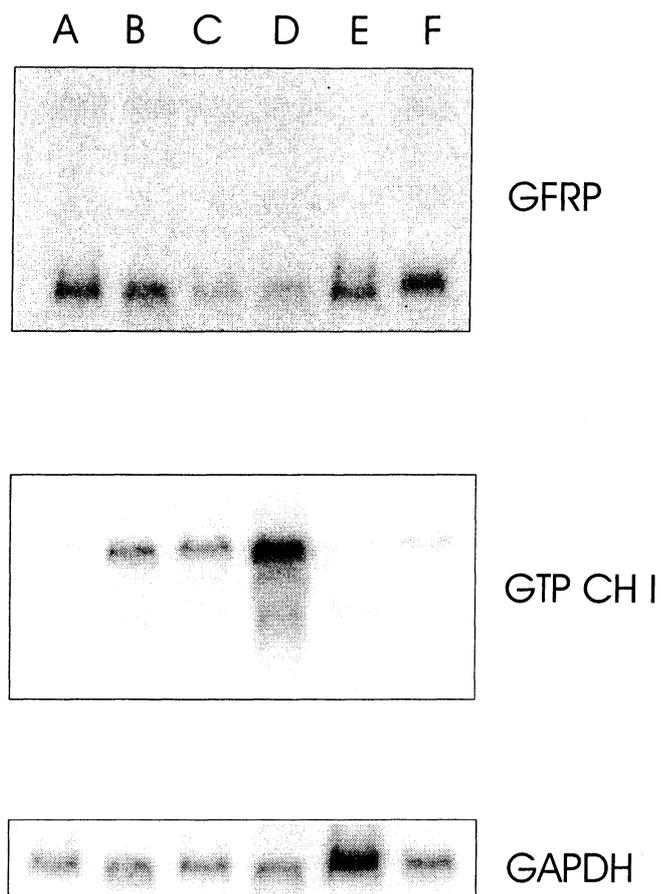
GTP cyclohydrolase I Aktivität wurde in Gegenwart oder Abwesenheit von L-Phenylalanin wie in Figur 1 beschrieben bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwert \pm Standardabweichung. Man sieht, daß Phenylalanin bei alle Tetrahydrobiopterin-Konzentrationen ein Stimulator des GTP-cyclohydrolase I- GFRP Komplexes ist.

Abkürzungen:

GFRP: GTP cyclohydrolase I Feedback - Regulatorprotein

BH₄: 5R-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin

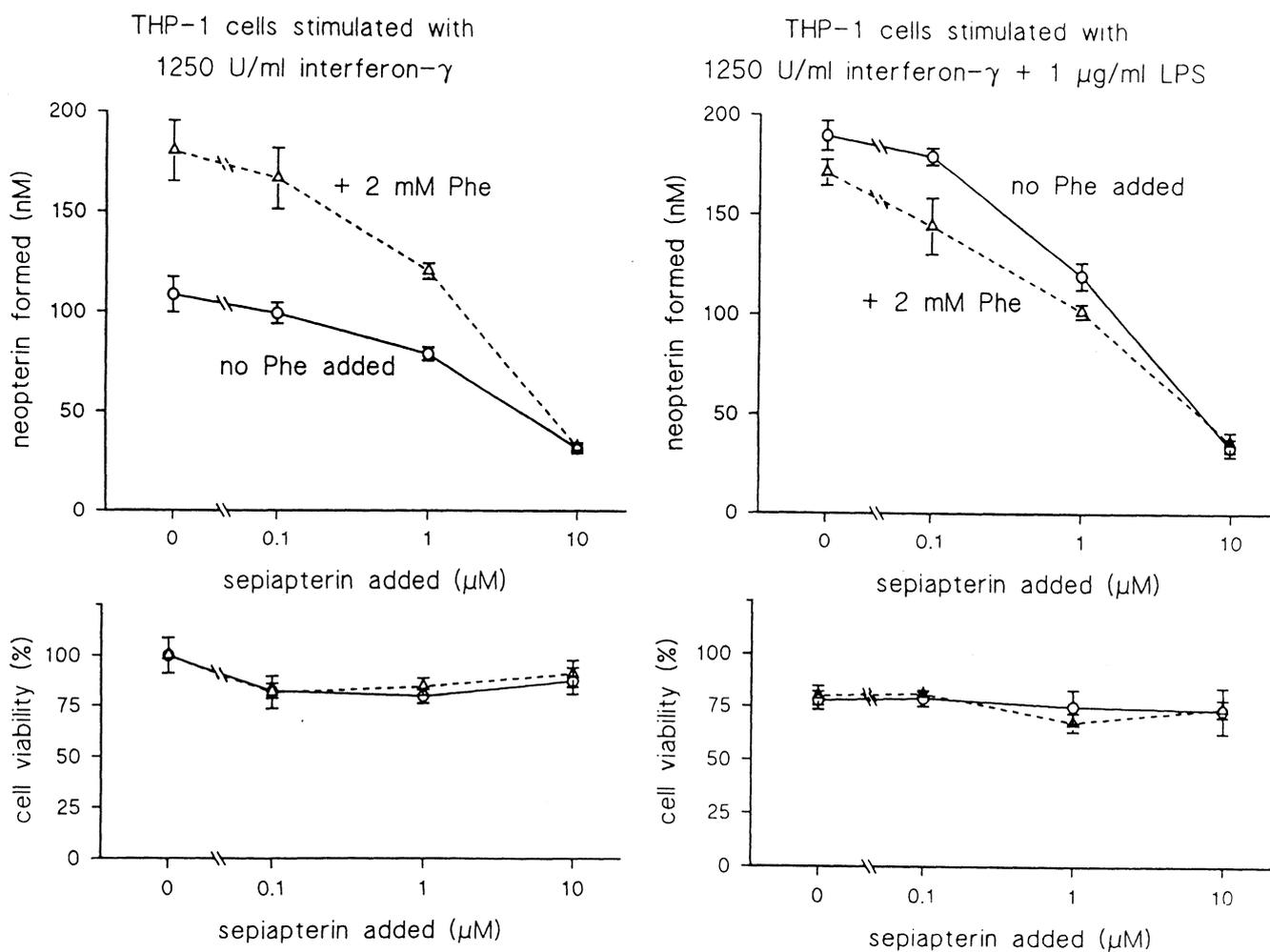
Figur 4: Expression des Regulatorproteins (GFRP) im Vergleich zu GTP-cyclohydrolase I in THP-1 humanen Myelomonocytozomen



THP-1 Zellen wurden für 6h mit folgenden Stimulantien behandelt:
A: Kontrolle; B: Interferon-gamma (1250 U/ml), C: LPS (1 ug/ml);
D: Interferon-gamma plus LPS; E: TNF-alpha (500U/ml);
F: IL-1-beta (2.5 ng/ml)

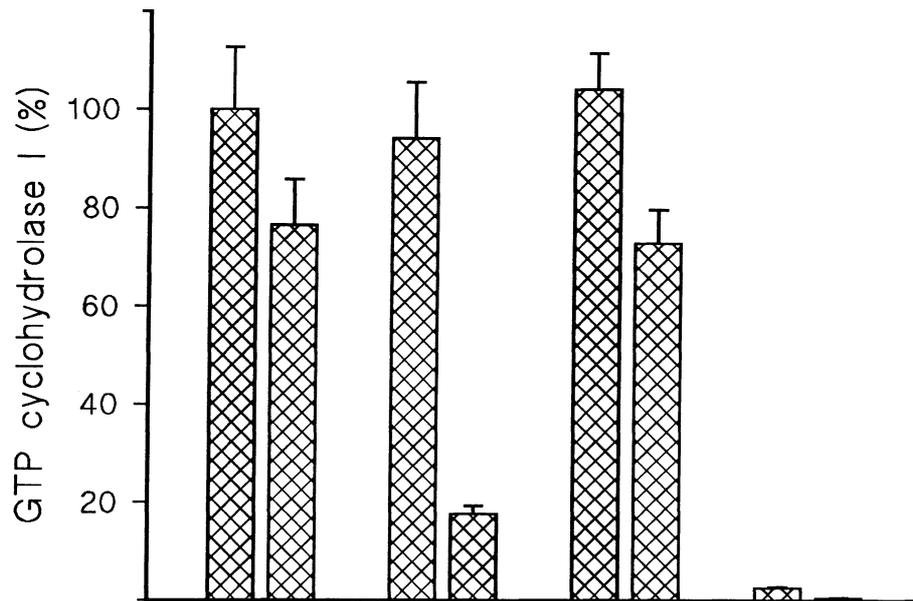
Zellen wurden geerntet, total RNA gewonnen, auf Agarose aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde dann in der Reihenfolge von oben nach unten mit den angegebenen, Phosphor-32 markierten Sonden hybridisiert. GAPDH steht für Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase.

Figur 5: Abhängigkeit der Neopterinbildung von humanen THP-1 Myelomonocytozellen von der Medium-Phenylalaninkonzentration und der Stimulationsart



THP-1 Zellen wurde für 48 h mit Interferon-gamma oder mit Interferon-gamm plus LPS; mit oder ohne Zugabe von 2 mM L-Phenylalanin in Gegenwart steigender Konzentrationen von L-Sepiapterin stimuliert. Neopterin wurde im Überstand mit reversed-phase HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt. Zellüberleben wurde mit Hilfe eines Farbstoffreduktionstests (MTT von Promega) bestimmt. Man sieht, daß Phenylalanin nur bei der Stimulation mit Interferon-gamma allein, nicht aber bei Stimulation mit Interferon-gamma plus LPS die Neopterinbildung stimuliert und daß dieser Effekt nicht durch einen Einfluß dieser Aminosäure auf das Zellüberleben ausgeübt wird.

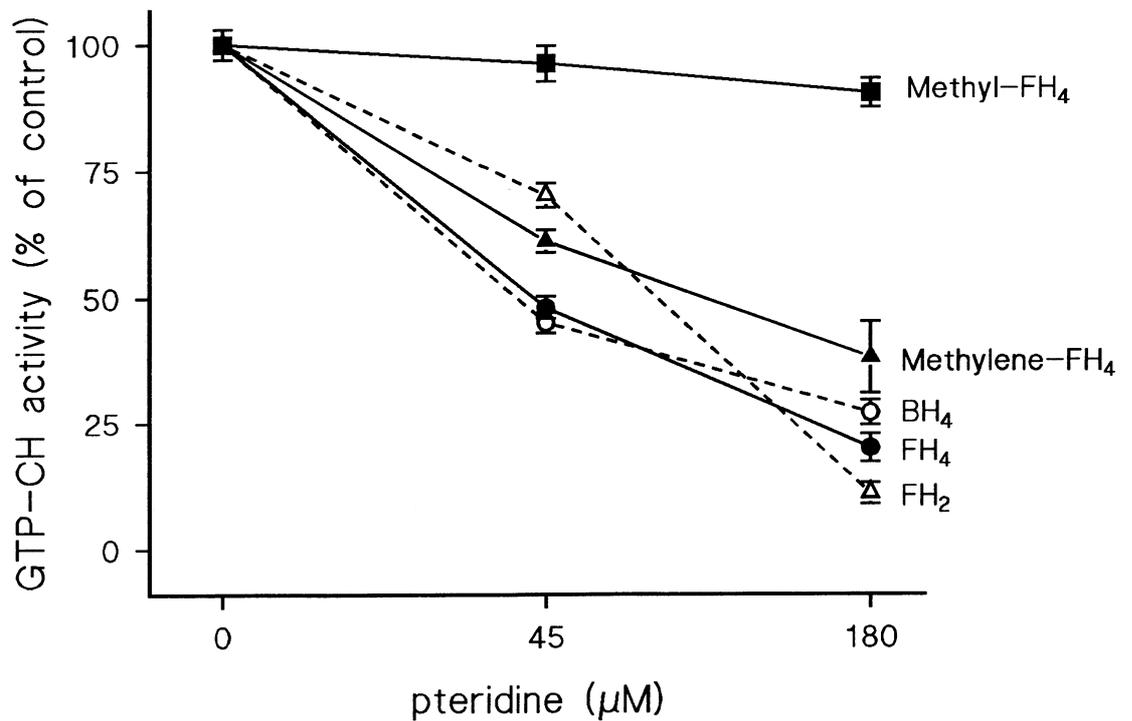
Figur 6: Abhängigkeit der Hemmung von humaner, rekombinanter GTP cyclohydrolase I durch 2,4-Diamino-6-Hydroxy Pyrimidin (DAHP) von der Anwesenheit des Regulatorproteins GFRP



GTP-CH I	+	+	+	+	+	+	-	-
pET21-GFRP	-	-	+	+	-	-	-	-
pET21	-	-	-	-	+	+	+	+
DAHP (2.5 mM)	-	+	-	+	-	+	-	+

Humane, rekombinante GTP cyclohydrolase I (GTP-CH I) wurde in Gegenwart oder Abwesenheit von Bakterienlysaten, die ein Plasmid (pET21-GFRP), das das humane GFRP codiert, exprimierten mit oder ohne DAHP mit GTP inkubiert und die GTP cyclohydrolase I Aktivität wie in Figur 1 beschrieben bestimmt. Als Kontrolle dienen Bakterienlysate (pET21), die den identischen Vektor, jedoch ohne Insert, tragen. Man sieht, daß DAHP nur in Gegenwart des Regulatorproteines GFRP die GTP cyclohydrolase I Aktivität effektiv hemmen kann.

Figur 7: Hemmung gereinigter *Escherichia coli* GTP cyclohydrolase I durch Pteridinderivate



Escherichia coli GTP cyclohydrolase I wurde aus einem überexprimierenden Stamm (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Bacher, Technische Universität München) mit Hilfe von DEAE Chromatographie homogen gereinigt und die GTP cyclohydrolase I Aktivität wie in Figur 1 beschrieben bestimmt. Man sieht, daß Tetrahydrobiopterin und mehrere Folsäurederivate, mit Ausnahme des 5-Methyl-Tetrahydrofolat, GTP cyclohydrolase I effektiv hemmen können.

Abkürzungen:

Methyl-FH₄: 5-Methyl tetrahydrofolat

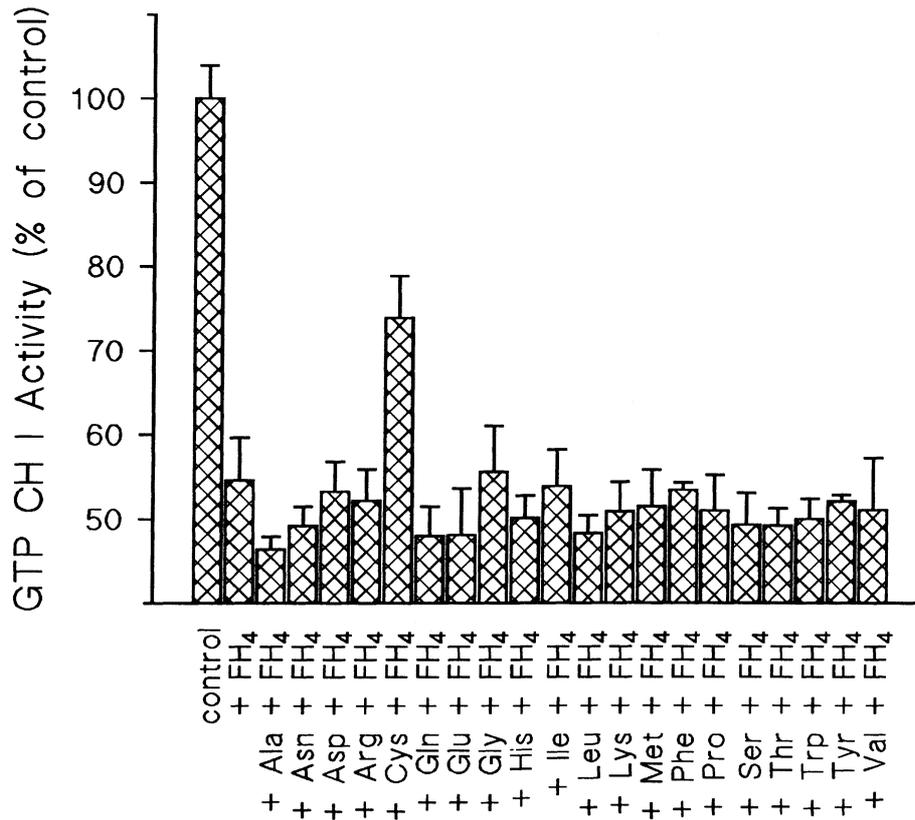
Methylen-FH₂: N5-N10-Methylen-Dihydrofolat

FH₄: Tetrahydrofolat

FH₂: 7,8-Dihydrofolat

BH₄: Tetrahydrobiopterin

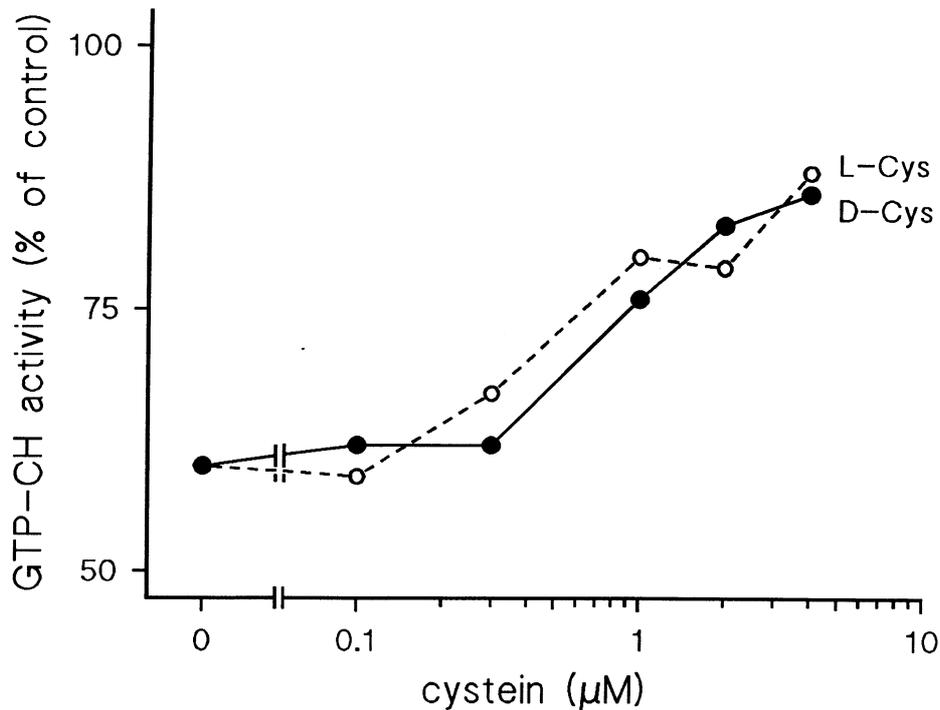
Figure 8: Einfluß von Aminosäuren auf die Hemmung der *E. coli* GTP cyclohydrolase I durch Tetrahydrofolsäure



GTP cyclohydrolase I aus *E. coli* wurde homogen gereinigt und die GTP cyclohydrolase I Aktivität mit und ohne Tetrahydrofolat ($45.5 \mu\text{M}$) mit und ohne die angegebenen L-Aminosäuren (2 mM; Standard three-letter code) wie in Figur 1 erläutert analysiert. Die Figur zeigt Mittelwerte von jeweils drei Experimenten und die Standardabweichung. Man sieht, daß von allen 20 codierten Aminosäuren nur Cystein die Feedbackhemmung durch Tetrahydrofolat signifikant beeinflussen kann. Ohne Tetrahydrofolat hat Cystein keinen Einfluß auf die GTP cyclohydrolase I Aktivität.

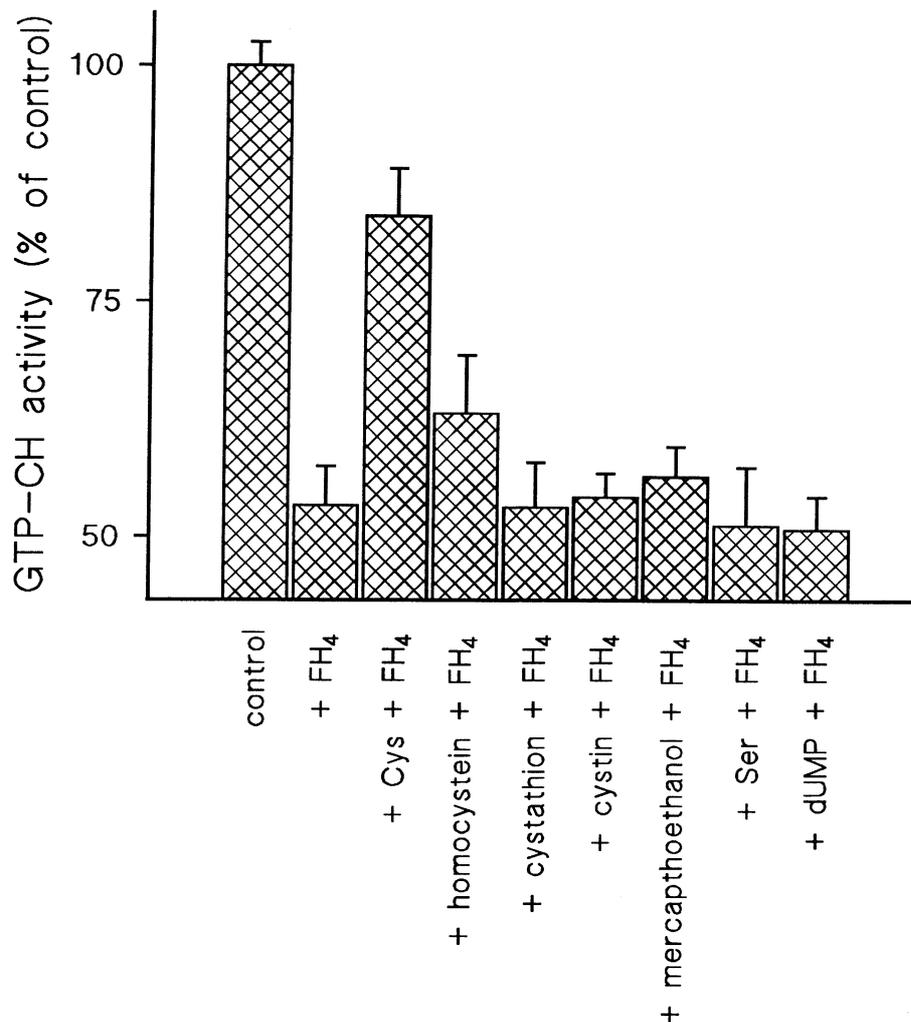
Abkürzungen: FH₄: Tetrahydrofolat

Figur 9: Dosisabhängigkeit der Wirkung von D- und L-Cystein in der Aufhebung der Feedbackhemmung der GTP cyclohydrolase I durch Tetrahydrofolat



E. coli GTP cyclohydrolase I wurde mit $45.5 \mu\text{M}$ Tetrahydrofolat gehemmt. Dann wurden steigende Dosen von D-Cystein (volle Kreise, volle Linie) oder L-Cystein (offene Kreise, strichlierte Linie) zugegeben, und die GTP cyclohydrolase I Aktivität wie in Figur 1 angegeben bestimmt. Ohne Cystein und ohne Tetrahydrofolat hat das Enzym die Aktivität 100%. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 2 parallelen Messungen. Man sieht, daß D- und L-Cystein die Feedbackhemmung der *E. coli* GTP cyclohydrolase I gleich gut aufheben können.

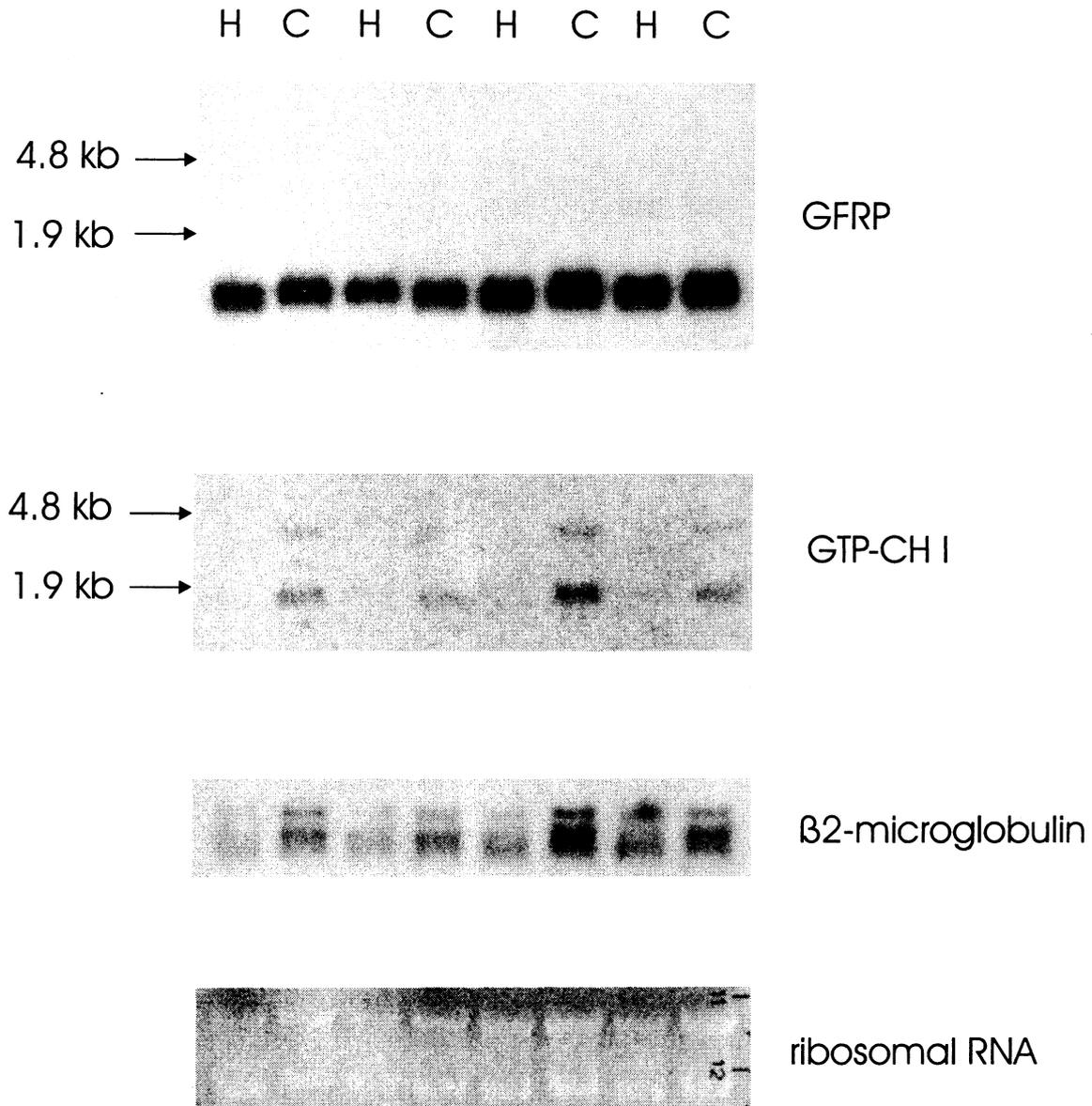
Figur 10: Spezifität der Aufhebung der Feedbackhemmung von *E. coli* GTP cyclohydrolase I durch Cystein im Vergleich zu anderen Thioverbindungen und Substraten Tetrahydrofolat-abhängiger Reaktionen



GTP cyclohydrolase I von *E. coli* wurde mit den angegebenen Verbindungen (2mM) mit und ohne Tetrahydrofolat (45.5 μ M) inkubiert und die GTP cyclohydrolase I Aktivität wie in Figur 1 angegeben bestimmt. Man sieht, daß nur Cystein, nicht aber andere Thioverbindungen oder Substrate Tetrahydrofolat-abhängiger Reaktionen die Feedbackhemmung von Tetrahydrofolat auf die GTP cyclohydrolase I aufheben können.

Abkürzung: FH₄ Tetrahydrofolat

Figur 11: Vergleich der Expression des Regulatorproteins (GFRP) und der GTP cyclohydrolase I (GTP-CH I) in Lebern von Kontrollmäusen (C) und hph-1 Mäusen (H)



Lebergewebe wurde sofort nach der Entnahme bei -80 Grad C gefroren und total RNA nach Standardmethoden präpariert. Je 10 ug wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, geblottet und mit P-32 markierten Sonden des Mausregulatorproteins (GFRP), der Maus-GTP cyclohydrolase I (GTP-CH I) und des Maus β2-Mikroglobulin hybridisiert. Zur Sichtbarmachung der tatsächlich auf dem Gel aufgetragenen Menge ist die Ethidiumbromidfärbung der ribosomalen RNAs ebenfalls abgebildet.

Figur 12: Nucleotid- und deduzierte Aminosäuresequenz des Regulatorproteins GFRP aus Kontroll- und hph-1 Mäusen

```

1 ATGCCCTACCTGCTCATCAGCACTCAGATCCGTATGGAGGTGGGCCCCACCATGGTGGGT 60
  M P Y L L I S T Q I R M E V G P T M V G

61 GATGAACACTCGGATCCGGAGTTGATGCAGCACCTGGGGCCTCCAAGAGAAGTGTCTTG 120
  D E H S D P E L M Q H L G A S K R S V L

121 GGAAACAAC TTTTACGAATACTACGTCAACGACCCTCCTCGCATAGTCCTGGACAAGCTG 180
  G N N F Y E Y Y V N D P P R I V L D K L

181 GAATGCAAGGGCTTCCGAGTGCTGAGCATGACAGGGGTGGGCCAGACGCTGGTGTGGTGT 240
  E C K G F R V L S M T G V G Q T L V W C

241 CTGCACAAGGAATGA 255
  L H K E *

```

Leberstücke wurden unter flüssigem Stickstoff verrieben und total RNA nach Standardmethoden präpariert, in cDNA transkribiert, mit PCR verstärkt und das PCR Produkt kloniert (TA Cloning Kit, Invitrogen) und sequenziert. Die Sequenzen der Primer, welche nach der bekannten Sequenz des GFRP der Ratte konstruiert worden waren, sind unterstrichen. Der Leserahmen der Maus unterscheidet sich nur in drei Aminosäuren von dem der Ratte, diese Aminosäuren sind unterstrichen. Kontrollmäuse und hph-1 Mäuse unterscheiden sich in Nucleotid 82 (unterstrichen), welches C in Kontrollen und T in hph-1 ist. Da beide Codons (CTG un TTG) für Leucin codieren, führt dieser Unterschied aber nicht zu einem veränderten GFRP Protein.