

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL
FACULTE DES SCIENCES

**Etude du mécanisme d'inhibition
de la porphobilinogène synthase, isolée
d'*Escherichia coli* CR 261**

Thèse
présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de docteur ès sciences
par

MATTHIAS HENZ

de Bärschwil SO
Chimiste diplômé de l'Université de Bâle

Mai 1997

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

**Etude du mécanisme d'inhibition de la
porphobilinogène synthase isolée d'*Escherichia
coli* CR 261**

de M. Matthias Henz

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

MM. R. Neier (directeur de thèse), R. Tabacchi,
P. Schürmann, W.-D. Woggon (Bâle) et H. Gehring (Zürich)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 10 juillet 1997

Le vice-doyen:

F. Stoeckli

F. Stoeckli

Lebenslauf

Geburtsdatum: 08. August 1968

Geburtsort: Basel

Heimatort: Bärschwil SO

Eltern: Guido Henz († 1. Juni 1989)
Wilma Henz-Kaiser

Schulbildung: Primarschule in Birsfelden BL (1975 - 80).

Progymnasium in Birsfelden BL (1980 - 84).

Gymnasium in Muttenz BL mit Matura Typus B (Latein)
(1984 - 87).

Chemie-Studium an der Universität Basel (1987 - 93).

Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. Ch. Tamm unter der
Leitung von Dr. P. Strazewski: "Herstellung von $^{15}\text{N}_2$ -Thio-
harnstoff und Cyanamid im Hinblick auf die Synthese von
 $^{15}\text{N}_2$, ^{17}O -Uracil" (Sommersemester 92).

Doktorarbeit in der Gruppe von Prof. Reinhard Neier
(Universität Neuchâtel): "Inhibitionsstudien zum Mechanismus der
Porphobilinogen Synthase isoliert aus *Escherichia coli* CR 261"
(1993 - 97).

Assistenzstelle bei Prof. Reinhard Neier und Prof. Klaus
Bernauer (Universität Neuchâtel (1993 - 97)).

soutenance de thèse: 10. Juni 1997

présentation publique: 19. Juni 1997

Meiner Mutter in Dankbarkeit gewidmet

Es ist schwer, Misserfolg zu tragen. Aber noch schwerer ist es, Erfolg zu tragen, weil Erfolg nur mit dem grössten Mut, zu dem der Mensch fähig ist, getragen werden kann: mit dem Mut zur Demut.

Max Thürkauf

Nichts aber kann dem Menschen widerstehen, der die Ganzheit seines Seins einsetzt, um ein Problem zu lösen. Jede Schwierigkeit ist Ausdruck der Uneinigkeit und der Zerfahrenheit; sie weicht aber der geschlossenen Einheit aller positiven Kräfte. Die vereinte Konzentration unserer körperlichen, geistigen und seelischen Kräfte ist eine Macht, der das Negative niemals standhalten kann.

Norman Vincent Peale

Diese Arbeit entstand zwischen Oktober 1993 und Mai 1997 am Institut de Chimie und am Institut de la Biochimie végétale unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Neier.

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater, Reinhard Neier, für seine volle Unterstützung, die lehrreichen Diskussionen, das mir entgegengebrachte Vertrauen und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Es war für mich eine Freude in seiner Gruppe zu arbeiten und die gestellte bioorganische Fragestellung zu bearbeiten.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Peter Schürmann für die Bereitschaft, mir bei der Aufzucht der Bakterien und der Isolation des Enzyms tatkräftig zur Seite gestanden zu haben. Seine stete Hilfsbereitschaft und die vielen Diskussionen sind u.a. verantwortlich für das Gelingen dieser Arbeit. Den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern seiner Gruppe (Eric Gaynard, Greg Del Val und Yves Balmer) bin ich ebenfalls zu grossem Dank verpflichtet.

Ich danke den Mitgliedern der Prüfungskommission, Herrn Prof. Dr. W.-D. Woggon (Universität Basel), Herrn Prof. Dr. H. Gehring (Universität Zürich), Herrn Prof. Dr. R. Tabacchi und Herrn Prof. Dr. P. Schürmann (Universität Neuchâtel) diese Arbeit begutachtet zu haben.

Allen meinen Arbeitskollegen und Freunden möchte ich für die schöne und abwechslungsreiche Zeit danken: Alain Greppi, Andreas Franz, André Chaperon, Caroline Jarret, Cécile Pasquier, Christiane Bobillier, Frédéric Stauffer, Jörg Velker, Klaus Neuschütz, Maurus Marty, Pavel Bobal, Pierre-Yves Musard, Thomas Engeloch, Thomas Thyran und Toni Aeby.

Ich möchte alle Studenten (Jean-Marc Vaucher, Christophe Vichard und Steve Muriset), die in unserer Gruppe im Rahmen des fortgeschrittenen organischen Praktikum an dieser Doktorarbeit mitgearbeitet haben, herzlich danken. Vielen Dank auch an Cécile Bolle, welche ich während ihres letzten Laborantenlehresjahres partiell beschäftigen durfte.

Ich danke Herrn Prof Dr. K. Bernauer für die schönen Momente der Assitenzzeit in seiner Gruppe. Es sei dabei auch allen seinen Doktoranten gedankt.

Meinen Dank gilt auch allen übrigen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere Saturin Claude und Heinz Bursian.

Ich danke allen Kollegen und Kolleginnen, die nicht am Institut tätig sind, mir aber zahlreiche schöne Stunden in Neuchâtel bereitet haben. Ich möchte mich dabei besonders bei Ellen Dunst für die schöne Zeit bedanken.

Besten Dank dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* für die gewährte finanzielle Unterstützung.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Porphobilinogen Synthase in *Escherichia coli* CR 261 exprimiert und anschliessend isoliert. In einer 9 l Fermentation konnten 88.2 g Zellfeuchtmasse gewonnen werden. Nach einer Ammoniumsulfatfällung konnte durch zwei chromatographische Schritte 814 mg Enzym aufgereinigt werden. Es wurden insgesamt 58 Moleküle als potentielle Inhibitoren der Porphobilinogen Synthase untersucht. Dabei wurden Substrat-, Zwischenprodukt- und Produktanologa im Enzymassay getestet. I-Hydroxy-4-nitro-2-butanon (I) erwies sich als bester Inhibitor in der Reihe der Substratanologa, und 4,6-Dioxoheptansäure (II) war der beste Hemmer unter den Zwischenproduktanologa (Abbildung a). II ist ein anomales Abbauprodukt von Tyrosin und konnte aus dem Urin von Patienten, die an Tyrosinämie leiden, isoliert werden.

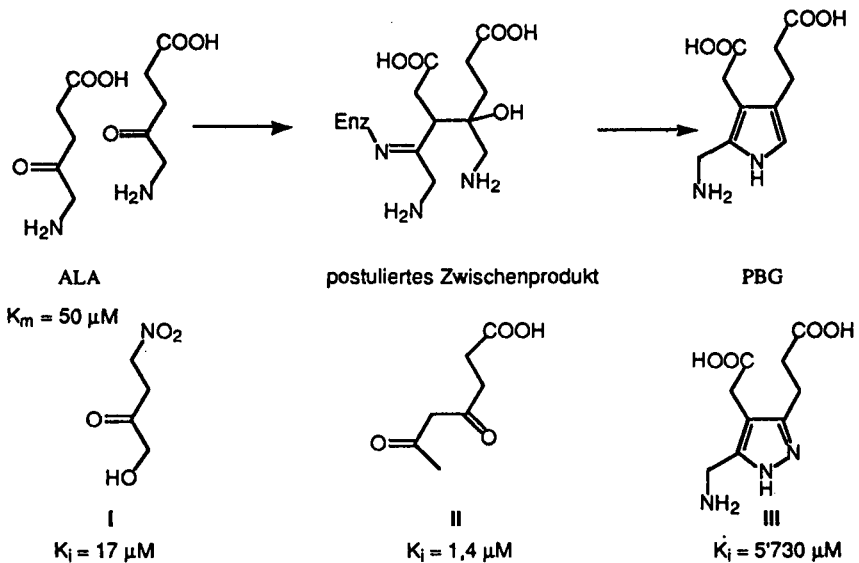


Abbildung a. Oben: Das von *Shemin* postulierte Zwischenprodukt der von der Porphobilinogen Synthase katalysierten Reaktion.

Unten: Inhibitor I aus der Gruppe der Substratanologa, Inhibitor II aus der Gruppe der Zwischenproduktanologa und Inhibitor III aus der Gruppe der Produktanologa

Vergleiche der Inhibitionskonstanten mit der Michaeliskonstante (K_m = 50 μM) belegen, dass sowohl I wie auch II von der Porphobilinogen Synthase besser erkannt werden als das

natürliche Substrat. I ist ein kompetitiver Inhibitor, wogegen II unkompetitives oder gemischtes Verhalten im Enzymassay zeigt. Dies wurde so interpretiert, dass I und II an zwei verschiedenen Stellen innerhalb der Active Site intervenieren. Das Azaanologon III ist in der Reihe der Produktanologon der beste Inhibitor. III ist ein kompetitiver Inhibitor und konkurriert mit dem PBG um eine freie Stelle im Enzym. Die Mehrzahl der getesteten Moleküle erwiesen sich als kompetitive oder unkompetitive Inhibitoren, es wurden aber auch "Slow Binder" und irreversible Inhibitoren gefunden.

RÉSUMÉ

Dans ce travail, nous avons exprimé la porphobilinogène synthase de *Escherichia coli* CR 261, puis isolé cette dernière. A partir d'une fermentation de 9 l, nous avons récupéré 88.2 g de masse humide de cellules. Après une précipitation au sulfate d'ammonium et deux étapes de purification chromatographique, nous avons obtenu 814 mg d'enzyme.

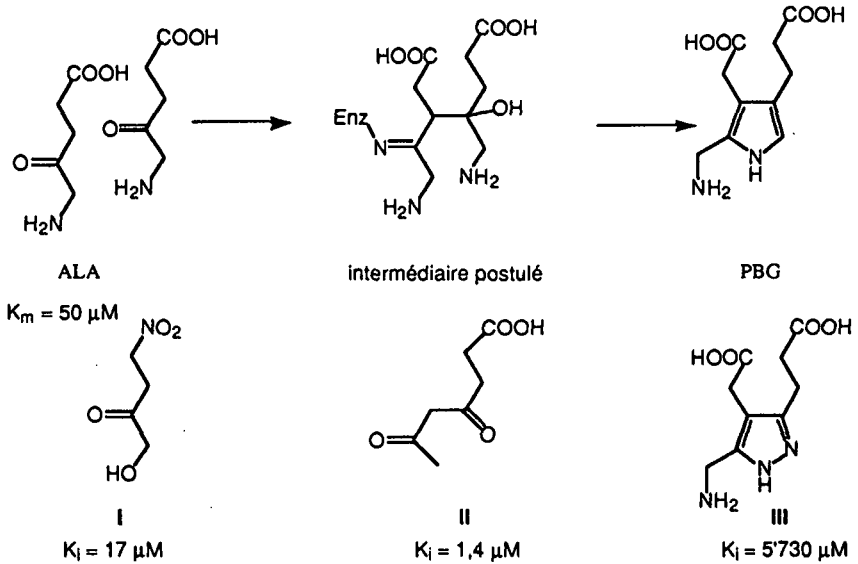


figure a. En haut: Intermédiaire fixé sur la porphobilinogène synthase postulé par *Shemin* .

En bas: Inhibiteur I du type analogue au substrat, inhibiteur II du type analogue d'intermédiaires postulés et inhibiteur III du type analogue au produit.

Nous avons examiné 58 inhibiteurs potentiels de porphobilinogène synthase. Parmi celles-ci, nous distinguons des analogues du substrat, d'intermédiaires postulés et du produit.

L' 1-hydroxy-4-nitro-2-butanone (I) s'est avéré être le meilleur inhibiteur analogue au substrat, alors que le meilleur inhibiteur analogue du produit était l'acide 4,6 dioxoheptanoïque (II) (figure a). II est un produit anormal de la dégradation de la tyrosine et a été isolé à partir de l'urine de patients souffrant de tyrosinémie. La comparaison des constantes d'inhibition avec la constante de Michaelis ($K_m = 50 \mu\text{M}$) montre que la porphobilinogène synthase reconnaît mieux I et II que le substrat naturel. I montre une inhibition compétitive alors que II montre une inhibition incompétitive ou mixte. Nous interprétons ces résultats par une interaction pour les deux molécules à des endroits différents au niveau du site actif.

L'aza-analogue III est le meilleur inhibiteur analogue au produit que nous avons testé, il présente une inhibition compétitive et concurrence le PBG.

Nous avons déterminé pour la plupart des molécules testées soit une inhibition compétitive ou incompétitive bien que nous ayons trouvé des cas d'inhibitions irréversibles et "slow binder".

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Die Biosynthese der «Pigmente des Lebens».....	1
2. Die Porphobilinogen Synthase	3
2.1. Vorgeschlagene Mechanismen der PBGS im Vergleich.....	5
2.2. Mechanismus nach <i>Shemin</i>	6
2.3. Mechanismen nach <i>Jordan</i>	7
2.3.1. JORDAN I [22].....	8
2.3.2. JORDAN II [15].....	8
2.4. Eigenschaften der PBGS.....	9
2.5. Die Rolle der Metalle als Kofaktoren.....	10
2.5.1. Einteilung der Porphobilinogen Synthase.....	12
2.6. Inhibitionsstudien.....	13
3. Bisherige Arbeiten in unserer Gruppe	15
3.1. Inhibitionsstudien der PBGS aus <i>Rhodobacter spheroides</i>	15
3.2. Biomimetische Betrachtung.....	16
3.3. Die Porphobilinogen Synthase eine Aldolase?.....	17
4. Problemstellung und Ziele dieser Arbeit	18
5. Mikrobiologische und biochemische Arbeiten	20
5.1. Stammhaltung und Aufzucht der <i>E. coli</i> CR 261.....	20
5.1.1. Vorversuche zur Aufzucht in einem 2 l Fermenter.....	20
5.1.2. Vorversuche zur Aufzucht in einem Rotationsschüttler.....	22
5.1.3. Aufzucht der <i>E. coli</i> CR 261 in einem 10 l Fermenter.....	23
5.2. Isolierung der PBGS aus <i>E. coli</i> CR 261.....	24
5.2.1. Vorversuche zur Aufreinigung.....	24
5.2.1.1. Darstellung des Lysats.....	25
5.2.1.2. Ammoniumsulfatfällung.....	25
5.2.1.3. Sephacryl 300 Säule und Mono-Q-Anionenaustauscher.....	26
5.2.1.4. RNA und DNase- Behandlung und Sephacryl 300 Säule.....	27
5.2.1.5. Phenylsuperose Säule.....	27

5.3. Optimierte Isolierung der PBGS aus <i>E. coli</i> CR 261.....	29
5.4. Stabilität von angereichertem PBGS	34
6. Enzymkinetik und Inhibitionsstudien gezeigt am Beispiel der Aldolase der Klasse I.....	35
6.1. Die Grundlagen der Enzymkinetik.....	35
6.1.1. Die Kinetik des Einsubstratenzyms.....	35
6.2. Verschiedene Inhibitionstypen.....	36
6.2.1. Kompetitive Inhibition	37
6.2.2. Irreversible Inhibition	40
6.2.3. "Tightly Bound"("Slow reversible") Inhibitoren.....	41
6.2.4. Unkompetitive und gemischte Inhibition.....	42
6.2.5. Graphische Auswertung der kinetischen Daten [81,82].....	43
7. Inhibitionsstudien der Porphobilinogen Synthase.....	44
7.1. Die Enzymkinetik der Porphobilinogen Synthase	44
7.2. Diskussion der möglichen Inhibitionsstellen der PBGS	45
7.3. Durchführung der Inhibitionsstudien.....	46
7.4. Bemerkungen zum Enzym Assay.....	46
7.4.1. Wahl der Inkubationsbedingungen	46
7.4.2. Wahl des Kosolvens.....	47
7.4.3. Stabilität des Ehrlichreagenzkomplexes	48
7.5. Auswertung der Inkubationsversuche.....	49
7.5.1. Auswertungsschema der Levulinsäure (als Beispiel eines kompetitiven Inhibitors).....	51
7.5.2. Auswertungsschema der 4,6-Dioxoheptansäure (als Beispiel eines unkompetitiven Inhibitors).....	55
7.5.3. Differenzierung zwischen "Slow Binder" und irreversiblen Inhibitor gezeigt am Beispiel des 2-Nitrobenzaldehyd.....	58
7.6. Inhibitionsergebnisse der Substratanaloga.....	61
7.6.1. Variation in Position 1.....	61
7.6.2. Variation in Position 2.....	62
7.6.3. Variation in Position 3.....	62
7.6.4. Variation in Position 4.....	63

7.6.5. Variation in Position 5	63
7.7. Inhibitionsergebnisse der Zwischenproduktanaloga	65
7.8. Inhibitionsergebnisse von aromatischen Nitrocarbonylverbindungen	69
7.9. Inhibitionsergebnisse der Produktanaloga	69
7.10. Dialyseversuche von einer Auswahl irreversibler Inhibitoren	71
8. Diskussion der Inhibitionsresultate	72
8.1. Mechanistische Arbeitshypothese	72
8.2. Diskussion der Inhibitionsresultate der Substratanaloga	74
8.3. Diskussion der Inhibitionsstudien der Produktanaloga	79
8.4. Diskussion der Inhibitionsstudien der Zwischenproduktanaloga	80
8.5. Vorgeschlagener Mechanismus der PBGS aus <i>E. coli</i>	86
8.6. Inhibitionsstudien der PBGS von <i>E. coli</i> und <i>Rhodobacter spheroides</i> im Vergleich	88
8.7. Ausblick	88
9. Synthetische Arbeiten	90
9.1. Synthese der ALA	90
9.1.1. Lyophilisation der ALA	90
9.1.2. Bestimmung der Reinheit der ALA mittels HPLC	91
9.1.3. Symmetrische Dimerisierung der ALA	92
9.2. Synthese verschiedener potentieller Inhibitoren	92
9.2.1. Synthese von Substratanaloga	92
9.2.2. Synthese von Zwischenproduktanaloga	94
9.2.2.1. Synthese von 3-Acetyl-4-oxopentansäuresäure	94
10. Allgemeines	95
10.1. Geräte zum biologischen Arbeiten	95
10.2. Geräte zum synthetischen Arbeiten	95
10.3. Chemikalien und Biochemika	96
11. Mikrobiologischer und enzymatischer Teil	98
11.1. Kultivierung der <i>E. coli</i> CR 261 und Aufreinigung der PBGS	98
11.1.1. Vorkultur	98

11.1.2. Hauptkultur	98
11.1.3. Rohextrakt und Darstellung des Lysats.....	98
11.1.4. Zugabe von Proteaseninhibitoren und Ammoniumsulfatfällung.....	99
11.1.5. Phenylsepharose-Säule	99
11.1.6. Sephacryl 300.....	99
11.1.7. Aufbewahrung der PBGS.....	100
11.2. Methoden zur Protein- und Aktivitätsbestimmung.....	100
11.2.1. Proteinbestimmung nach Biorad.....	100
11.2.2. Proteinbestimmung mittels Fluoreszenz.....	100
11.2.3. Bestimmungen der PBGS Aktivität während der Enzymanreicherung	101
11.2.4. Bestimmung der pH-Abhängigkeit der PBGS.....	101
11.3. Enzym Assay der PBGS	102
11.3.1. Allgemeines	102
11.3.2. PBGS bei reversiblen Inhibitoren	102
11.3.3. Bestimmung des irreversiblen Verhaltens der Inhibitoren im Enzym Assay ..	104
11.3.4. Dialyseversuch zur Unterscheidung zwischen Slow Binder und reinem irreversiblen Inhibitor.....	105
11.3.4.1. Dialyseversuch zeigt an 5-Cyanolevulinsäuremethylester	105
11.3.4.2. Bemerkung zur Durchführung des Dialyseversuchs	105
12. Synthetischer Teil.....	106
12.1. Synthese der ALA und dessen Dimerisationsprodukt	106
12.1.1. Synthese von 5-Bromolevulinsäuremethylester	106
12.1.2. Synthese von 5-Phtalimidlevulinsäuremethylester	106
12.1.3. Synthese von 5-Aminolevulinsäure	106
12.1.4. Synthese von 2,5 Dipropionsäurepyrazin	107
12.2. Synthese von Substrat- und Zwischenproduktanaloga	107
12.2.1. Synthese von Levulinsäurebenzylester	107
12.2.2. Synthese von 4-Chlor-2-butanon	108
12.2.3. Synthese von 4-Nitro-2-butanon	108
12.2.4. Synthese von 5-Cyanolevulinsäuremethylester.....	108
12.2.5. Synthese von 3-Thiocyanolevulinsäuremethylester	109
12.2.6. Synthese von 5-Thiocyanolevulinsäuremethylester (95)	109

12.2.7. Synthese von 2-Hydroxylevulinsäure (43) und trans-4-Oxo-2-pentensäure (45).....	110
12.2.8. Synthese von 3-Acetyllevulinsäuremethylester (98).....	110
12.2.9. Synthese von 3-Acetyllevulinsäure (99)	110
13. Literatur	112
14. Anhang	117

THEORETISCHER TEIL

1. EINLEITUNG

1.1. Die Biosynthese der «Pigmente des Lebens»

Jeder Kubikzentimeter menschlichen Bluts enthält fünf Milliarden rote Blutkörperchen, deren wichtigster Bestandteil das Protein Hämoglobin ist. Mit den fünf Litern Blut des erwachsenen Menschen wird fast ein Kilogramm Hämoglobin bewegt, das 1.3 Liter Sauerstoff binden und transportieren kann. Hämoglobin ist ein Polypeptid, welches zur Bindung des Sauerstoffs eine prosthetische Gruppe - das Häm (1) - benötigt. Das Häm (1) besteht aus einem Eisenatom und vier Pyrrolringen, die durch Methinbrücken zu einem Tetrapyrrolosystem verknüpft sind. Durch saure Hydrolyse lässt sich der rote Blutfarbstoff, das Häm, aus dem Proteinverband herauslösen. Davon hat jeder Mensch etwa 30 Gramm, die innerhalb von 4 Monaten durch die Biosynthese erneuert werden [1].

Die menschliche Weltbevölkerung erzeugt durch die Biosynthese im Jahr etwa 400'000 Tonnen Häm; diese Menge steht der industriellen Weltjahresproduktion an organischen Farbstoffen kaum nach. Wegen der lebenswichtigen Funktionen des Blutes nimmt die von zahlreichen Enzymen kontrollierte Häm-Biosynthese im Stoffwechsel der Organismen eine zentrale Stellung ein. In Anbetracht seiner vergleichsweise komplizierten Struktur ist es erstaunlich, dass Häm aus zwei sehr einfachen Bausteinen, nämlich aus Glycin (2) und Succinyl-CoA (3) aufgebaut ist [2]. Diese beiden Bausteine kondensieren zur δ -Aminolevulinsäure (4), dem ersten gemeinsamen Vorläufer «aller Pigmente des Lebens». Neben Hämoglobin und Chlorophyll zählt man aber auch Vitamin B₁₂ und Cytochrom C zu den «Pigmenten des Lebens» - eine Bezeichnung, die von *Alan Battersby* kreiert wurde [3-5]. Die Kondensation zweier δ -Aminolevulinsäuren (4) katalysiert durch die Porphobilinogen Synthase ergibt Porphobilinogen (5). Vier Porphobilinogen Moleküle werden mittels zweier weiterer Enzyme - der Porphobilinogen Deaminase und der Uroporphyrinogen III Cosynthase - zum Uroporphyrinogen III (6) verknüpft. Das Uroporphyrinogen III (6) ist der letzte Vorläufer aller biologisch relevanten Tetrapyrrole (Abbildung 1) [4,6-8].

2. DIE PORPHOBILINOGEN SYNTHASE

Die Porphobilinogen Synthase (PBGS; Porphobilinogen Synthetase, δ -Aminolevulinsäure-Dehydratase, δ -Aminolevulinsäure-Dehydrogenase; EC 4.2.1.24) katalysiert die Reaktion zwischen zwei δ -Aminolevulinsäuren (ALA (4)) zu Porphobilinogen (PBG (5)). PBG ist das erste Pyrrol auf dem Weg der Biosynthese der «Pigmente des Lebens». In Abwesenheit des Enzyms reagieren zwei ALA in basischem Milieu zum grössten Teil zu einem symmetrischen Diimin, welches in Anwesenheit von Sauerstoff zum Pyrazin (7) oxidiert wird (Abbildung 2). Zu einem geringeren Prozentsatz entsteht auch das asymmetrische Produkt PBG (5) [9]. Im Laufe der Evolution hat die Natur ein Enzym entwickelt, welches aus ALA ausschliesslich PBG bildet.

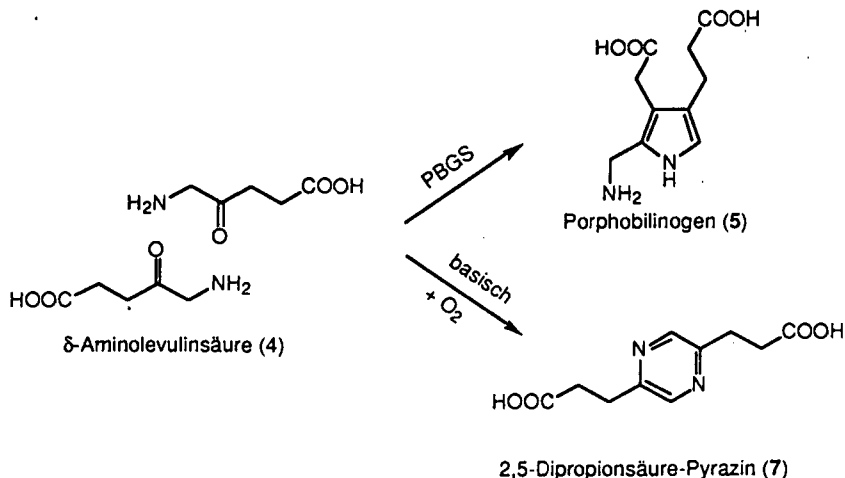


Abbildung 2: Dimersierung der ALA.

Bei der durch die Porphobilinogen Synthase katalysierten Reaktion werden 6 Bindungen gebrochen, aber auch 4 neue geknüpft. Aus diesem Grunde können eine Vielzahl von möglichen Reaktionsfolgen für diese Umwandlung postuliert werden.

Die durch die PBGS katalysierte Reaktion weist formal Ähnlichkeiten mit der Knorr Synthese auf [10].

Sowohl bei der enzymkatalysierten, als auch bei der chemischen Reaktion müssen eine Reihe von Umwandlungen vollzogen werden (Abbildung 3):

- Iminbildung zwischen der Aminofunktion des einen und der Carbonylgruppe des zweiten Moleküls
- Aldolreaktion zwischen der α -Methylengruppe des einen mit der Carbonylgruppe des anderen Moleküls
- Eliminierung insgesamt zweier Wassermoleküle
- Aromatisierung zum Pyrrol

Von diesen vier Reaktionsschritten muss die Aromatisierung zwingend und die Wassereliminierung wahrscheinlich am Ende der Sequenzfolge liegen.

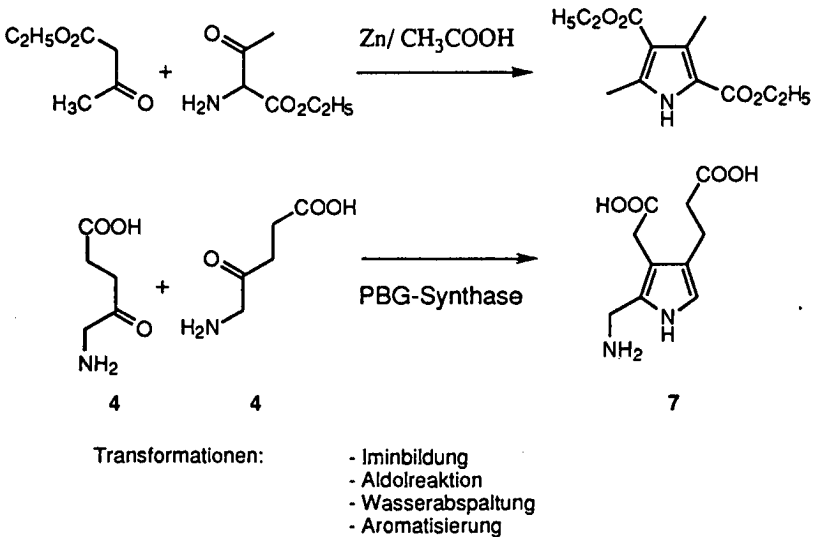


Abbildung 3: Knorr Synthese und Bildung von PBG im Vergleich.

Bei der Knorr Synthese wird postuliert [11], dass zuerst die Iminbildung und anschliessend die Aldolreaktion erfolgt (Abbildung 4). Im Gegensatz zur enzymkatalysierten Reaktion liegt bei der Knorr Synthese ein β -Ketoester vor, und die Enaminbildung kann unter sauren Bedingungen ablaufen [12]. Die beiden vorhandenen Esterfunktionen erfüllen zusätzlich noch folgende Funktionen: Die Esterfunktion des Acetessigsäureesters sorgt für regioselektive Bildung des Enamins bzw. des vinylogenen Carbamats und beide Esterfunktionen stabilisieren das Produkt gegen den Einfluss von starken Säuren. Bei der Synthese von PBG reagieren zwei nicht aktivierte Ketone, und das PBG ist gegen Säureeinfluss äusserst labil [13].

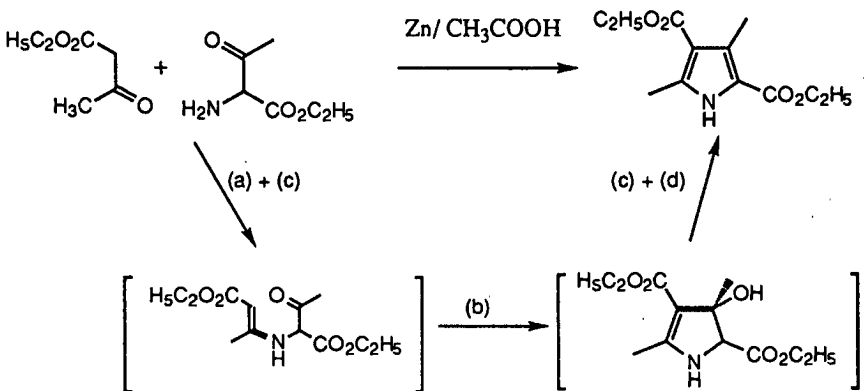


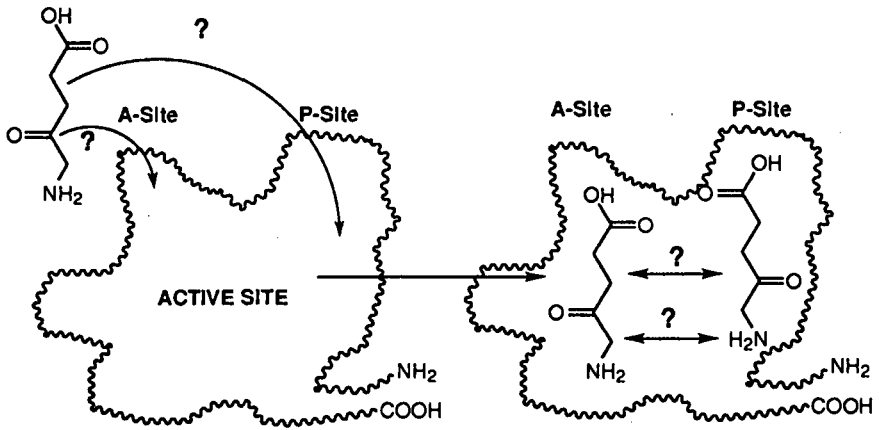
Abbildung 4: Mechanismus der Knorr-Synthese.

Bei der PBGS katalysierten Reaktion sind beide Sequenzfolgen möglich [10]. Da bis anhin keine Sequenzfolge bewiesen werden konnte, ist es nicht erstaunlich, dass mehrere Mechanismen für die Porphobilinogen Synthase zur Diskussion stehen. Im wesentlichen wurden drei verschiedene Mechanismusvorschläge in der Literatur postuliert [10,14-16].

2.1. Vorgeschlagene Mechanismen der PBGS im Vergleich

Die oben beschriebenen Unterschiede zwischen der chemischen Knorr Synthese und der Biosynthese von PBG und die beobachtete Dimerisierung von ALA zum Pyrazin führen zur Frage, ob sich die Selektivität der Biosynthese aus der Sequenz der Transformationen am Enzym erklären lässt. Bei unserer Diskussion konzentrieren wir uns auf die Frage nach der Sequenzfolge: zuerst Aldolreaktion oder Iminbildung. In diesem Zusammenhang ist die Sequenz der Erkennung der beiden Substrate von Bedeutung. Bei der PBGS handelt es sich um ein Zwei-Substrat-Enzym, welches die beiden Substrate unterschiedlich erkennen muss. Wahrscheinlich sind an der aktiven Stelle des Enzyms zwei verschiedene Bindungsstellen (A-Site und P-Site) vorhanden. Damit stellt sich die Frage: Bildet das vom Enzym zuerst erkannte Substrat die Essigsäure- (A-Site) oder die Propionsäureseitenkette (P-Site) am PBG aus? Falls man den detaillierten Ablauf der Reaktionen am Enzym vernachlässigt und sich nur auf die Frage nach der Sequenz der Erkennung und der Sequenzabfolge zwischen Aldolreaktion und Iminbildung konzentriert, können theoretisch vier unterschiedliche Mechanismen postuliert werden (Abbildung 5).

Von den vier möglichen Mechanismen sind nur drei auch postuliert worden. In der nachfolgenden Beschreibung der postulierten Mechanismen werden die Experimente aufgezählt, welche mit dem jeweiligen Mechanismus im Einklang sind.



Erkennung der ersten ALA:

A-Site

P-Site

Sequenz der Transformationen:

Aldolreaktion
Iminbildung

Iminbildung
Aldolreaktion

Iminbildung
Aldolreaktion

Aldolreaktion
Iminbildung

Shemin

nicht postuliert

Jordan I

Jordan II

Abbildung 5: Fragestellungen, die zu verschiedenen Mechanismen führen.

Wenn wir im folgenden von Erkennung sprechen, meinen wir damit die Sequenz der Substratbindung in der Active Site, und wenn wir von Transformationen sprechen, gehen wir auf die Sequenz der am Enzym ablaufenden Reaktionen (Aldolreaktion und Iminbildung) ein.

2.2. Mechanismus nach *Shemin*

Shemin hat im Jahre 1968 einen ersten Mechanismus basierend auf Untersuchungen der PBGS, isoliert aus *Rhodobacter spheroides* [17], aufgestellt: Ein Lysin in der Active Site bildet mit der ALA eine Schiffsbasis aus. Regioselektive Protonenabstraktion führt zu einem Enamin, welches in einer Aldolreaktion nukleophil an die Carbonylgruppe des zweiten ALA angreift. Anschliessende Wasserabspaltung, Ringschluss und Aromatisierung führen zum PBG [14]. Das erste ALA wird in der A-Site erkannt und bildet die Essigsäureseitenkette des PBG aus (Abbildung 6).

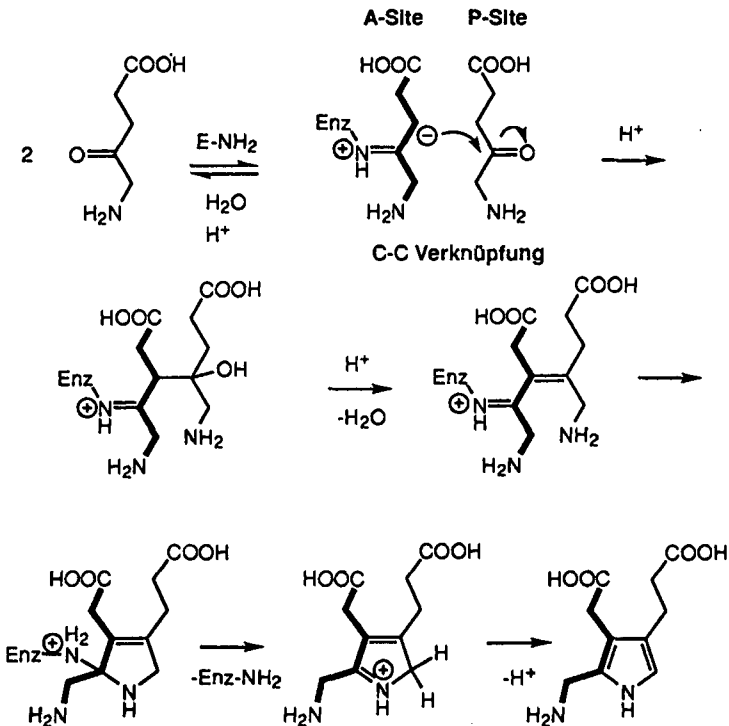


Abbildung 6: Vereinfachter Mechanismus nach *Shemin*.

Beim Aufstellen des Mechanismus ging *Shemin* von folgenden experimentellen Beobachtungen bzw. Arbeitshypothesen aus [14,18]:

Erstens konnte er zeigen, dass die ALA mit dem Enzym eine Schiffsbasis ausbildet. Dazu verwendete er radioaktives Substrat und reduzierte die ausgebildete Schiffsbasis mit NaBH_4 . Nach dieser Reduktion war die PBGS radioaktiv markiert und der Beweis für die Existenz einer Schiffsbasis erbracht.

Zweitens ging er davon aus, dass die kovalente Bindung zum Enzym so lang wie möglich erhalten bleibt.

Drittens glaubte er die Bildung eines Mixed-Pyrrols ausgehend von Levulinsäure und ALA unter der Einwirkung der PBGS zu beobachten. Daraus schloss er, dass das erste Substrat zwangsweise durch die A-Site erkannt werden muss (Abbildung 7).

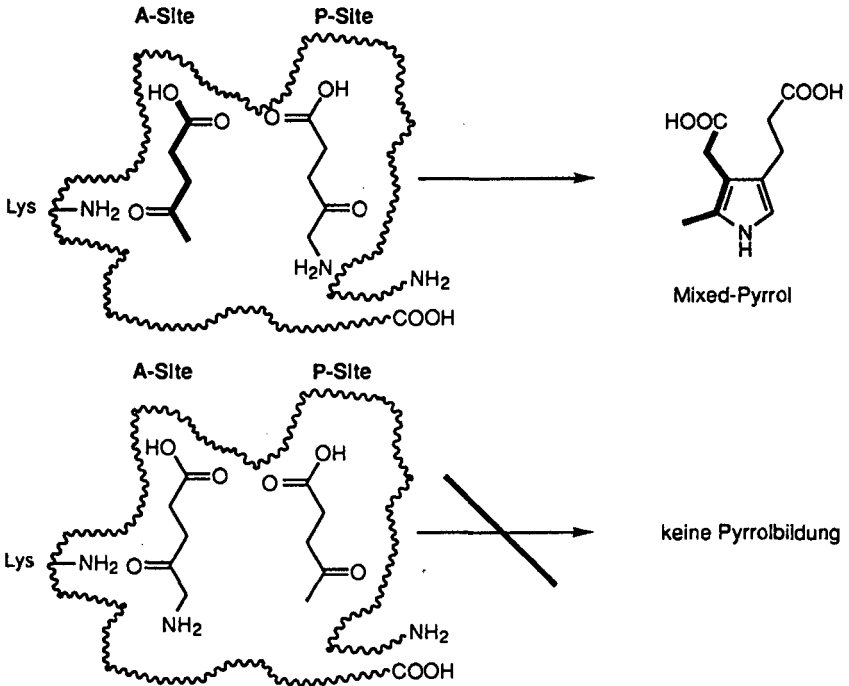


Abbildung 7: Postulierte Bildung des Mixed-Pyrrols.

In unserer Gruppe konnte dieses Mixed-Pyrrol rein synthetisch hergestellt werden [19,20]. Der Vergleich des synthetisch hergestellten Mixed-Pyrrol mit dem aus der Enzymreaktion hergestellten zeigte einen signifikanten Unterschied im Laufverhalten auf der Dünnschichtchromatographie [20,21]. Die Struktur des neuen papierchromatographisch beobachteten Produktes konnte bisher nicht aufgeklärt werden. *Shemin* hat sich also auf eine Hypothese in Bezug auf die Struktur des Mixed-Pyrrols abgestützt, welche sich im Experiment als falsch erwies.

2.3. Mechanismen nach *Jordan*

Jordan hat zwei verschiedene Mechanismen vorgestellt, bei denen die Sequenz der Erkennung der ALA identisch sind, beide gehen davon aus, dass ALA zuerst an die P-Site bindet:

2.3.1. JORDAN I [22]

Gemäss Jordan I bildet die ALA mit dem Enzym in der P-Site eine Schiffsche Base aus. Die freie Aminogruppe dieses Enzym-Substrat Komplexes reagiert nukleophil mit der Carbonylgruppe des zweiten Substrats. Erst jetzt erfolgt die Aldolreaktion, die in diesem Fall den Ring aufbaut. Anschliessende Aromatisierung führt zum PBG (Abbildung 8).

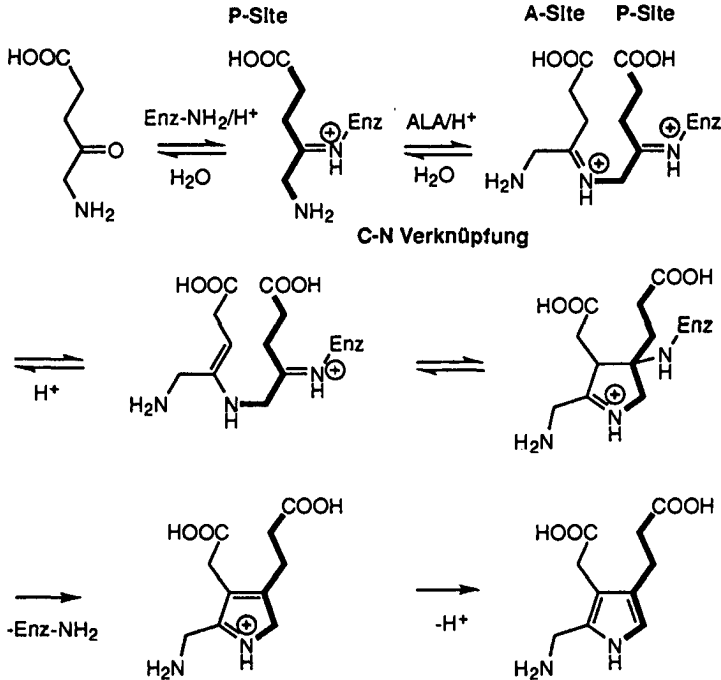


Abbildung 8: Mechanismus nach Jordan I.

2.3.2. JORDAN II [15]

Jordan II hält an einer Erkennung des ersten Substrats in der P-Site fest, stellt aber die Sequenz der Transformationen um (Aldolreaktion zuerst und Iminbildung anschliessend) (Abbildung 9).

Grundlage für die Aufstellung dieser zwei Mechanismen waren die eleganten "puls labeling" Experimente. Mittels dieser Experimente konnte *Jordan* für die menschliche PBGS und die PBGS aus Rinderleber die Sequenz des Einbaus bestimmen [22,23]. Er inkubierte während einer Zeitspanne von 100 ms radioaktives [$5\text{-}^{14}\text{C}$]-ALA mit der PBGS in stöchiometrischen Mengen, setzte dann dem Enzym nicht radioaktives ALA im Überschuss zu und untersuchte den Einbau der Radioaktivität mittels Abbauxperimenten. Die Radioaktivität wurde dabei hauptsächlich in C(2) vom PBG ausgemacht (Abbildung 10). Die daraus folgende Interpretation ist, dass die vom Enzym erst erkannte ALA in der Propionsäureseitenkette des PBG eingebaut wird.

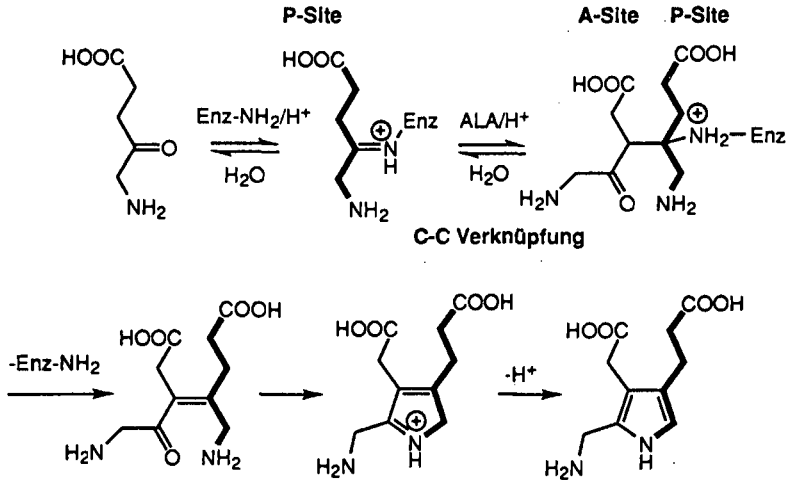
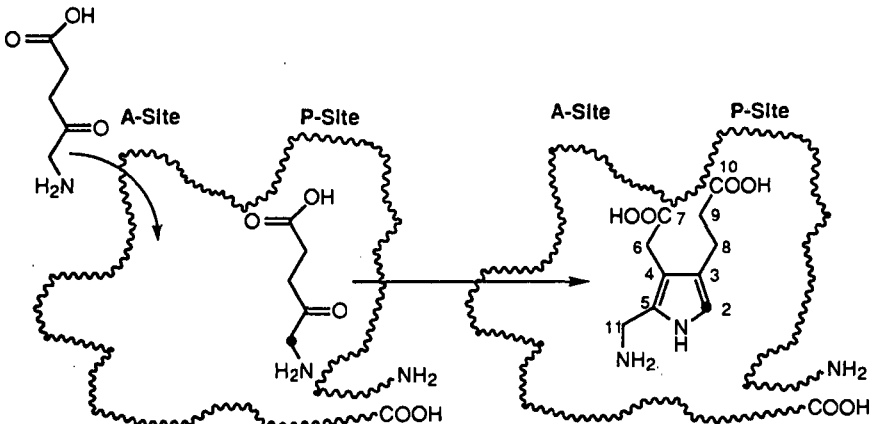


Abbildung 9: Mechanismus nach Jordan II.

Abbildung 10: Puls-labelling Experiment: $[5-^{14}\text{C}]\text{-ALA}$ wurde mit PBGS während 100 ms vorinkubiert ($\ast = ^{14}\text{C}$). (Das Amino- und Carboxylatende des in Abbildung 10 gezeigten Proteinmodells stammt nicht zwingend von der gleichen Untereinheit.)

2.4. Eigenschaften der PBGS

Die Porphobilinogen Synthase ist ein in der Natur sehr verbreitetes Enzym und kann aus Pflanzen, Bakterien und Säugetieren, wie auch aus dem Menschen, isoliert werden [10,20,24-26]. Wir wollen uns an dieser Stelle den aus *Escherichia coli*, *Rhodobacter spheroides* und der aus der Leber des Rindes isolierten Porphobilinogen Synthasen zuwenden. Über die letztere wurden eingehende Studien von verschiedenen Gruppen unternommen [27-34]. Inhibitionsstudien der PBGS von *E. coli* und *R. spheroides* waren in unserer Gruppe in den letzten Jahren von zentralem Interesse [10,20,25].

Die Porphobilinogen Synthase ist ein Octamer, welches aus acht identischen Untereinheiten besteht. Jeweils zwei solche Untereinheiten bilden als Dimer eine aktive Einheit [10]. Bei der Porphobilinogen Synthase handelt es sich in den meisten Fällen um ein Metalloenzym. Die Aktivität der PBGS wird durch die Anwesenheit von Metallen aber auch durch den pH beeinflusst (Tabelle 1) [10].

Die Sequenzierung und Klonierung von cDNA der PBGS erlaubte es, die Primärstrukturen zu bestimmen und zu vergleichen. Dieser Vergleich zeigt, dass die PBGS untereinander sehr ähnlich sind [16,30,35]. Die PBGS der *Escherichia coli* beispielsweise ist zu 36 % mit der PBGS der Hefe, zu je 40 % mit der PBGS der Menschen- und der Rattenleber homolog. Ein Lysin in der Active Site ist bei den meisten PBGS konserviert. Durch den systematischen Vergleich der Primärstrukturen konnten homologe Abschnitte bestimmt werden, die für die Bindung der Metalle verantwortlich sind.

Da bis anhin noch keine hochauflösende Röntgenstrukturanalysen der PBGS zugänglich sind, hat man keine Informationen über die Sekundär- und Tertiärstruktur. Doch die Quarternärstruktur ist für die meisten PBGS geklärt. Für die aus der Rinderleber isolierte Porphobilinogen Synthase wurde die octamere Struktur durch Beobachtung von Kristallen im Elektronenmikroskop schon 1974 erkannt [33] und konnte kürzlich durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden [36]. Die PBGS aus *Escherichia coli* und *Rhodobacter spheroides* konnte mittels Gelfiltration als Octamer identifiziert werden, wobei das letztere auch als Hexamer vorliegen könnte [37,38].

	Molekulargewicht	Molekulargewicht einer Untereinheit	Metalle	pH-Optimum	Primärstruktur
Rinderleber	290'000	35'000	Zn ²⁺	6.8	+
<i>Escherichia coli</i> K12	270'000	36'000	Zn ²⁺ und Mg ²⁺	8.5 (7.7)	+
<i>Rhodobacter spheroides</i>	250'000	39'500	K ⁺	8.5	+(nicht publiziert)[39]

Tabelle 1: PBGS isoliert aus Rinderleber, *E. coli* und *R. spheroides* im Vergleich.

2.5. Die Rolle der Metalle als Kofaktoren

Die Notwendigkeit der Metalle wurde parallel mit der Isolation der PBGS aus der Rinderleber und den menschlichen Erythrocyten untersucht. Nur ein Zink ist gebunden pro Monomer, insgesamt acht pro Octamer. Während man sich über die Anzahl der Zinkatome einig ist, die an der PBGS gebunden sind, gehen die Meinungen über die Funktion der Metalle auseinander [15]:

Tsukamoto postuliert, dass Zink nicht essentiell für die Aktivität der PBGS der Rinderleber ist. Wird nach dem Entfernen der Zinkatome das Apoenzym unter streng anaeroben Bedingungen gehalten, wird kein Verlust der Aktivität beobachtet [27].

Dent konnte mit EXAFS-Studien (Extended X-ray Absorption Fine Structure) der Rinderleber Porphobilinogen Synthase zwei unterschiedliche Bindungsstellen (Site A und Site B) für Zinkatome identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Site A eine höhere Affinität für Zink-Atome als die Site B hat, welche hingegen reich an Cystein ist. Mit der Besetzung der Site A

durch Zinkatome kann volle Aktivität der PBGS erreicht werden. Daraus postuliert er, dass das Zn(II) der A-Site wahrscheinlich in unmittelbarer Nähe der Active Site gelegen ist [30].

Jaffe korreliert ihre Studien über die Aktivität der PBGS in Abhängigkeit des pH und der Anwesenheit verschiedener divalenter Metalle (II) mit den Daten von *Dent* und schlägt vor, dass Zn_B mit 4 Cysteinen tetrahedral koordiniert ist, wogegen Zn_A fünf Liganden aufweist, allerdings nur bei einem dieser Liganden handelt es sich um Cystein (Abbildung 11). Dem Zn_A kommt bei der enzymatischen Reaktion eine zentrale Rolle zu. Zn_A könnte als Lewis-Säure die Carbonylbindung der A-Side ALA polarisieren, so dass einerseits der nukleophile Angriff der Aminogruppe der P-Side ALA erleichtert würde (Mechanismus nach Jordan I), oder dass die Enolisierung in C3 Position der A site ALA begünstigt wird (Mechanismus nach Jordan II) [40].

In Abwesenheit des Zn_B würden die Cysteine zu Disulfid-Brücken oxidiert. *Jaffe* schlug vor, dass das Proton, welches während der Enzymreaktion stereoselektiv [41] von der C5-Position der P-Side ALA abstrahiert wird, von der Thiolgruppe des reduzierten Cystein aufgenommen wird und so ins Lösungsmittel gelangt. Die Rolle des Zn_B beschränkt sich darauf, das Cystein in seiner reduzierten Form zu halten. Dieser Vorschlag ist nicht abgesichert, da nicht bekannt ist, wie basisch die mit dem Zn(II) komplexierten Cysteine sind. Andererseits ist auch zu bedenken, dass die Aromatisierung zum PBG eine treibende Kraft darstellt, und dabei wird die Protonenabstraktion wahrscheinlich durchaus ohne Hilfe einer zusätzlichen basischen Stelle geschehen. Die Funktion des Cysteins ist also nicht die einer eigentlichen Base, sondern das Cystein nimmt das wahrscheinlich spontan abstrahierte Proton nur auf, um es aus der Active Site ins Lösungsmittel zu bringen [39].

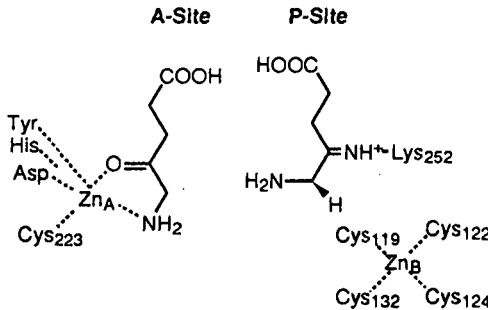


Abbildung 11: Mögliche Rolle der Zn(II)-Atome bei der enzymatischen Reaktion nach *Jaffe*, gezeigt an der PBGS aus der Rinderleber.

Diese Überlegungen bezüglich der Rolle von Zn_B können auf ein Protein (Ada Protein aus *Escherichia coli*) abgestützt werden, welches die Aufgabe hat, die Methylgruppe des Methylphosphorsäuretriesters der DNA zu abstrahieren. Dieses Reparaturprotein besitzt ein Zinkfingermotiv, dessen Sequenz vier Cysteine beinhaltet. Dabei wird für das Cys 69 des Ada Proteins vorgeschlagen, dass es als Nukleophil die Methylgruppe des Methylphosphorsäuretriesters abstrahiert (Abbildung 12) [42,43].

Eingehende Studien bezüglich der Notwendigkeit der Metalle bei den Bakterien wurden anhand der PBGS von *Escherichia coli* vorgenommen. Bei *E. coli* müssen neben Zn(II)- auch Mg(II)-Ionen zur maximalen Aktivität zur Verfügung stehen. Mg(II)-Ionen sind für die Aktivität des Enzyms nicht notwendig, das heisst sie sind wahrscheinlich nicht in der Active Site anzutreffen und kommen mit dem Substrat nicht in Berührung. *Jaffe* postulierte, dass die Mg(II) Ionen einen allosterischen Effekt ausüben und für den Erhalt der octameren Quarternärstruktur verantwortlich sind [44].

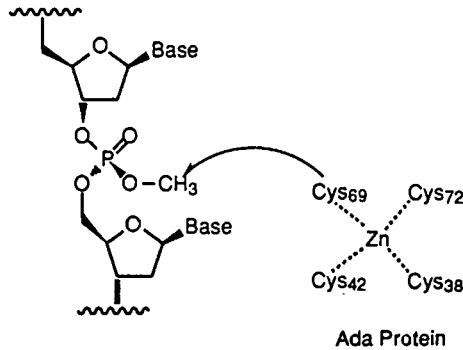


Abbildung 12: Methylabstraktion durch Cys 69 des Ada Proteins aus *Escherichia coli*.

Bei der PBGS isoliert aus *Rhodobacter spheroides* ist die Rolle der Metalle nicht vollständig geklärt. *Shemin* konnte in Untersuchungen zeigen, dass eine Assoziierung der octameren Grundstruktur zu Dimeren und Trimeren in Anwesenheit von K^+ -Ionen favorisiert wird. In Anwesenheit von Na^+ und Mg^{2+} Ionen konnte diese Assoziierung nicht beobachtet werden. Die maximale Aktivität wurde mit Kalium erreicht. Ersatz des K^+ -Ions durch Na^+ und Mg^{2+} -Ionen führte zu einem Verlust der Aktivität von 50% resp. 20% [17,45].

2.5.1. Einteilung der Porphobilinogen Synthase

Ein erster Vorschlag zur Einteilung der Porphobilinogen Synthase basiert auf der Inhibition mit EDTA. In Analogie zu den Aldolasen, welche als Metalloenzyme und Nicht-Metalloenzyme existieren, schlug *Shemin* zwei Klassen vor. Der einen Gruppe gehört beispielsweise die PBGS von *Rhodobacter spheroides* an, welche als Kofaktor K^+ hat und deshalb keine Inhibition mit EDTA zeigt. In die zweite grössere Gruppe gehören die PBGS der Spezies, welche divalente Kationen wie Mg^{2+} und Zn^{2+} als Kofaktoren enthalten. Diese Kationen bilden mit EDTA Komplexe aus, wobei das Enzym an Aktivität verliert.

Eine umfassendere Einteilung aufgrund der Metallionen, die als Kofaktoren dienen, wurde von *Jaffe* vorgenommen. Neben Untersuchungen der Aktivität als Funktion der Metallionen und der pH-Abhängigkeit, wurden Primärstrukturen der Abschnitte, die für die Metallbindungen verantwortlich sind, untersucht. Bei der PBGS der Rinderleber wurden zwei Regionen, die sich zur Bindung von $Zn(II)$ eignen, gefunden. Bei der PBGS von *E. coli* wurde eine zusätzliche Bindungsregion für $Mg(II)$ geortet [44]. Diese Resultate und Beobachtungen veranlassten *Jaffe* die Porphobilinogen Synthase in vier Gruppen einzuteilen (Tabelle 2) [16,46].

Klasse	Beispiel	Site A	Site B	Site C
I	Säugetiere	4 Zn (II)	4 Zn (II)	—
II	<i>Escherichia coli</i>	4 Zn (II)	4 Zn (II)	8 Mg (II)
III	Pflanzen	4 Mg (II)	4 Mg (II)	8 Mg (II)
IV	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	4 Mg (II)	—	8 Mg (II)

Tabelle 2: Einteilung der PBGS nach *Jaffe*.

Sie postulierte, dass die PBGS aus verschiedenen Spezies bis zu drei verschiedene Erkennungsstellen für Metallkationen aufweisen. Die Erkennungsstellen werden als Site A, Site B und Site C bezeichnet, denen verschiedene Funktionen zugesprochen werden. Es sei bemerkt, dass die PBGS isoliert aus *Rhodobacter spheroides* in diese Einteilung nicht aufgenommen wurde.

2.6. Inhibitionsstudien

Obwohl die Porphobilinogen Synthase ein weit verbreitetes und in der Biosynthese der «Pigmente des Lebens» wichtiges Enzym ist, sind erstaunlich wenig Inhibitionsstudien der PBGS in der Literatur zu finden. Abgesehen von Arbeiten von *Scott, Leeper* und *Jordan* [47] und der Dissertation von *Rainer Löönd* [20], die in unserer Gruppe angefertigt wurde, ist uns keine systematische Abhandlung von potentiellen Inhibitoren bekannt. *R. Löönd* hatte eine Reihe von Substrat-, Zwischenprodukt- und Produktanaloga als Inhibitoren der Porphobilinogen Synthase aus *Rhodobacter spheroides* getestet [20]. Auf die Resultate dieser Studie kommen wir im Rahmen dieser Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt noch zu sprechen.

Shemin hat als erster die Inhibition von Substratanaloga auf PBGS von *Rhodobacter spheroides* getestet. Dabei hat er gezeigt, dass es sich bei Levulinsäure (8) um den mit Abstand besten Inhibitor handelt. Der korrespondierende Ethylester (9) dieser Säure wird vom Enzym nicht mehr erkannt. Das Weglassen bzw. die Variation der Position der Carbonylgruppe führten im Vergleich zur Levulinsäure (8) zu wesentlich schlechteren Inhibitoren. Diese Resultate zeigen die Notwendigkeit der Carbonylgruppe in Position 4 und unterstützten seine Aussage der Ausbildung einer Schiffischen Base zwischen Enzym und Substrat [14].

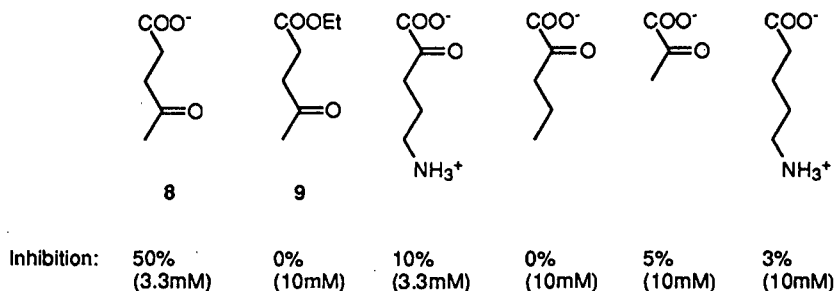


Abbildung 13: Erste Inhibitionsstudien nach *Shemin*.

Die Hemmung der Porphobilinogen Synthase durch 5-Chlorolevulinsäure wurde in der Literatur ausführlich besprochen [34,48]. 5-Chlorolevulinsäure ist ein irreversibler Inhibitor, der gemäss *Jaffe* mit der Thiolgruppe des Cystein 223 kovalent an die PBGS der Rinderleber bindet (siehe auch Abbildung 11). Untersuchungen, welche in unserer Gruppe durchgeführt wurden, zeigten, dass 5-Chlorolevulinsäure in Abwesenheit der PBGS oberhalb eines pH von 6 partiell hydrolysiert.

4,6-Dioxoheptansäure (10) ist als sehr guter Inhibitor in der Literatur erwähnt ($K_i = 400\mu\text{M}$) [49-51]. Die chemischen Kopplungsprodukte zwischen 4,6-Dioxoheptansäure (10) und ALA (4) führen zu 4 verschiedenen Pyrrolen (Abbildung 14) [52,53]. 11 wurde als der noch effizientere Inhibitor als 4,6-Dioxoheptansäure (10) postuliert ($K_i = 5\mu\text{M}$) [51].

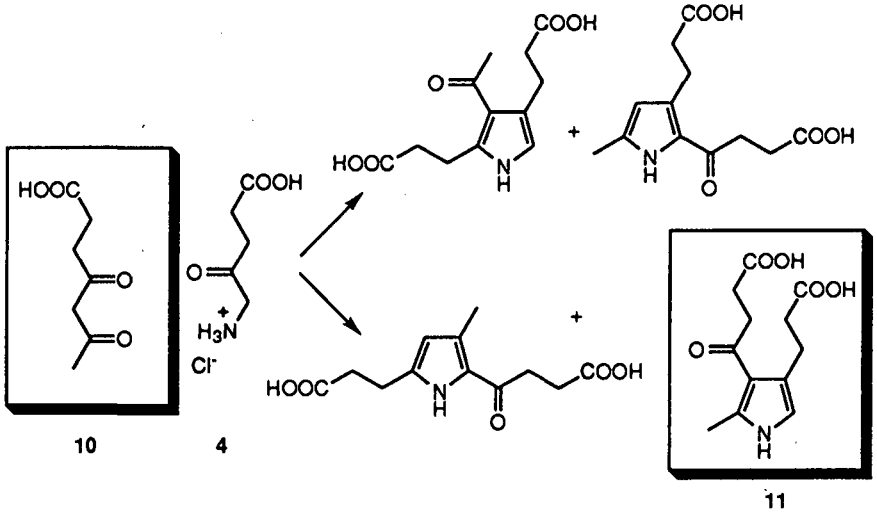


Abbildung 14: Pyrrole aus Dimerisationsprodukt zwischen ALA und 4,6-Dioxoheptansäure.

Abgesehen von 11 ist kein anderes Produktanalog als Inhibitor der PBGS bekannt. Das natürliche Enzymprodukt PBG hingegen soll das Enzym bei einer Konzentration von 2mM zu 50% hemmen [15].

3. BISHERIGE ARBEITEN IN UNSERER GRUPPE

Um einen Einblick in den Reaktionsmechanismus der Porphobilinogen Synthase zu gewinnen, stehen einem prinzipiell verschiedene Methoden offen. Zu diesen Methoden gehören neben Röntgenstrukturanalyse, Detektion von Zwischenprodukten, Markierungsexperimenten, chemischer Modifizierung des Enzyms und Mutagenese aber auch Inhibitionsstudien und Entwicklung einer biomimetischen Reaktion. Wir haben uns in unserer Gruppe auf die Entwicklung einer biomimetischen Reaktion basierend auf dem Mechanismus von *Shemin* und die Synthese von potentiellen Substrat-, Zwischenprodukt- und Produktanaloga und deren Inhibitionsstudien der PBGS konzentriert.

3.1. Inhibitionsstudien der PBGS aus *Rhodobacter spheroides*

Rainer Lüönd hat sich in seiner Dissertation neben den Inhibitionsstudien von Zwischenprodukt- und Produktanaloga mit den Studien von Substratanaloga beschäftigt. Durch diese Resultate haben wir ein klares Bild über die Active Site der Porphobilinogen Synthase aus *Rhodobacter spheroides* erhalten. In Abbildung 15 wird das natürliche Substrat in der Active Site der PBGS gemäss der Modellvorstellung basierend auf den Resultaten von *Rainer Lüönd* gezeigt: Die Säurefunktion muss durch eine positive Ladung erkannt werden, beispielsweise eine Erkennung durch ein Guanidiniumion eines Arginins mittels Wasserstoffbrücken wäre denkbar. Ein Proton der Aminofunktion der ALA könnte mit einer Carboxylgruppe eines Aspartats oder Glutamats eine Wasserstoffbrücke ausbilden [20,25].

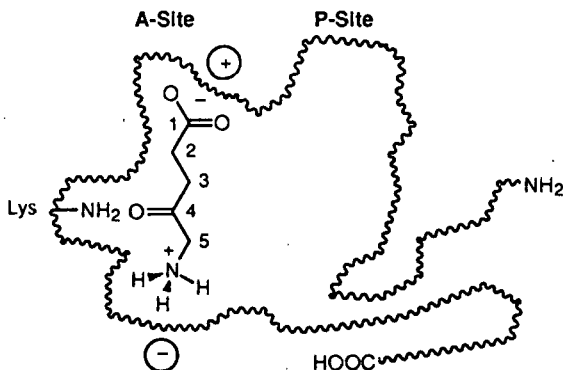


Abbildung 15: Modell der Active Site der PBGS.

Es wurden Zwischenproduktanaloga des Mechanismus nach *Shemin* synthetisiert und auf der PBGS von *Rhodobacter spheroides* in Inhibitionsstudien getestet [19,20]. Dabei wurden die Zwischenproduktanaloga im Vergleich zum vorgeschlagenen Zwischenprodukt leicht modifiziert. Die Aminofunktionen wurden weggelassen und anstelle einer Hydroxygruppe wurde eine Methoxygruppe eingeführt (Abbildung 16). Diese Modifikationen verhindern die Bildung eines Pyrazins oder Pyrrols, als auch eine Retroaldolreaktion und Lactonbildung.

Die beiden Diastereoisomeren 12 und 13 wurden als Racemat getestet. Dabei konnte klar gezeigt werden, dass die PBGS fähig ist, zwischen diesen beiden Diastereoisomeren zu unterscheiden. Racemat 13, bei dem die Ketten, welche die Säurefunktionen tragen, unlike stehen, wird dabei von der PBGS um einen Faktor 2 besser erkannt als Racemat 12. Daraus folgt, dass die PBGS fähig ist, spezifisch zwischen diesen beiden Racematpaaren zu unterscheiden. Man darf aber nicht ausser acht lassen, dass eines der beiden Enantiomere des rac

13 keine Inhibition zeigen könnte. In diesem Fall würde das andere Enantiomer mit einem K_i von ca. 5'000 μM einen respektablen Inhibitor darstellen. Bestrebungen zur Auftrennung des Racemats in seine Enantiomere sind zur Zeit in unserer Gruppe im Gange [54]. Dieses Inhibitionsresultat unterstützt den von *Shemin* unterstützten Enzymmechanismus, bei dem ein C-C verknüpftes Zwischenprodukt postuliert wird.

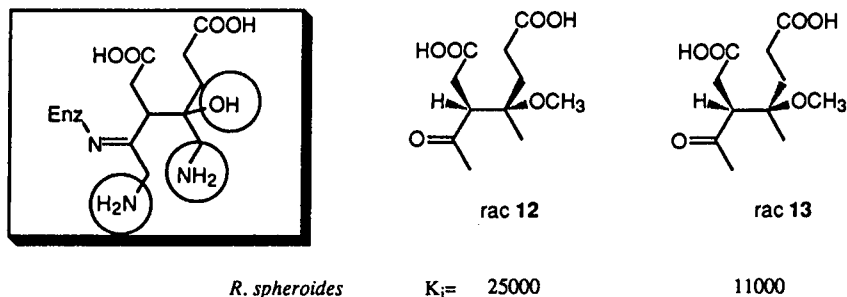


Abbildung 16.

3.2. Biomimetische Betrachtung

Die biomimetische Chemie ist der Versuch, in der Natur ablaufende (enzymatische) Reaktionen mit Hilfe der organischen Chemie zu imitieren und zu erklären [55,56]. In unserer Gruppe haben wir uns während mehreren Jahren darauf konzentriert, den *Shemin*'schen Mechanismus rein chemisch zu imitieren.

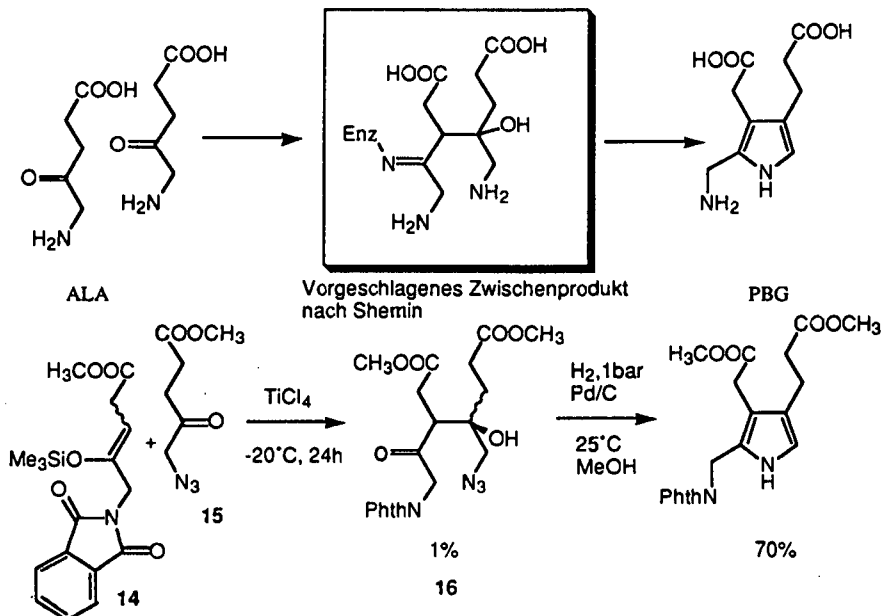


Abbildung 17: Biomimetische Reaktion nach A.Chaperon im Vergleich mit der PBGS.

Parallel zur vorliegenden Arbeit konnte A. *Chaperon* in seiner Dissertation die Kondensation von Substratanaloga **14** und **15** mittels einer gekreuzten Aldolkondensation unter *Mukaiyama* Bedingungen durchführen (Abbildung 17) [57]. Das dabei erhaltene Produkt kommt dem im Mechanismus von *Shemin* vorgeschlagenen Zwischenprodukt strukturell sehr nahe. Das weit wichtigere Resultat ist aber, dass nach Reduktion der Azidogruppe von **16** zum Amin der Ringschluss und die Aromatisierung zum geschützten PBG spontan abläuft. Dies bedeutet, dass die Reaktionen nach der Aldolreaktion kinetisch schnell und thermodynamisch begünstigt sind.

3.3. Die Porphobilinogen Synthase eine Aldolase?

Trotz der intensiven Untersuchungen und experimentellen Daten, die über die PBGS gesammelt wurden, sind die Einzelheiten des Mechanismus auch heute noch völlig unklar. Falls man sich bei der Analyse des Mechanismus auf die Reaktion konzentriert, die die beiden Substrate miteinander verknüpft, kann die PBGS entweder als Aldolase angesehen werden (Mechanismus nach *Shemin* oder Jordan II), oder es ist ein Enzym, dessen primäre Aufgabe die Bildung eines Imins zwischen den beiden Substraten ist (Jordan I). Schon sehr früh wurde von *Shemin* erwähnt, dass die PBGS eigentlich als Aldolase angesehen werden kann [18,58].

Die Aldolasen katalysieren die Kondensation von Dihydroxyacetonphosphat (**17**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (**18**) zu Fructose-1,6-bisphosphat (**19**) [59,60]. Es wird im allgemeinen zwischen zwei Klassen von Aldolasen unterschieden: Klasse I und Klasse II (Abbildung 18) [61]. Die Aldolasen der Klasse II aktivieren die Carbonylgruppe des Dihydroxyacetonphosphats mittels Metallionen, die als Lewis Säuren auftreten. Die Aldolasen der Klasse I hingegen bilden mittels eines Lysins mit dem Dihydroxyacetonphosphat eine Schiffsche Base aus.

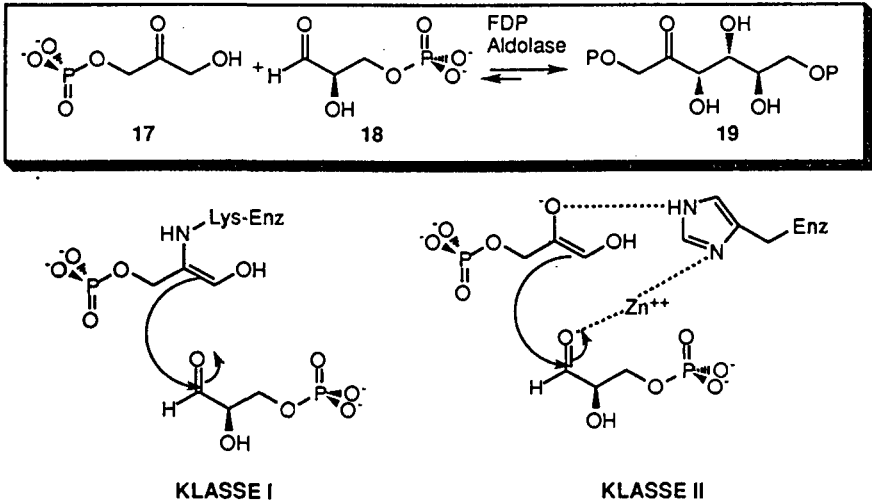


Abbildung 18: Aldolasen der Klasse I und der Klasse II.

Die Porphobilinogen Synthase kann als Aldolase der Klasse I angesehen werden, falls der kinetisch langsame Schritt die Ausbildung der C-C Verknüpfung ist. Die Reaktionen, welche nach der Aldolreaktion folgen, könnten thermodynamisch spontan ohne Hilfe des Enzyms ablaufen. So ist aus der Sicht der Evolution vorstellbar, dass der direkte Vorläufer der Porphobilinogen Synthase eine reine Aldolase gewesen wäre.

4. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELE DIESER ARBEIT

Unsere Gruppe beschäftigt sich schon längere Zeit mit der Porphobilinogen Synthase. Das Ziel des Projektes ist die Aufklärung des Mechanismus dieses Enzyms. Biomimetische Studien und Inhibitionsstudien mit *Rhodobacter spheroides* ergaben Hinweise auf den Mechanismus.

Zur Weiterführung und Vertiefung der Inhibitionsstudien sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Punkte untersucht werden:

- a) Aufzucht von *Escherichia coli* CR 261
- b) Exprimieren der Porphobilinogen Synthase
- c) Isolation und Charakterisierung der Porphobilinogen Synthase
- d) Inhibitionsstudien mit Substrat-, Zwischenprodukt- und Produktanaloga

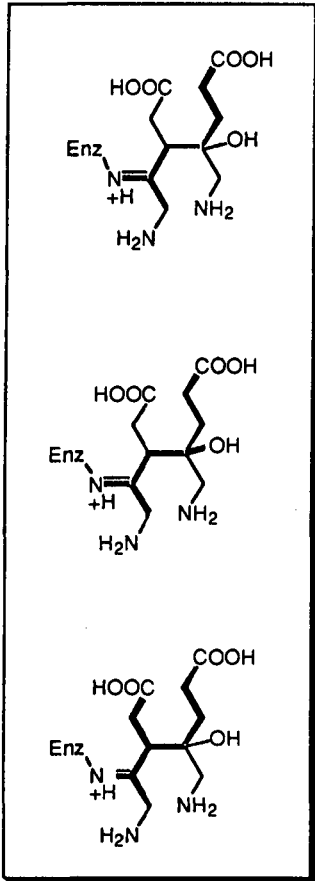
Inhibitionsstudien der Substratanaloga, welche von *Rainer Lüönd* auf der Porphobilinogen Synthase aus *Rhodobacter spheroides* durchgeführt wurden [20,25], sollten auf der PBGS aus *Escherichia coli* wiederholt werden, um Vergleiche zwischen diesen beiden Spezies ziehen zu können.

In zeitlich parallel ablaufenden Dissertationen haben *Thomas Engeloch* und *Maurus Marty* Zwischenproduktanaloga synthetisiert [52,62], welche auf dem von *Shemin* vorgeschlagenen Mechanismus basieren (Abbildung 18).

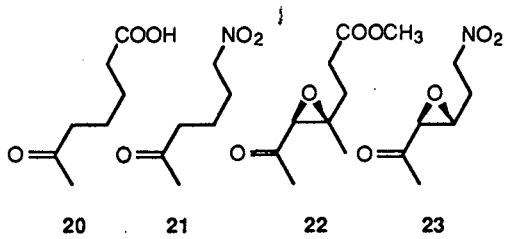
Die Moleküle **20-23** versuchen das vorgeschlagene Zwischenprodukt von *Shemin* zu imitieren. Im Gegensatz zu den Dicarbonsäuren *rac 12* und *rac 13*, weist **20** nur noch eine Säuregruppe auf und verliert nach unseren Vorstellungen eine Erkennungsgruppe innerhalb der Active Site. Von den enantiomerenreinen Epoxiden erhoffte man sich durch die konformationellen Einschränkungen unterschiedliche K_i 's oder unter Öffnung des Epoxids eine Ausbildung einer irreversiblen Bindung innerhalb der Active Site.

Besonders interessierten wir uns für die 4,6-Dioxoheptansäure (**10**) und deren Ester **24**. 4,6-Dioxoheptansäure (**10**) ist ein anormales Abbauprodukt von Tyrosin und deshalb der Auslöser von Tyrosinämie [63], basierend auf der Inhibition der PBGS [64]. **10** ist in der Literatur als guter kompetitiver Inhibitor bekannt [49-51]. Dazu kommen **10** und **24** dem Zwischenprodukt, welches von *Shemin* vorgeschlagen wurde, sehr nahe (Abbildung 18).

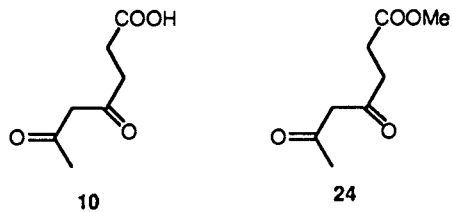
Es ist von grossem Interesse zu wissen, an welcher Stelle die einzelnen Inhibitoren am Enzym intervenieren. Mit diesen Kenntnissen könnte man die Inhibitoren in verschiedene Klassen einteilen. Deshalb wollten wir uns in einer letzten Phase dieser Arbeit auf die chemische Modifikation der PBGS konzentrieren. Eine Auswahl von Inhibitoren sollten nach Ausbildung der Schiffischen Base mit NaBH_4 zum Amin reduziert und anschliessend mit Massenspektrometrie analysiert werden.



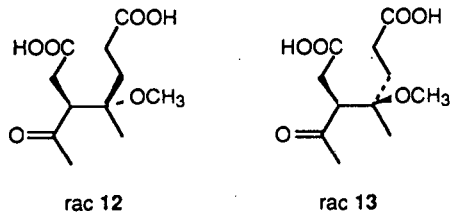
Zwischenprodukt nach *Shemin*



Maurus Marty, 1995



Thomas Engeloch



Hugo Bertschy und Rainer Lüönd, 1991

Abbildung 18: Potentielle Zwischenproduktanaloga, in unserer Gruppe synthetisiert.

Falls die Epoxide (**22** und **23**) sich als irreversible Inhibitoren erweisen sollten, wäre es von Bedeutung zu wissen, ob **22** (bzw. **23**) innerhalb oder ausserhalb der Active Site interveniert, welche Aminosäuren (Cystein, Aspartat oder Glutamat) für die Öffnung der Epoxide verantwortlich sind, ob die Ausbildung des neuen Enzym-Substrat-Komplexes innerhalb der gleichen Untereinheit erfolgt, oder ob eine Quervernetzung über zwei Untereinheiten beobachtet wird. Diese Fragen könnten einerseits mit SDS-Elektrophorese oder/und Massenspektrometrie beobachtet werden.

5. MIKROBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE ARBEITEN

5.1. Stammhaltung und Aufzucht der *E. coli* CR 261

Sämtliche mikrobiologische Arbeiten mit *Escherichia coli* CR 261 wurden auf einem mit Ampicilin versehenen LB-(Luria-Bertani)-Medium durchgeführt. Die Bakterien enthalten das Plasmid pUC 19 [65] und somit das *E. coli* hemb Gen [66].

Wir haben von *Ch. Roessner* mit *Escherichia coli* CR 261 getränkte Filterpapiere erhalten. Ausgehend von diesen Filterpapieren wurde die Stammhaltung wie folgt gesichert:

Ein Filterpapier wurde auf Agarmedium (LB + Ampicilin (60 µg/ml)) ausgelegt und bei 37°C während 24 Stunden inkubiert.

Die so entstandenen Bakterienkolonien wurden in regelmässigen Abständen von 2-3 Wochen auf ein neues Agarmedium transferiert und inkubiert (15 Stunden, 37 °C).

Parallel wurde eine Kolonie in einer Vorkultur (100 ml LB + 752 µg Ampicilin) während ca. 13 Stunden herangezogen, anschliessend mit 15 % Glycerin versehen, auf mehrere 1.5 ml Eppendorftuben aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Der gesamte, mit *Escherichia coli* CR 261 für die Aufzucht durchgeführte Arbeitsprozess lässt sich folgendermassen zusammenfassen:

Anwachsen der *E. coli*, ausgehend von einer Kolonie des Agarmediums, auf einem Rotationsschüttler (230 rpm, 37°C) in einer Vorkultur (100 ml LB + 752 µg Ampicilin) bis zur exponentiellen Wachstumsphase.

Ausgehend von 15 ml bzw. 100 ml Vorkultur wird die Hauptkultur bei 37° C in einem 2 l (1.7 l LB + 75 µg Ampicilin) bzw. 10 l (9 l LB + 450 mg Ampicilin) Fermenter durchgeführt.

Die Aufzucht und die Produktion der PBGS wurden in einem 2 l Fermenter optimiert. Nach erfolgter Optimierung wurde die Hauptproduktion in einem 10 l Fermenter durchgeführt.

Die Aufzucht der Bakterien auf einem Rotationsschüttler wurde mit der im Fermenter verglichen.

5.1.1. Vorversuche zur Aufzucht in einem 2 l Fermenter

Die Aufzucht der *Escherichia coli* CR 261 erfolgte im Rahmen dieser Arbeit 18 mal. Bei den ersten 6 Kulturen wurde ein alter Bakterienstamm verwendet. Ab der 7. Kultur stand uns ein neuer Stamm zur Verfügung (Tabelle 3).

Die Vorkultur (1 Kolonie *E. coli* CR 261 + 100 ml LB + 752 µg Ampicilin) wurde in einem 500 ml Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler (230 rpm, 37°C) durchgeführt. Bei erfolgreichem Exprimieren der PBGS dauerte die Aufzucht der Bakterien während der Vorkultur zwischen 7.5 und 13 Stunden und anschliessend während der Hauptkultur im 2 l Fermenter (15 ml Vorkultur + 1.7 l LB + 75 µg Ampicilin) 21 bis 25 Stunden und erfolgte bei 37°C. Die Bakterienmasse wurde mittels Absorption bei 600 nm quantifiziert. (Wurde dabei ein Absorptionswert, der grösser als 0.3 war, gemessen, wurde die Probe verdünnt.) Nach vollendeter Fermentation bei einer Rührgeschwindigkeit von 200 rpm wurde eine Absorption zwischen 2.3 und 2.9 beobachtet. Wie unten abgebildet (Abbildung 19) tritt die Hauptkultur nach ca. 5 Stunden in die exponentielle Wachstumsphase und erreicht nach weiteren 7 Stunden die stationäre Phase.

Kultur Nr.	Dauer Vorkultur [h]	Kulturmedium [l]	Rührgeschwindigkeit [rpm]	Dauer Hauptkultur [h]	Absorption final	Zellfeuchtmasse	Spezifische Aktivität
1	19	1.5		22.33	31	23.36	0.04
2	17.25	1.5		23.25	21	35.4	0.083
3	7	1.5	200	22.9	1.6	10.4	0.11
4	17	1.7	200	33.75	12	27.5	0.059
5	14	1.8	400	56	128	40	0.022
6	13	1.8	420	11.75	4.5	29.7	0.041
7	ca. 13	1.8	420	25.33	12	37.1	18.73
8	16	1.7	410	23.6	4.42	18.4	0.071
9	ca. 14	1.7	410	24	3.78	20.2	0.083
10	15	1.7	410-510	24.75	3.51	11.8	0.054
11	8.75	1.7	250	17.1	2	15	2
12	10.3	1.7	200	23.6	2.32	12.5	22.6
13	10.8	1.7	200	24.6	2.9	13.3	19.7
14	10.25	1.7	200	24	2.75	13.7	4.28
15	9	1.7	400-200	22	2.26	20.5	0.08
16	8	1.7	200	23.5	3.6	16.3	0.02
17	7.5*	1.7	200	21.4	2.6	13.6	22.1
18	8.16*	1.7	200	20.2	1.8	12.7	8.65

Tabelle 3: Übersicht über die durchgeführten Kulturen im 2l Fermenter. * Inokulation der Vorkultur genau in der exponentiellen Wachstumsphase.

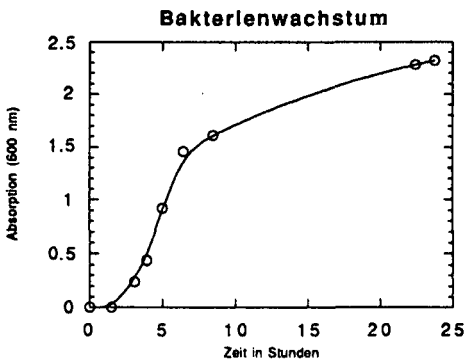


Abbildung 19: Bakterienwachstum während dem Verlauf einer Kultur im 2l Fermenter.

Gemäss *Ch. Roessner* findet die Überproduktion der PBGS in der stationären Phase statt [67]. Wir untersuchten einzelne Proben im Verlaufe der Fermentation der Kultur 12 diesbezüglich auf den Gehalt an PBGS. Die Proben wurden eingefroren und anschliessend wieder aufgetaut. 3 ml der einzelnen Proben wurden mit 2.7 mg Lysozym während 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschliessender Zentrifugation wurde der Überstand auf Aktivität getestet. Wesentliche Enzymaktivität konnte erst nach 7 Stunden nachgewiesen werden (Abbildung 20).

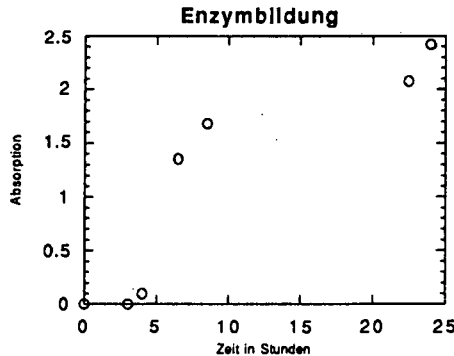


Abbildung 20: Enzymbildung gezeigt an der Absorption der aufgeschlossenen Proben mit Ehrlichreagenz bei 554 nm im Verlauf der 12. Kultur.
(Vorinkubation (30 Minuten): 50 µl der aufgeschlossenen Proben und 1250 µl Puffer;
Inkubation (20 Minuten): + 200 µl ALA einer 29.8 mM Lösung)

Die Details der einzelnen Kulturen, die im 2 l Fermenter durchgeführt wurden, sind in Tabelle 3 aufgezeigt.

Es sollen hier zwei wichtige Punkte aufgeführt werden, die es zu beachten gilt:

Es ist essentiell, dass die Hauptkultur ausgehend von einer Vorkultur, welche sich im Bereich des exponentiellen Wachstums befindet, gestartet wird (Tabelle 3; Kultur 17 und 18).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Rührgeschwindigkeit des Fermenters. Die Überproduktion der PBGS wurde nur bei einer geringen Rührgeschwindigkeit (200 rpm) beobachtet.

Mit diesen Kenntnissen wurde die Kultur im 10 l Fermenter angesetzt.

5.1.2. Vorversuche zur Aufzucht in einem Rotationsschüttler

In einem Vergleichsversuch wurden die *E. coli* parallel in einem Rotationsschüttler und im 2 l Fermenter kultiviert (Abbildung 21). Aus einer Vorkultur inkubierte man in drei 1 l Erlenmeyern insgesamt 1.8 l LB-Medium auf dem Rotationsschüttler und gleichzeitig wurde eine Kultur im Fermenter angeimpft. Die Aufzucht dauerte in beiden Fällen 16-17 Stunden. Nach anschliessender Darstellung des Lysats konnte gezeigt werden, dass die spezifische Aktivität bei dem Lysat, welches aus Fermentation im Rotationsschüttler erhalten wurde, signifikant kleiner ist (Tabelle 4).

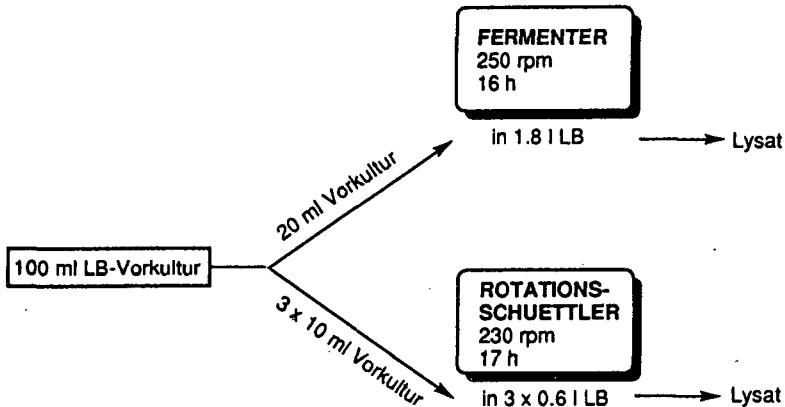


Abbildung 21: Parallelversuch.

LYSAT	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U/ml]	Units [U]
Fermenter	33	11	2	22.3	739
Roations- schüttler	26	22	0.75	16.2	423

Tabelle 4: Darstellung des Lysats aus Fermenter und Rotationsschüttler.

5.1.3. Aufzucht der *E. coli* CR 261 in einem 10 l Fermenter

Die Aufzucht der *E. coli* in einem 10 l Fermenter erfolgte im Rahmen dieser Arbeit einmal. In einem 500 ml Erlenmeyer mit 100 ml LB-Medium und 450 mg Ampicilin wurden die Bakterien während 8 Stunden auf einem Rotationsschüttler zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen und anschließend zu 9 l Nährmedium im 10 l Fermenter gegeben. Die Aufzucht der Bakterien dauerte bei 37°C 21.5 Stunden. Während der ganzen Kultivierung betrug die Rührgeschwindigkeit 200 rpm, die externe Luftzufuhr 10 l/min. Nach Zentrifugation der Zellfeuchtmasse wurde die PBGS angereichert. Ausgehend von 88.2 g Zellfeuchtmasse konnte 814 mg Enzym isoliert werden (siehe Kapitel 5.3.).

5.2. Isolierung der PBGS aus *E. coli* CR 261

5.2.1. Vorversuche zur Aufreinigung

Die ersten Versuche zur Aufreinigung der PBGS wurden mit den Kulturen aus dem 2 l Fermenter durchgeführt. Es wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *E. Jaffe* gearbeitet [68]. Bei diesen Vorversuchen wurde ein Aufreinigungsschema befolgt, welches zwei Ammoniumsulfatfällungen beinhaltet. Danach wurden drei separate Wege eingeschlagen. Der eine beinhaltete eine DNA/RNase Behandlung und eine Filtrationssäule (Size Exclusion), beim anderen wurden zwei chromatographische Methoden gewählt: eine Filtrationssäule (Size Exclusion) und ein Anionenaustauscher. Beim dritten wurde nach der Ammoniumsulfatfällung direkt eine apolare Säule angewandt (Abbildung 22).

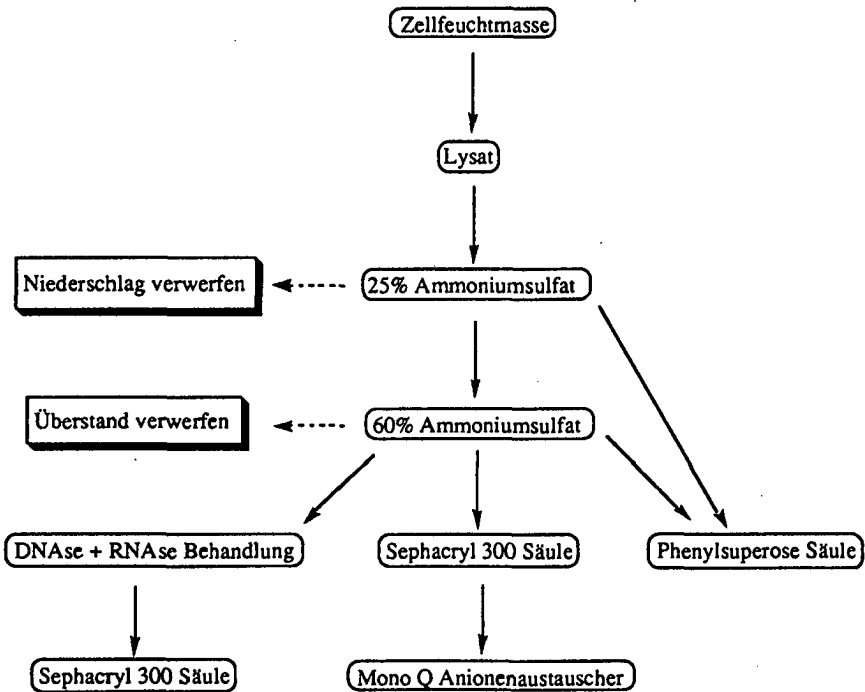


Abbildung 22: Angewandtes Aufreinigungsschema bei Vorversuchen.

Die Quantität an Protein wurde während den einzelnen Reinigungsschritten mit der Methode nach *Bradford* bestimmt [69]. Der Farbstoff Coomassie Blue G250 erfährt bei der Anlagerung an ein Protein eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 495 nm. Die zu untersuchenden Enzymproben wurden so verdünnt, dass sie eine Konzentration von ca. $1\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ enthielten.

Neben der Bestimmung der Anreicherung der PBGS während der Aufreinigung mittels der spezifischen Aktivität wurden die einzelnen Reinigungsschritte mit einer SDS-PAGE 12% Elektrophorese verfolgt [70,71].

5.2.1.1. Darstellung des Lysats

Die Zellwand der Bakterien kann enzymatisch mit Lysozym, mit Ultraschallbehandlung oder auch durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren aufgebrochen werden [70].

Die Zellfeuchtmasse der Kultur 12 wurde in drei Portionen aufgeteilt und in 10 ml eines 0.2 M Tris Puffers pH=7.7 (30 μ M ZnCl₂, 10mM MgCl₂, 10mM β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Zur anschließenden Aufschliessung der Zellfeuchtmasse wurden mehrere Methoden ausprobiert, wobei alle eine Inkubation mit 4.8 mg Lysozym bei Raumtemperatur auf dem Rotationsschüttler (200 rpm) während 30 Minuten beinhalteten. Bevor die Aktivität der PBGS bestimmt wurde, erfolgte während 20 Minuten eine Zentrifugation bei 4°C und 48'000 x g . Der entstandene Niederschlag wurde verworfen.

Tabelle 5 zeigt, dass eine blosse Lysozymbehandlung bei *E. coli* CR 261 ungenügend ist (Variante A). Hingegen erreicht man höchste Aktivität bei einer Lysozymbehandlung mit anschliessendem einmaligem Einfrieren und Auftauen (Variante B). Wird die im Puffer aufgenommene Zellfeuchtmasse vor und nach der Enzymbehandlung eingefroren und aufgetaut, hat dies eine leichte Zunahme der spezifischen Aktivität zur Folge (Variante C).

	Zellfeucht- masse [g]	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U/ml]	Units [U]
Variante A	4.9	10	5.4	30	162	1620
Variante B	4.4	9	18	18.1	326	2934
Variante C	3.2	10	10.5	22.6	237	2370

Tabelle 5: Übersicht der verschiedenen Darstellung des Lysats:

Variante A: Lysozymbehandlung.

Variante B: Lysozymbehandlung, einfrieren und auftauen.

Variante C: einfrieren, auftauen, Lysozymbehandlung und erneutes Einfrieren und Auftauen.

5.2.1.2. Ammoniumsulfatfällung

Die Zellfeuchtmasse (13.3 g) der Kultur 13 wurde wie oben nach Variante B aufgeschlossen und anschliessend in 4 Portionen aufgeteilt. Es wurden mit dem Lysat der Kulturen 13 und 12 (Variante B) verschiedene Ammoniumsulfatfällungen untersucht. Dabei wurde festes Ammoniumsulfat portionenweise bei 4°C den einzelnen Fraktionen bis zur gewünschten Konzentration zugegeben, anschliessend wurde bei 4°C und bei 48'000 x g während 20 Minuten zentrifugiert. Der resultierende Niederschlag wurde in möglichst wenig Puffer gelöst. Die Resultate der Aktivitätsbestimmung sind in Tabelle 6 dargestellt.

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U/ml]	Units [U]
Kultur 12					
Lysat	9	18	18.1	326	2934
35% NS	2	4.92	50.7	249	500
35% ÜS	8	17.4	23.4	407	3257
Kultur 13					
Lysat	7	22.8	19.6	446	3122
30% NS	7	0.4468	9.8	4.58	32
30% ÜS	7	19.4	16.5	321	2247
50% NS	1	42.4	17.6	748	748
50% ÜS	5	8.49	11.8	100.3	502
Lysat	4.5	23.96	17.1	410	1849
30% NS	5	0.86	11	9.5	47.6
30% ÜS	4	15.2	17.399	264	1057
55% NS	1	8.6	10.1	87.7	87.7
55% ÜS	5.5	10.2	21.4	218.6	1202
Lysat	5	22.7	16.1	365	1825
25% NS	5	0.4296	12.404	5.328	26.6
25% ÜS	5.5	15.8	18.01	284	1565
60% NS	1	23.4	21.7	509	509
60% ÜS	6	4.366	5.5	24.3	146
Lysat	5	24.185	13.7	332	1661
25% NS	5	0.366	5.49	2.010	10
25% ÜS	6	14.27	15.09	215	1292
60% NS	1	10.36	28.88	299	299
60% ÜS	7	4.089	5.244	21.445	150

Tabelle 6: Ammoniumsulfatschnitte (NS: Niederschlag; ÜS: Überstand).

Es wird ersichtlich, dass Fällungen mit 25 bis 60% Ammoniumsulfat die besten Resultate lieferten.

5.2.1.3. Sephacryl 300 Säule und Mono-Q-Anionenaustauscher

Die im Puffer gelösten Niederschläge nach der 60% Ammoniumsulfatfällung (Kultur 13) wurden auf eine Sephacryl 300 Säule (80 x 1.5 cm) gebracht und mit 0.2 M KPO₄ pH=7.3 (10 µM ZnCl₂, 10 µM MgSO₄, 10 mM Mercaptoethanol) bei einer Fließgeschwindigkeit von 8.4 ml pro Stunde eluiert. Die zwischen 11.5 und 14 Stunden eluierten Fraktionen enthielten das Produkt. Nach Aufkonzentration der Fraktionen über ein Ultrafiltrationsmembransystem wurde zur weiteren Aufreinigung ein Anionenaustauscher geprüft. Nach Dialyse (Zentrifugation über Centricon 30)

mit 20 mM Tris-Puffer pH=8.3 (1 mM MgCl₂, 10 µM ZnCl₂) wurde ein Sample auf einen FPLC-Mono-Q-Anionenaustauscher (0,5 x 5 cm; Pharmacia) geladen. Zur Eluierung wurde ein Gradient mit dem gleichen Puffer, welchem 1M NaCl zugesetzt wurden, gefahren. Die spezifische Aktivität blieb vor und nach der Anwendung des Ionenaustauschers invariant (Tabelle 7).

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U/ml]	Units [U]
Vor S-300	2	16.9	25.25	427	854
Nach S-300	3.9	6.29	19.65	123	479
Nach Mono-Q		0.223	20.21	4.5	

Tabelle 7.

5.2.1.4. RNA und DNase- Behandlung und Sephacryl 300 Säule

Es wurde gezeigt, dass die Behandlung von 3 ml partiell aufgereinigtem PBGS (nach 25% und 60% Ammoniumsulfatfällung) während 2 Stunden bei 37°C mit je 300 µg DNase und 300 µg RNase praktisch keinen Einfluss auf die spezifische Aktivität hat (Tabelle 8). Danach wurde eine Sephacryl 300 Säule angewendet, wobei durch diesen zusätzlichen Aufreinigungsschritt die spezifische Aktivität nur leicht anstieg. In der SDS-12% Elektrophorese konnten neben der Bande, welcher der PBGS entspricht, noch weitere Banden beobachtet werden.

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U/ml]	Units [U]
Vor DNA/RNase Behandlung	3	31.1	13.9	432	1298
Nach DNA/RNase Behandlung	3	32.8	15.3	502	1506
Nach Sephacryl 300	3	15.0	17.9	269	808

Tabelle 8.

5.2.1.5. Phenylsuperose Säule

Mit der Anwendung einer apolaren Säule erhoffte man sich die gleiche Wirkung wie bei einer DNase/RNase Behandlung, nämlich das Abtrennen der polaren Nucleotide. Partiiell aufgereinigtes PBGS (nach 25% resp. 60% Ammoniumsulfatfällung) wurde auf eine apolare Phenylsuperose FPLC-Säule (0.5 x 5 cm; Pharmacia) gebracht und mit einem negativen Gradienten eluiert. Die PBGS wurde dabei erst spät eluiert, was für ein sehr apolares Enzym spricht. Das Säulendiagramm der Eluation (Abbildung 23) zeigt im wesentlichen zwei Banden, wobei sich die PBGS im ersten Peak der zweiten Bande befindet.

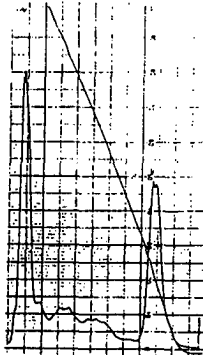
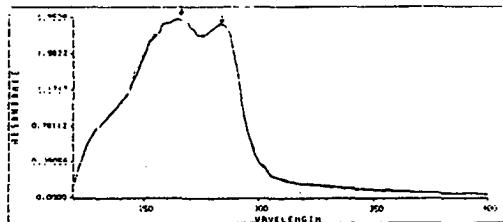


Abbildung 23: Säulendiagramm der Trennung auf der Phenylsuperose-Säule. Es wurde dabei mit einem Gradienten gearbeitet 100% A, 0-100% B, 100% B. Die Gradientenführung ist eingezeichnet.

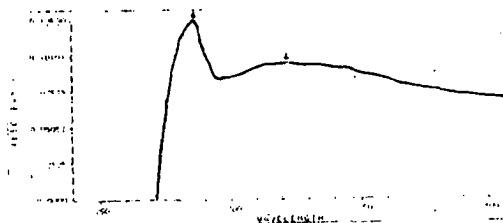
A: 50mM KPO₄, 1mM MgCl₂, 10 µM ZnCl₂ (pH=7.0), 1M (NH₄)₂SO₄

B: 50mM KPO₄, 1mM MgCl₂, 10 µM ZnCl₂ (pH=7.0).

Die Aufreinigung zeigte im UV Spektrum den Verlust der Nucleotide durch das Verschwinden der Bande bei 260 nm (Abbildung 24). In der SDS-Elektrophorese konnte gleichzeitig eine deutliche Enzymreinigung (Abbildung 25) gezeigt werden.



A



B

Abbildung 24: UV-Spektrum des 60% Ammoniumsulfatfällung vor (A) und nach (B) der Phenylsuperose-Säule.

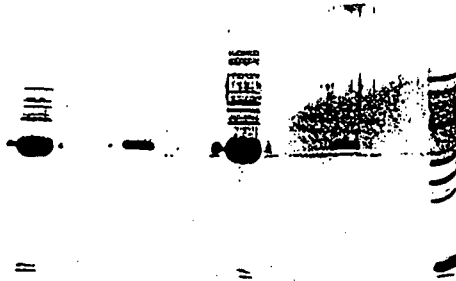


Abbildung 25: SDS-Elektrophorese vor und nach FPLC Phenylsuperose-Säule. Von links nach rechts; 25% Ammoniumsulfat Überstand, nach Säule; 60% Ammoniumsulfat Niederschlag, nach Säule; Standard-Proteine.

Die Anwendung einer apolaren Säule erlaubt es uns, die 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung zu umgehen (siehe Abbildung 26), und die Nucleinsäuren und verschiedene Proteine von der PBGS zu entfernen

5.3. Optimierte Isolierung der PBGS aus *E. coli* CR 261

Anhand der Resultate und Erfahrungen, die wir im vorhergehenden Kapitel besprochen haben, entschlossen wir uns, die PBGS wie folgt aufzureinigen: Nach Aufschluss der Zellfeuchtmasse folgte eine 25% Ammoniumsulfatfällung, eine apolare Säule und eine Size Exclusion Säule (Abbildung 26).

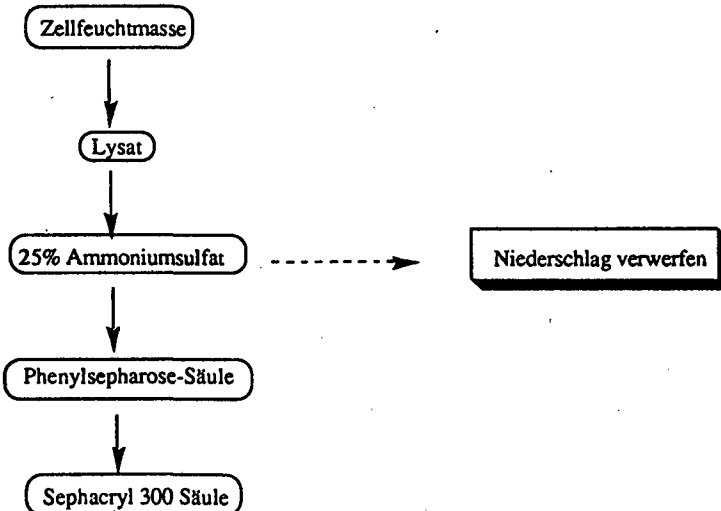


Abbildung 26.

Zur Isolierung der PBGS aus einem 9 l Ansatz im 10 l Fermenter wurde die Zellfeuchtmasse (88.2 g) in 4 Portionen (15.4 g, 22.9 g, 21.9 g, 29.2 g) aufgeteilt und nacheinander aufgereinigt. Bis zur jeweiligen Aufreinigung wurden die einzelnen Portionen der Zellfeuchtmasse bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$

gelagert. In Tabelle 9 findet man eine Zusammenfassung der vier Aufreinigungen; stellvertretend wird hier die 4. Aufreinigung beschrieben. Die Zellfeuchtmasse (29.2 g) wurde in 50 ml 0.1M KPO_4 -Puffer (pH=7.28, 10 μ M $ZnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Mercaptoethanol) aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 60 mg Lysozym wurden die Zellen mittels Einfrieren und erneutem Auftauen aufgeschlossen.

Das Lysat wurde mit einer Cocktailproteaseninhibitortablette versetzt. Die Tablette enthält unter anderem eine unbekannte Menge EDTA, welches auch die PBGS aus *Escherichia coli* (Metalloenzym) inhibieren würde, deshalb wurde die Tablette - bevor die Zugabe zum Lysat erfolgte - in 5 ml eines Tris-Puffer (1 M Tris, 100 mM $MgCl_2$, 100 μ M $ZnCl_2$, 100 mM Mercaptoethanol (pH=7.4)) gelöst, so dass EDTA als $Mg(II)$ Komplex vorlag. Erst danach wurde das Lysat zugegeben.

Der nächste Schritt war die 25% Ammoniumsulfatfällung. 7.9 g festes Ammoniumsulfat wurde portionenweise bei 4°C zu der obigen Lösung (59 ml) gegeben. Nach Zentrifugation wurde der dabei resultierende Überstand auf eine apolare Säule (Phenylsepharose) geladen. Auf einer apolaren Säule werden DNA und RNA nicht gehalten. Abbildung 27 zeigt das Chromatogramm bei 280 nm. Die ersten Banden (bis Fraktion 20) dürften den Nucleinsäuren entsprechen, welche äusserst schlecht oder gar nicht von einer apolaren Säule gebunden werden. Die PBGS, welche sich als ein sehr hydrophobes Protein erwies, wurde erst spät eluiert. Man benutzte für die ersten 48 Fraktionen einen Posphatpuffer (50 mM K_iPO_4 pH=7.1, 1mM $MgCl_2$, 10 μ M $ZnCl_2$, 10 mM Mercaptoethanol, 0.5 M $(NH_4)_2SO_4$), und das Enzym wurde mit dem gleichen Puffer ohne Ammoniumsulfatzusatz eluiert. Die PBGS ist über 25 Fraktionen (67-92) verteilt (Abbildung 27 und 28). Nach Aufkonzentrierung der Fraktionen über ein Ultrafiltrationsmembransystem bis zu einem Volumen von 8.2 ml wurde zur weiteren Aufreinigung eine Size Exclusion Säule angewendet.

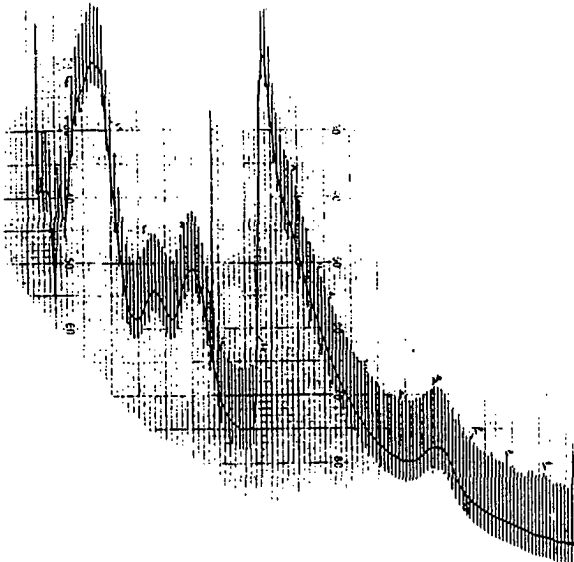


Abbildung 27: Chromatogramm der Phenylsepharose (4. Aufreinigung).

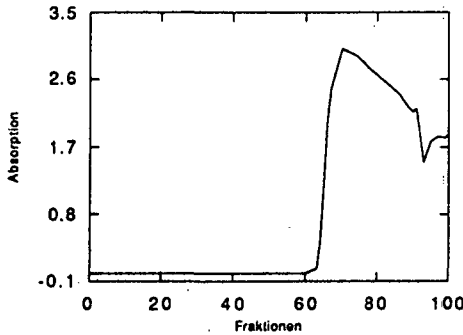


Abbildung 28: Absorption der Inkubationslösung einzelner Fraktionen der Phenylsepharose mit Ehrlichreagenz bei 554 nm gezeigt anhand der 4. Aufreinigung.
 (Vorinkubation (30 Minuten): 10 µl der Fraktion und 1290 µl Puffer;
 Inkubation (20 Minuten): + 200 µl ALA einer 29.8 mM Lösung)

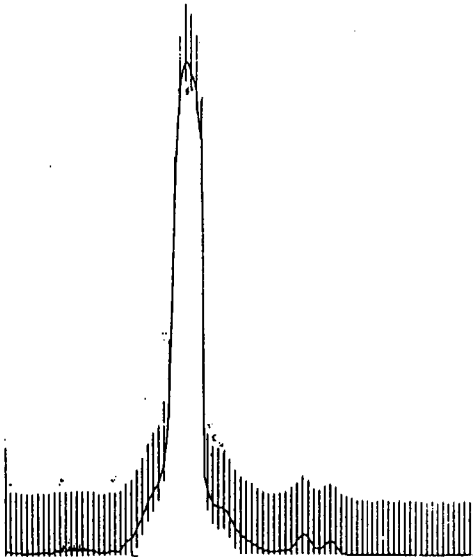


Abbildung 29: Säulendiagramm der Sephacryl 300 der 2. Aufreinigung. Als Eluiermittel wurde 0.1 M NaPO₄ (pH=7.3), 1mM MgCl₂·6H₂O, 10 µM ZnCl₂, 10 mM Mercaptoethanol benutzt.

Nach Auftragen auf die Sephacryl 300 Säule (2.6 x 65 cm) wurde mit 0.1 M NaPO₄ pH=7.3 1mM MgCl₂, 10 µM ZnCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol bei einer Fließgeschwindigkeit von 29 ml pro Stunde eluiert. Die aktivsten Fraktionen an PBGS kommen in einem schmalen Bereich, der über 5 Fraktionen verteilt ist, zwischen 6.8 und 8.2 Stunden Eluierzeit. Dies ist aus

dem Säulendiagramm (Abbildung 29), welches eine einzige Bande zeigt, ersichtlich und wird durch die Aktivitätsmessung (Abbildung 30) der einzelnen Fraktionen untermauert.

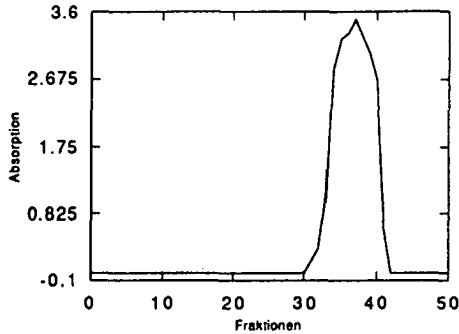


Abbildung 30: Absorption der Inkubationslösung einzelner Fraktionen der Sephacryl 300 mit Ehrlichreagenz bei 554 nm gezeigt anhand der 4. Aufreinigung. (Vorinkubation (30 Minuten): 10 µl der Fraktion und 1290 µl Puffer; Inkubation (20 Minuten): + 200µl ALA einer 29.8 mM Lösung)

Die Anreicherung an PBGS wurde mittels Elektrophorese verfolgt. In Abbildung 31 ist die Elektrophorese der 4. Aufreinigung abgebildet.

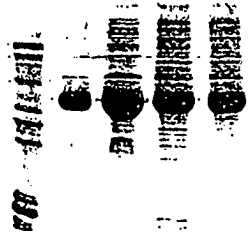


Abbildung 31: Elektrophorese der 4. Aufreinigung (SDS-PAGE 12%, 0.75mm, Minigel, System Lämmli); von rechts nach links: Lysat; 25% Ammoniumsulfatüberstand; nach Phenylsepharose-Säule; nach Sephacryl 300-Säule; Standard-Proteine.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 4 solche Reinigungsprozeduren durchgeführt, deren Resultate in Tabelle 9 zusammengefasst sind.

1. Aufreinigung Zellfeuchtmasse: 15.4 g	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U/ml]	Units [U]
Lysat	27	32.48	24	779	21044
25% Überstand	28.5	24.52	20	490	13962
Nach Phenyl- Sephrose-Säule	5.8	25.17	31	780	4528
Nach S-300 Säule	7.5	17.72	35	617	4632

2. Aufreinigung Zellfeuchtmasse: 22.9 g	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U/ml]	Units [U]
Lysat	37	29.3	21	620	22945
25% Überstand	42	24.7	19	460	19345
Nach Phenyl- Sephrose-Säule	8.5	40.12	22.5	904	7688
Nach S-300 Säule	7.3	30.74	24.6	757	5529

3. Aufreinigung Zellfeuchtmasse: 21.9 g	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U/ml]	Units [U]
Lysat	36.5	29.27	16.78	491	17930
25% Überstand	41.5	21.66	20.81	450	18708
Nach Phenyl- Sephrose-Säule	7	40.68	22.4	913	6391
Nach S-300 Säule	7	26.45	34	903	6325

4. Aufreinigung Zellfeuchtmasse: 29.2 g	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U/ml]	Units [U]
Lysat	52	25.6	19.4	497	25870
25% Überstand	59	21.28	18.3	390	23015
Nach Phenyl- Sephrose-Säule	8.2	29.78	25.3	752	6166
Nach S-300 Säule	9	30.82	32.3	995	8959

Tabelle 9: Aufreinigungsresultate der vier Aufreinigungen.

5.4. Stabilität von angereichertem PBGS

Auf Stufe des Lysats (Kultur 7) und Lagerung bei -20°C verliert die PBGS innert 5 Wochen sämtliche Aktivität. Die spezifische Aktivität betrug zu Beginn der Lagerung 15 U/mg und nach 5 Wochen 0.048 U/mg.

Lässt man eine Enzymprobe, welche partiell aufgereinigt wurde (Kultur 13; 25-60 % Ammoniumsulfatfällung und Sephacryl 300 Säule), bei Licht und Raumtemperatur stehen, so verliert das Enzym die Aktivität mit einer Halbwertszeit von ca. einer Woche (Abbildung 32).

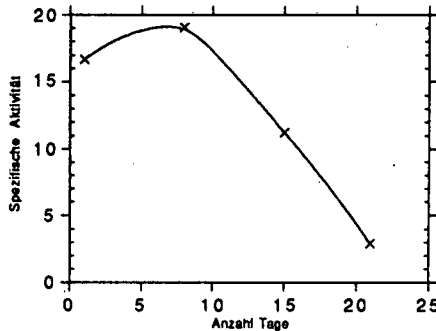


Abbildung 32: Verlust der Spezifischen Aktivität im Verlaufe von 3 Wochen bei Raumtemperatur.

Ein signifikanter Verlust wurde auch bei angereichertem Enzym nach der Sephacryl S-300 Säule (Kultur 13) bei viermaligem Auftauen auf 4°C und Einfrieren auf -20°C festgestellt. Vor dem ersten Einfrieren betrug die spezifische Aktivität 24.4 U/mg. Nach dreimaligen Auftauen innert acht Tagen konnte eine spezifische Aktivität von 21.6 U/mg gemessen werden. Nach dem vierten Auftauen nach weiteren 12 Tagen betrug die spezifische Aktivität nur noch 5.9 U/mg.

Das in Kapitel 5.3. beschriebene aufgereinigte PBGS wurde nach der Sephacryl 300 Säule auf 9 ml aufkonzentriert. Das Enzym wurde in 256 Portionen à 35 µl aufgeteilt und in Gegenwart von 30 µl Glycerin bei -80°C gelagert (4. Aufreinigung). Nach über 20 Monaten konnte kein signifikanter Verlust der spezifischen Aktivität beobachtet werden (Tabelle 10).

Dauer der Lagerung	Spezifische Aktivität [U/mg]
1 Monat	24.6
3 Monaten	22.7
6 Monaten	25.7
12 Monaten	24.4
18 Monaten	24.2
20 Monaten	22.7

Tabelle 10.

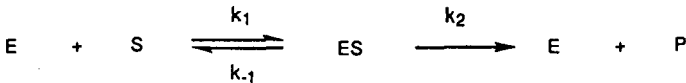
6. ENZYMKINETIK UND INHIBITIONSTUDIEN GEZEIGT AM BEISPIEL DER ALDOLASE DER KLASSE I

6.1. Die Grundlagen der Enzymkinetik

6.1.1. Die Kinetik des Einsubstratenzyms

Michaelis und Menten haben im Jahre 1913 ein kinetisches Modell aufgestellt, das die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Umwandlung eines einzelnen Produkts beschreibt. Aus dem freien Enzym und dem Substrat bildet sich der Enzym-Substrat-Komplex (Schema 1). Es handelt sich dabei um einen schnellen und reversiblen Schritt, ohne dass chemische Bindungen zwischen Substrat und Enzym ausgebildet werden. Der so ausgebildete Enzym-Substrat- oder Michaelis-Komplex wird ausschliesslich durch physikalische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zusammengehalten.

In einem zweiten Schritt, der eigentlichen Katalyse, der wesentlich langsamer als der erste sein muss, wird das Produkt gebildet und gleichzeitig das Enzym regeneriert.



Michaelis-Menten Gleichung

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad K_m = \frac{[E] \times [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Schema 1.

Ursprünglich ist die Michaelis-Menten Gleichung unter der Annahme hergeleitet worden, dass k_2 viel kleiner als k_{-1} ist. K_m wird die Michaelis-Menten-Konstante genannt und kann als Dissoziationskonstante des Michaeliskomplexes zu freiem Enzym und Substrat interpretiert werden.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der meisten Enzymreaktionen direkt proportional zur vorhandenen Enzymmenge $[E]_{\text{tot}}$ ist, d.h. der geschwindigkeitslimitierende Faktor ist V_{\max} . V_{\max} kann erreicht werden, wenn die gesamte Enzymmenge als Michaelis-Komplex vorliegt.

Bei den meisten Enzymen beobachtet man eine Sättigungskinetik, in der bei kleiner Substratkonzentration ein quasilinearer Zusammenhang vorliegt (Reaktion erster Ordnung). Mit zunehmender Substratkonzentration wird die Reaktion gemischter Ordnung. Bei genügend hoher Substratkonzentration entspricht die Anfangsgeschwindigkeit V_{\max} (Reaktion nullter Ordnung) (Abbildung 33).

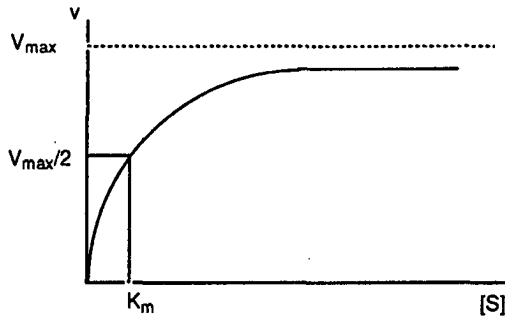


Abbildung 33: Sättigungskurve eines Enzyms.

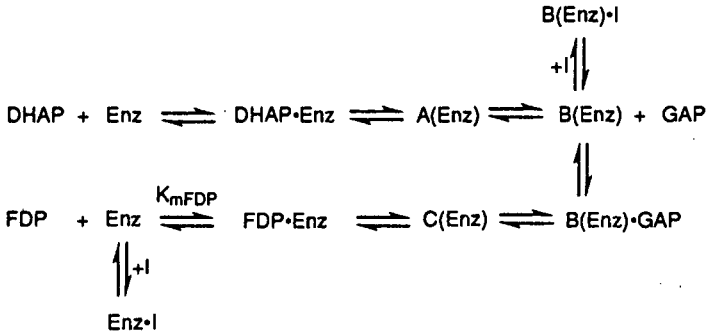
6.2. Verschiedene Inhibitionstypen

Inhibitoren sind Moleküle, die mit einem Enzym so wechselwirken, dass die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion erniedrigt wird. Die Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeit kann aus verschiedenen Gründen zustande kommen (Blockierung der Active Site, allosterische Wechselwirkung...). Um aufzuzeigen, welche Schlussfolgerungen aus den unterschiedlichen Hemmstudien gezogen werden können, haben wir uns entschlossen, die Inhibitionsstudien der Aldolasen der Klasse I zu besprechen. Dieses Enzym wurde gewählt, weil bei dieser Klasse der Aldolasen ebenso wie bei den Porphobilinogen Synthasen eine Schiffische Base zwischen einem Lysin in der Active Site und der Ketogruppe des Substrates ausgebildet wird. *Shemin* und andere Autoren postulierten [18,58], dass die Mechanismen für die Aldolase und die Porphobilinogen Synthase über vergleichbare Zwischenprodukte ablaufen könnten. Die Aldolase katalysiert die Reaktion zwischen Dihydroxyacetonphosphat (DHAP (17)) und Glycerinaldehyde-3-phosphat (GAP (18)) zu Fructose-1,6-diphosphat (FDP (19)) (Abbildung 34). Obwohl die Funktion der Aldolase im Metabolismus eine Aldolspaltung ist (Glykolyse) [72], katalysieren die Aldolasen aber auch die Aldolreaktionen. Wir besprechen hier den Mechanismus der katalysierten Reaktion in der Richtung der Synthese von Fructose-1,6-diphosphat (FDP (19)). Der erste Schritt dazu ist die Ausbildung einer Schiffischen Base zwischen dem Lysin 229 und der Carbonylgruppe von DHAP (17). Danach wird regio- und stereoselektiv das Enamin ausgebildet, erst danach kann das zweite Substrat (GAP (18)) an die Active Site gebunden werden. In der Active Site folgt dann die Aldolreaktion, welche zum als Schiffische Base gebundenen Produktmolekül führt.

Dieser Mechanismus beruht auf folgenden experimentellen Resultaten [73]:

- 1) Die Schiffische Base konnte mit NaBH_4 abgefangen werden.
- 2) Die Aldolase wird in Anwesenheit von Cyanid irreversibel inhibiert. (wahrscheinlich unter Ausbildung eines Aminonitrils)
- 3) Schneller Austausch von $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ für die Carbonylgruppe von FDP konnte beobachtet werden.
- 4) ^{13}C NMR Experimente mit Analoga von DHAP wiesen auf die Bildung eines Carbinolamins hin.
- 5) Die Bildung des Enamins durch Deuteriumisotopenaustausch an Position 3 von DHAP konnte nachgewiesen werden.
- 6) Schliesslich konnte das Enamin mit Hilfe eines Oxidationsmittels zu Hydroxybrenztraubensäurealdehydphosphat oxidiert werden.
- 7) Es gibt kinetische Hinweise für eine sequentielle Bindung von DHAP und GAP.

Betrachtet man die Zerfallsreaktion von FDP (19) zu GAP (18) und zu DHAP (17), so lässt sich das obige Modell nicht strikt anwenden. Es ist nicht klar ersichtlich, zu welchem Zeitpunkt der Enzymreaktion ein kompetitiver Inhibitor interveniert. Im Falle der Aldolase sind zumindest aufgrund struktureller Überlegungen zwei verschiedene Gruppen von kompetitiven Inhibitoren denkbar: Eine erste Gruppe, die direkt mit dem FDP um die freie Bindungsstelle im Enzym konkurriert und eine zweite Gruppe, welche strukturelle Ähnlichkeiten mit GAP aufweist und deshalb zu einem späteren Zeitpunkt die enzymatische Reaktion hemmt (Schema 4).



Schema 4.

In Tabelle 11 sind eine Auswahl von Inhibitoren gezeigt, die strukturelle Ähnlichkeiten mit FDP aufweisen und deshalb an der gleichen Stelle wie das FDP intervenieren dürften.

Für die Erkennung sind die beiden Phosphatgruppen wesentlich, wie auch die Anzahl der dazwischen liegenden Methylengruppen. Liegen zwischen den beiden Phosphatgruppen in Analogie zu FDP sechs Kohlenstoffe (wie im Fall von Hexan-1,6-diphosphat (25)), so ist die Erkennung des Inhibitors durch das Enzym am besten gewährleistet. Eine Erhöhung und eine Verkleinerung der Zahl der Methylengruppen führt zu signifikant schlechteren Inhibitoren. So wird Propan-1,3-diphosphat (26) sechsmal schlechter erkannt als Hexan-1,6-diphosphat (25) (Tabelle 11).

Ersetzt man bei FDP (19) jeweils die Phosphatgruppen durch eine Hydroxygruppe, so behält der Inhibitor 27 (resp. 28) zwar strukturell starke Ähnlichkeiten mit dem natürlichen Substrat, dennoch resultieren dadurch nur mässige Inhibitoren. Aus diesen Resultaten lässt sich schliessen, dass für die Erkennung des Michaelis-Komplexes (FDP·Enzym) vor allem die beiden Phosphatgruppen verantwortlich sind. Die Carbonylgruppe und die Hydroxygruppen des FDP, Fructose-6-Phosphat und Fructose-1-Phosphat spielen keine entscheidende Rolle für die Erkennung durch die Aldolase [73].

In die zweite Gruppe der kompetitiven Inhibitoren der Aldolase gehören die Moleküle, die strukturell Ähnlichkeiten mit GAP (18) aufweisen, und wie oben vorgeschlagen, um die Bindungsstelle mit GAP konkurrieren. 2-Hydroxy-3-Oxobutanphosphonsäure (29), 3-Hydroxy-4-Oxopentanphosphonsäure (30) als auch 4-Phosphatbutanal (31) sind gute Inhibitoren, daraus kann geschlossen werden, dass die Länge des Kohlenstoffgerüsts zwischen der Carbonylfunktion und der Phosphonsäure resp. Phosphatgruppe für die Stärke der Hemmung nicht den einzigen Ausschlag gibt. Ersetzt man hingegen die Carbonylfunktion durch ein Amid (32) oder führt man in β -Stellung zur Carbonylgruppe ein Chlor (33) ein, hat dies einen starken Verlust der Hemmung zur Folge (Tabelle 11).

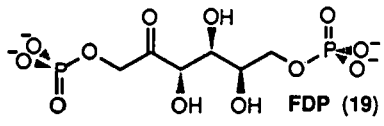
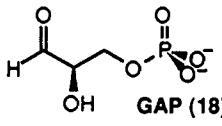
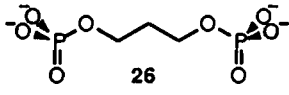
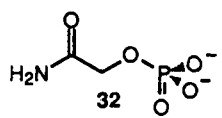
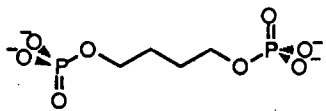
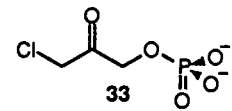
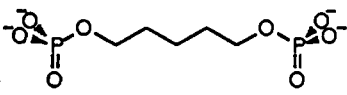
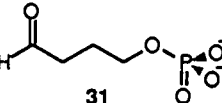
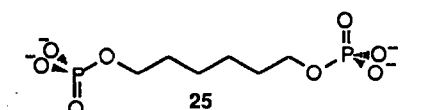
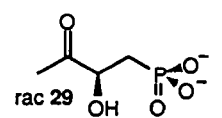
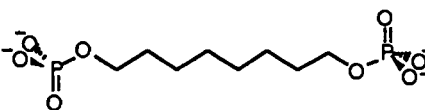
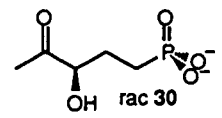
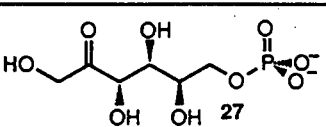
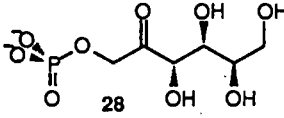
	Ki/ K _m FDP		Ki/ K _m FDP
			
	45		450
	32.5		200
	17.5		10
	7		5.8
	43		5.0
	79		
	68		

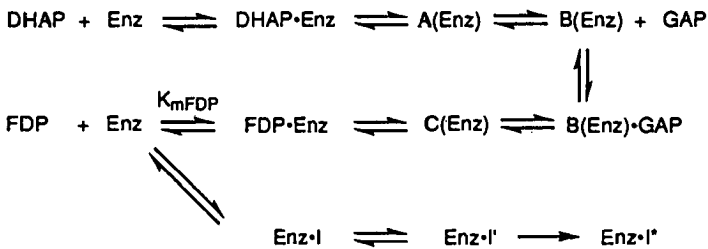
Tabelle 11: Auswahl kompetitiver Inhibitoren der Aldolase der Klasse I.

6.2.2. Irreversible Inhibition

Bei irreversiblen Inhibitoren handelt es sich um Moleküle, die fähig sind, mit dem Enzym kovalente Bindung einzugehen. Irreversible Inhibitoren werden auch Suizid Inhibitoren genannt und müssen in der Regel folgenden drei Anforderungen genügen [75]:

- Der Inhibitor muss in Abwesenheit des Enzyms unreaktiv sein
- Der Inhibitor muss von seinem Zielenzym erkannt werden.
- Der Zerfall des Michaeliskomplexes zwischen Enzym und Inhibitor muss langsamer sein, als die Ausbildung der irreversiblen kovalenten Bindung.

In Schema 5 ist gezeigt, dass ein solcher Inhibitor zuerst reversibel an das Enzym gebunden wird, bevor sich eine irreversible kovalente Bindung ausbildet.



Schema 5.

Bei der Aldolase wurde eine Reihe solcher Inhibitoren (Abbildung 35) gefunden, welche die oben genannten drei Bedingungen erfüllen [76-78]. Wir gehen davon aus, dass die jeweiligen Inhibitoren aufgrund ihrer Grösse mit FDP um den freien Platz konkurrieren.

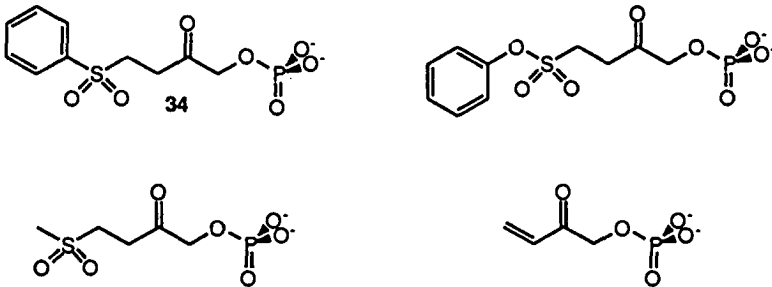


Abbildung 35.

Zuerst bildet das Enzym mit dem Inhibitor 34 eine Schiffsche Base aus. Enzymatische Protonenabstraktion führt zu einem Enamin, welches unter Abgang von Benzosulfinsäure zu einem α,β -ungesättigten Imin umgewandelt wird. Anschliessender nukleophiler Angriff des Cysteins 338 führt zu einer neuen kovalenten Bindung unter Ausbildung eines stabilen Enamins (35) (Abbildung 36) [78].

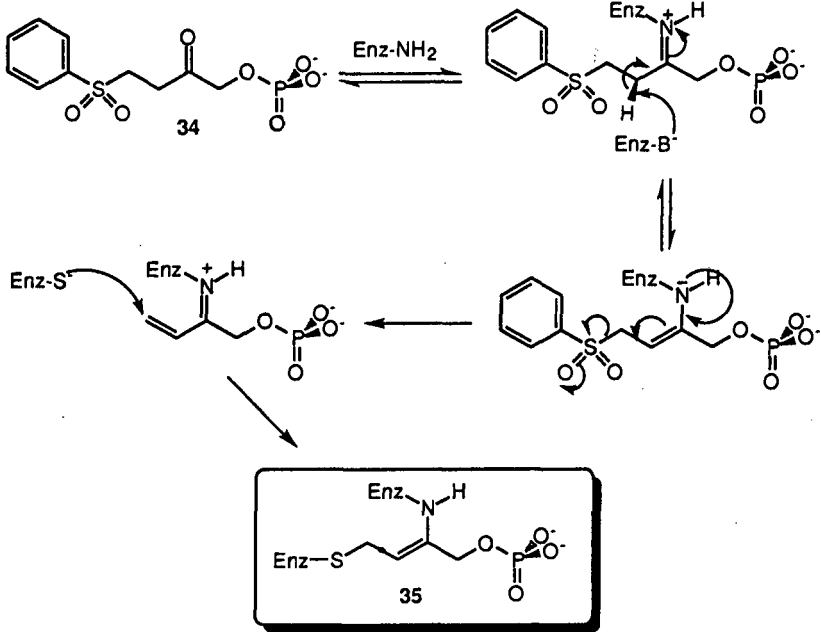
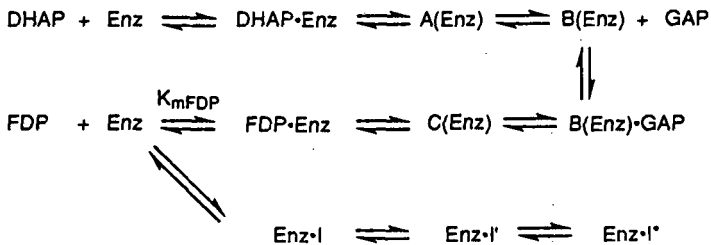


Abbildung 36.

6.2.3. "Tightly Bound" ("Slow reversible") Inhibitoren

Im Gegensatz zu der irreversiblen Inhibition wird bei der "slow reversible" Inhibition ein EI*-Komplex gebildet, welcher reversibel zum freien Enzym umgewandelt werden kann (Schema 6) [79].



Schema 6.

Im Rahmen der Aldolase hat man diesbezüglich Diketone und α -Hydroxyketone als derartige Inhibitoren identifiziert (Abbildung 37) [78,80].

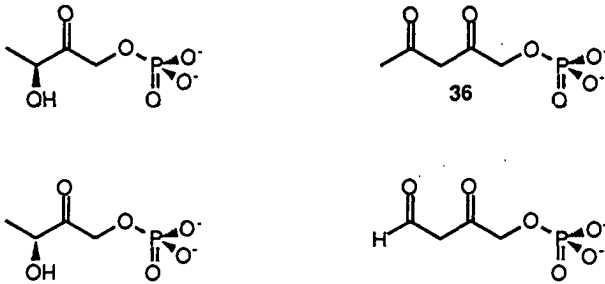


Abbildung 37: "Tightly bound" (oder "slow reversible") Inhibitoren der Aldolase.

Die Vorstellung der Inhibition für das Diketon 36 ist, dass nach erfolgter Ausbildung einer Schiffischen Base eine Protonenabstraktion in α -Stellung erfolgt und schliesslich ein stabiles Enamin mit dem Enzym vorliegt (Abbildung 38).

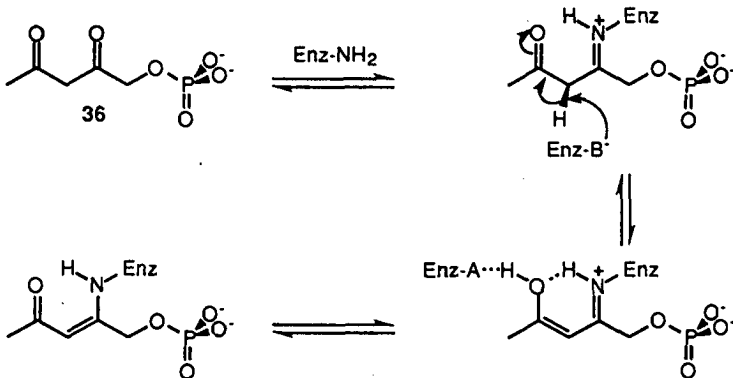
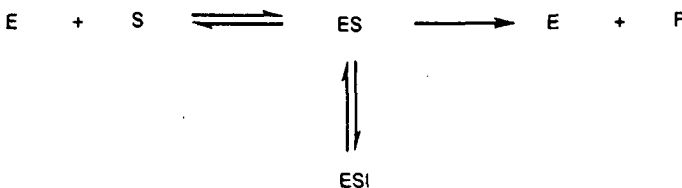


Abbildung 38: Mechanismus der Inaktivierung eines "slow reversible" Inhibitor.

6.2.4. Unkompetitive und gemischte Inhibition

Bei der Aldolase der Klasse I sind keine Inhibitoren bekannt, die eine unkompetitive oder eine gemischte Inhibition aufzeigen.

Nach Lehrbuch bindet der klassische unkompetitive Inhibitor reversibel zum Enzym-Substrat Komplex (ES) und desaktiviert das Enzym in Form eines ESI-Komplexes (Schema 7).



Schema 7: Unkompetitive Inhibition

Bei einer gemischten Inhibition wird davon ausgegangen, dass der Inhibitor fähig ist sowohl an das freie Enzym wie auch an den Enzym-Substrat-Komplex zu binden (Schema 8) [72,75,81-83].



Schema 8: Gemischte Inhibition

6.2.5. Graphische Auswertung der kinetischen Daten [81,82]

Mit Hilfe der graphischen Auswertungen können die verschiedenen Hemmtypen von Inhibitoren unterschieden und V_{\max} , K_M und K_i berechnet werden. Durch die Linienführung der beim Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee Plot resultierenden Geraden können die einzelnen Hemmtypen identifiziert werden. Im weiteren stehen zur Berechnung von V_{\max} , K_M und K_i eine statistische Auswertung und die Auswertung mittels einer Hyperbel, welche durch Auftragen von Substratkonzentration gegen Geschwindigkeit resultiert, zur Verfügung. Wir werden im Kapitel 7.5 im Detail auf die einzelnen Auswertungen eingehen.

Die mechanistischen Studien und die Inhibitionsstudien, welche an der Aldolase der Klasse I durchgeführt wurden, liefern ein detailliertes Bild über die Transformationen und die Active Site. Dank diesen Studien war es möglich, in der Röntgenstrukturanalyse den an den Transformationen beteiligten Aminosäuren eine Funktion zu zuordnen.

Allein aus der Röntgenstruktur eines Enzyms können weder die an der Reaktion beteiligten Substrate noch die Funktion des Enzyms abgeleitet werden. Die mechanistischen Studien und die Inhibitionsstudien sind essentiell, um die maximal möglichen Informationen aus einer Röntgenstruktur zu gewinnen.

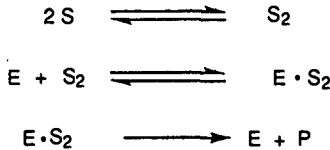
Die Aufklärung des Mechanismus eines gegebenen Enzyms erfordert immer das Zusammenfügen der Strukturdaten aus der Röntgenstrukturanalyse mit der mechanistischen Information aus Kinetik- und Inhibitionsstudien.

7. INHIBITIONSSTUDIEN DER PORPHOBILINOGEN SYNTHASE

7.1. Die Enzymkinetik der Porphobilinogen Synthase

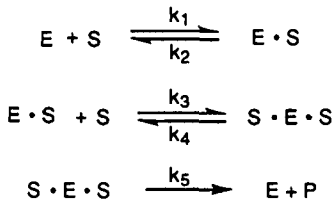
Die Porphobilinogen Synthase katalysiert die Reaktion zwischen zwei identischen Substraten, d.h. es handelt sich um ein Enzym, welches eine Zwei-Substrat-Reaktion ausführt. Die Michaelis-Menten Gleichung beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit für eine Ein-Substrat-Reaktion. Man würde deshalb bei der Porphobilinogen Synthase eine Reaktionsgeschwindigkeit zweiter Ordnung erwarten. Die kinetischen Messungen zeigen aber klar eine Abhängigkeit erster Ordnung, d.h. eine Kinetik nach Michaelis-Menten. Schon in einer frühen Publikation wurde von *Granick et al.* die aus dem Reaktionsmechanismus abzuleitenden kinetischen Gleichungen diskutiert. Er diskutierte dabei zwei Hypothesen, wie für das Enzym PBGS eine Kinetik 1. Ordnung erhalten werden kann [84].

Die erste Hypothese setzt die Bildung eines Ketimins zwischen den beiden ALA voraus. Dieses Ketimin (S_2) bildet das Substrat für das Enzym (Schema 9). Eine Reaktion 1. Ordnung - damit eine Kinetik nach Michaelis-Menten - kann nur erreicht werden, falls die Ausbildung des Dimers S_2 rasch erfolgt, und S_2 als überwiegende Spezies vorliegt. Da aber bekannt ist, dass die Dimerisierung zu S_2 nur in Spuren erfolgt [9], kann die beobachtete Kinetik auf diese Weise nicht erklärt werden.



Schema 9.

Die zweite Hypothese geht davon aus, dass die beiden Substrate sequentiell an das Enzym gebunden werden (Schema 10).



Schema 10.

Unter der Annahme, dass die PBG-Bildung der langsame Schritt ist, leiten *Granick et al.* unten stehende Gleichung für die Anfangsgeschwindigkeit ab (Schema 11) [84]. Der quadratische Term kann dabei vernachlässigt werden, falls die Dissoziationskonstante von $E \cdot S$ viel kleiner ist als die Dissoziationskonstante von $S \cdot E \cdot S$. Wenn k_5 klein ist, muss die im Experiment eingesetzte Substratkonzentration grösser als die Dissoziationskonstante $E \cdot S$ sein, um eine Kinetik nach Michaelis-Menten zu beobachten. *Granick* gibt diesbezüglich an, dass die Dissoziationskonstante kleiner als $100 \mu\text{M}$ ist [84]. *Jaffe* hat für die P-side ALA eine Dissoziationskonstante von $3.8 \mu\text{M}$ bestimmt [48].

$$v = \frac{k_5 E_0}{1 + \underbrace{\left[\frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1} \right] \frac{1}{S_0}}_{\text{1. Term}} + \underbrace{\frac{k_2}{k_1} \left[\frac{k_4 + k_5}{k_3} \right] \frac{1}{S_0^2}}_{\text{2. Term}}}$$

1. Term >> 2. Term

$$v = \frac{k_5 E_0}{1 + \left[\frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1} \right] \frac{1}{S_0}} ; \text{ falls } S_0 > \frac{k_2}{[k_1 + k_3 k_5 / (k_4 + k_5)]}$$

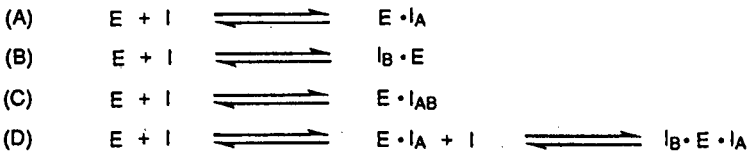
k_5 klein
 $S_0 > k_2/k_1$

Schema 11.

Die experimentellen Bedingungen für die in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitionsstudien wurden so gewählt, dass die Substratkonzentration mindestens 39.7 µM betrug und damit deutlich über der von *Jaffe* gemessenen Dissoziationskonstante lag.

7.2. Diskussion der möglichen Inhibitionsstellen der PBGS

Ein Inhibitor kann an verschiedenen Reaktionsschritten eingreifen. Eine erste Analyse der verschiedenen Inhibitionsmechanismen wurde von *Tschudy* et al. am Beispiel von Succinylaceton durchgeführt [49]. Da die PBGS zwei identische Substrate unterschiedlich erkennt und asymmetrisch ins Produkt einbaut, müssen im Enzym zwei Erkennungsstellen (von *Tschudy* als A und B bezeichnet) vorhanden sein. Er schlägt vor, dass Succinylaceton an Position A (Fall A) oder an Position B (Fall B) binden kann, allenfalls auch gleichzeitig an beide Positionen (Fall C). Auch eine nacheinanderfolgende Bindung zweier Inhibitoren an die beiden Bindungsstellen ist denkbar (Fall D) (Schema 12).



Schema 12.

A priori ist keine Voraussage möglich, wo ein einzelner Inhibitor am Enzym eingreift. Dennoch ist zu erwarten, dass bei vergleichbaren Strukturen der Inhibitoren die Hemmwirkung an der gleichen Stelle im Enzym ausgeübt wird. Damit können die beobachteten K_i 's von strukturell ähnlichen Inhibitoren untereinander verglichen werden.

Diese Problematik wurde auch von *R. Neier* in "Advances in Nitrogen Heterocycles" eingehend diskutiert [10].

7.3. Durchführung der Inhibitionsstudien; Enzym Assay [85]

Der potentielle Inhibitor wurde mit PBGS im Inkubationspuffer während ca. 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von ALA wurden alle Proben gleich lang inkubiert (in den meisten Fällen 20 oder 15 Minuten). Die enzymatische Reaktion wurde mit HgCl_2 und Trichloressigsäure gestoppt und gleichzeitig das Mercaptoethanol gefällt. Die gefällten Quecksilbersalze wurden zentrifugiert und ein Aliquot des Überstandes wurde mit Ehrlichreagenz versetzt. Die dabei resultierende Rosa-Farbe wurde nach ca. 5 Minuten spektrophotometrisch bei 554 nm gemessen [86]. Aus den gemessenen Absorptionen konnten die Konzentration an PBG bestimmt werden und daraus wurde v_0 abgeleitet (Abbildung 39).

Die Inhibitoren wurden in Wasser, im Inkubationspuffer oder in einem Wasser/DMSO-Gemisch gelöst. Die Messungen wurden mit vier verschiedenen Konzentrationen an Inhibitor durchgeführt. Der Konzentrationsbereich erstreckte sich bei guten Inhibitoren (z.B. Levulinsäure) von 0 mM, 1 mM, 2.1 mM bis 4.3 mM und bei schlechten Inhibitoren (z.B. Acetylessigsäure) von 0 mM, 9.1 mM, 15.1 mM bis 21.2 mM. Die PBG-Bildung wurde für sechs verschiedene Substratkonzentrationen (39.7 μM , 79.4 μM , 119.2 μM , 158.9 μM , 198.6 μM und 397.3 μM) bestimmt.

Die Inhibitionsmessungen eines einzelnen Inhibitors wurden mindestens dreimal wiederholt.

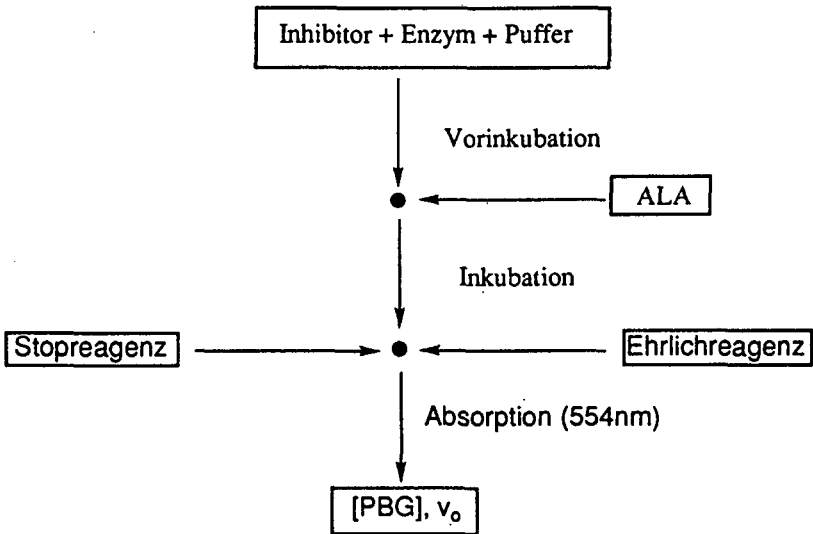


Abbildung 39.

7.4. Bemerkungen zum Enzym Assay

7.4.1. Wahl der Inkubationsbedingungen

Bei der Wahl der Inkubationsbedingungen stützten wir uns auf Untersuchungen von *E. Jaffe* [68]. Sie hatte gezeigt, dass in Anwesenheit von Zink(II) und durch Zugabe von Mg(II) in relativ hohen Konzentrationen die höchste Aktivität an PBGS erreicht werden kann. Das pH-Optimum

der PBGS aus *E. coli* in einem 0.1 molarem Phosphatpuffer (10 mM Mercaptoethanol, 30 μM Zink(II)chlorid, 10 mM ALA) liegt zwischen 7.5 - 8.0 [68].

Für unsere Untersuchungen wählten wir die folgenden Inkubationsbedingungen: Neben 12.3 mM Mercaptoethanol setzen wir dem 0.1 molaren Phosphatpuffer 10 μM Zn (II) und 10 mM Mg(II) zu. Die Untersuchung der pH Abhängigkeit dieses Puffers ergab - in Übereinstimmung mit den Resultaten von *Jaffe* - die höchste Enzymaktivität bei pH 8 (Abbildung 40).

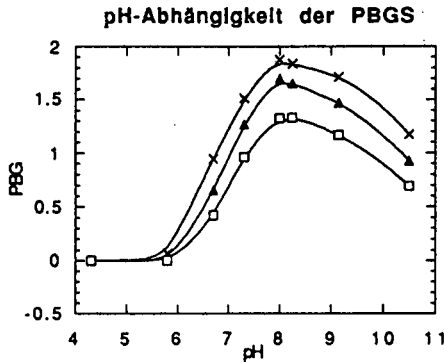


Abbildung 40: Die pH-Abhängigkeit der PBGS wird bei verschiedenen ALA-Konzentrationen (397 μM (oberste Kurve), 159 μM , 79 μM) gezeigt.

7.4.2. Wahl des Kosolvens

Gewisse Inhibitoren waren so unpolare, dass sie sich in Wasser resp. im Inkubationspuffer nicht lösen ließen. Aus diesem Grund wurde das Verhalten der Porphobilinogen Synthase gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln getestet. Als Kosolvens für unsere Inhibitoren kamen Dioxan, Aceonitril, DMF und DMSO in Frage. Dioxan zeigt schon bei einem Gehalt von 1.6% der Assay-Lösung eine Verminderung der Enzymaktivität. Die Absorptionswerte des Assays sanken um 15% im Vergleich mit den Werten, die im Parallelversuch ohne Zusatz von Dioxan gemessen wurden. Acetonitril hingegen aktiviert bei der gleichen Konzentration die Porphobilinogen Synthase bereits um 3%.

DMSO und DMF beeinflussten die Aktivität des Enzym bis zu einem Gehalt von 1.3% der Assaylösung nicht. Da die meisten nicht wasserlöslichen Inhibitoren in DMSO gelöst werden konnten, wurde dieses Kosolvens im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

7.4.3. Stabilität des Ehrlichreagenzkomplexes

Beim Enzymassay setzt man das PBG (5) mit dem Ehrlichreagenz (37) zu Chromophor 38 mit einem Absorptionskoeffizienten von $62'000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 554 nm um (Abbildung 41) [85].

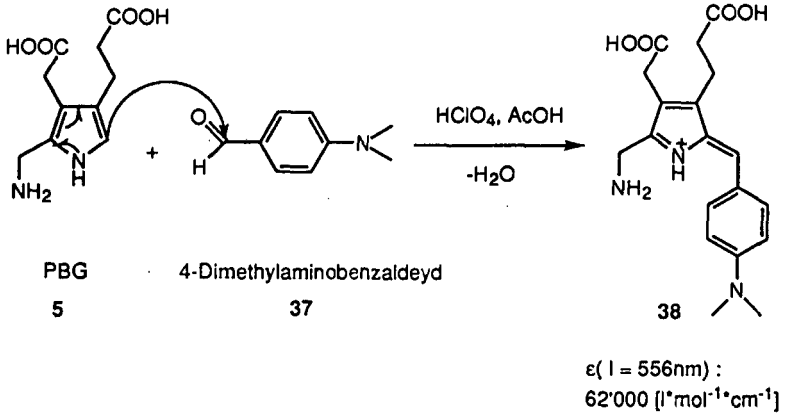


Abbildung 41.

Das VIS-Spektrum des Ehrlich-PBG-Komplexes 38 zeigt zwei Maxima, eines bei 524 nm und ein signifikant höheres bei 554 nm (Abbildung 42), welches zur Bestimmung von PBG (5) verwendet wird.

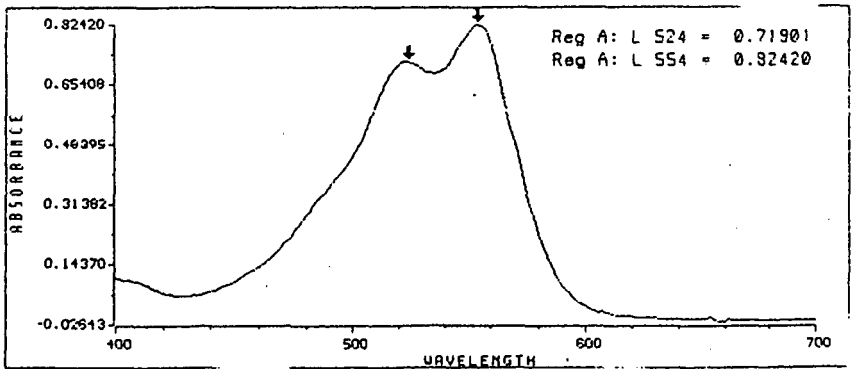


Abbildung 42: VIS-Spektrum des Ehrlich-PBG-Komplexes.

Die Stabilität dieses Chromophors wurde über eine Zeitspanne von 4.5 Stunden untersucht. Gemäss Abbildung bleibt der Chromophor während ca. 10 Minuten stabil, bevor er mit einer Halbwertszeit von 5 Stunden kontinuierlich zerfällt (Abbildung 43). Beim Enzymassay wurde die Absorption von 38 nach ca. 5-7 Minuten gemessen.

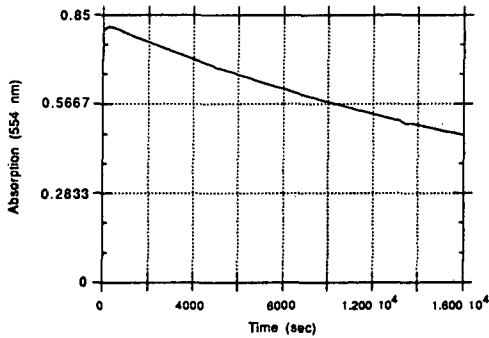
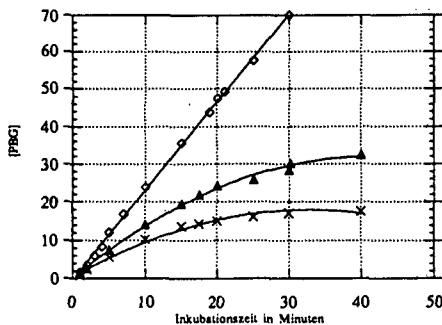


Abbildung 43: Zerfall des Ehrlich-PBG-Komplexes 38.

7.5. Auswertung der Inkubationsversuche

Sehr oft werden die kinetischen Messungen so durchgeführt, dass v_0 nach kleinem Umsatz der Substratmenge bestimmt wird. Es ist dann weder eine Akkumulation des Produkts noch ein zu hoher Verbrauch an Substrat zu befürchten, d.h. das Produkt nimmt linear mit der Zeit zu [75].

Bei unserem Enzymassay erstreckte sich die eingesetzte Substratkonzentration $[S_0]$ von $39.7 \mu\text{M}$ zu $397 \mu\text{M}$. Dieser Konzentrationsbereich wurde so gewählt, dass eine Kinetik nach Michaelis-Menten gewährleistet ist ($K_M = 40 \mu\text{M}$). Die minimal zu messende Absorption, welche zur Bestimmung der Menge an PBG erforderlich ist, beträgt dabei 0.2. Diese gestellte Anforderung bedingt, dass bei kleiner Substratkonzentration $[S_0]$ nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bereits ein wesentlicher Prozentsatz an Substrat verbraucht wird. Um zu überprüfen, welche Fehler durch die gewählten Bedingungen bei den Inhibitionsstudien begangen wurden, führten wir die folgenden Kontrollexperimente durch.

Abbildung 44: PBG im Laufe der Zeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen (39.7 (unterste Kurve), 79.4 und $397 \mu\text{M}$ ALA)

Bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen wurde der zeitliche Verlauf der PBG-Bildung in den ersten 40 Minuten verfolgt. Die Graphik zeigt klar, dass bei einer Substratkonzentration von 39.7 μM die Linearität nach 10 bis 15 Minuten verloren geht (Abbildung 44).

Zusätzlich wurde das kinetische Verhalten in Anwesenheit des Standardinhibitors Levulinsäure untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei höherer Inhibitorkonzentration die Linearität über längere Zeit erhalten bleibt (Abbildung 45).

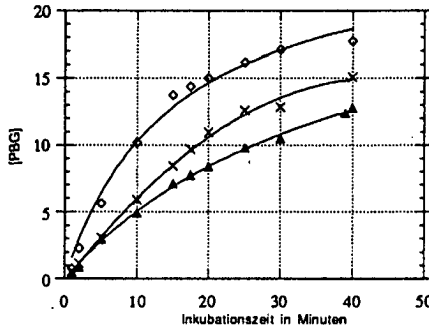


Abbildung 45: PBG-Bildung in Abhängigkeit der Zeit gezeigt bei einer Substratkonzentration von 39.7 μM und in Gegenwart von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (0 μM , 2550 μM , 4300 μM (unterste Kurve)).

Wir haben uns entschlossen zur Auswertung der kinetischen Daten nur die Werte zu berücksichtigen, bei welchen der Substratverbrauch kleiner als 50 % ist. Die so gemessene Geschwindigkeit hat eine Differenz von ca. 15 % im Vergleich zur Anfangsgeschwindigkeit v_0 . Diese Abweichung ist im gleichen Bereich, wie er bei kinetischen Messungen akzeptabel ist. Bei hoher Substratkonzentration wird dieser Fehler vernachlässigbar.

Berechnet man die Absorptionswerte bei einem Verbrauch von 50 % an ALA, so kommt man zu Daten, wie sie in Tabelle 12 aufgeführt sind. Absorptionen, welche bei der jeweiligen Substratkonzentration diese Werte überschritten, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Im Enzymassay eingesetztes ALA [μM]	Verbrauch von 50 % ALA [μM]	Bildung an PBG [μM]	Absorption A554
39.783	19.8915	9.94575	0.1792
79.466	39.733	19.8665	0.357
119.2	59.6	29.8	0.536

Tabelle 12.

7.5.1. Auswertungsschema der Levulinsäure (als Beispiel eines kompetitiven Inhibitors)

Levulinsäure (8) ist ein seit langem bekannter kompetitiver Inhibitor [14], den wir als Vergleichsubstanz wählen. Wir wollen anhand der Levulinsäure stellvertretend für alle in dieser Arbeit aufgeführten kompetitiven Inhibitoren die Berechnung der kinetischen Daten und der Bestimmung des Hemmtyps aufzeigen.

Um die kinetischen Daten für die PBGS zu erhalten, wurde der Umsatz an PBG in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Levulinsäure (0 μM , 1441 μM , 2882 μM und 5764 μM) nach einer Inkubationszeit von 14 Minuten bestimmt. Aus den gemessenen Absorptionen wurde die Anfangsgeschwindigkeit v_0 ermittelt (Schema 13). Der Extinktionskoeffizienten des PBG-Ehrlichreagenzkomplexes ($\epsilon = 62\,000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) ist bekannt [85], zusätzlich muss bei der Auswertung ein Verdünnungsfaktor ($n=3.333$) berücksichtigt werden.

$$v = \frac{dP}{dt} = \frac{n \times \text{ABS}}{\epsilon \times l \times t}$$

$l = 1\ \text{cm}$
 $\epsilon = 62\,000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$
 $t = 14\ \text{min}$
 $\text{ABS} = \text{Absorption (556 nm)}$
 $n = 3.33$

Schema 13: Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit ausgehend von den Absorptionen gemessen bei 554 nm.

Ausgehend von der Anfangsgeschwindigkeit und der eingesetzten Substratkonzentrationen kann über verschiedene graphische Auswertungen V_{max} und K_{mapp} bei der jeweiligen Inhibitorkonzentration bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurden die kinetischen Daten mit Hilfe von vier verschiedenen graphischen Auswertungen ("Hyperbel Plot", Auswertung nach Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee) bestimmt.

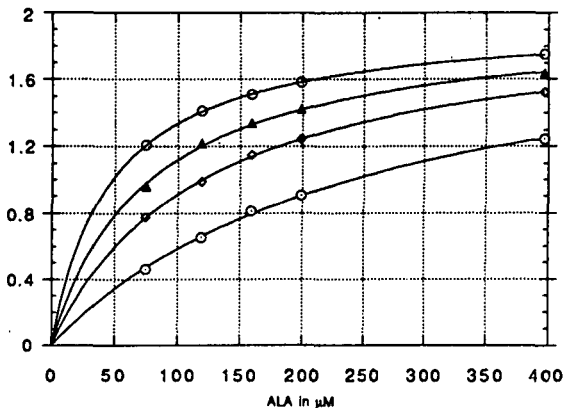


Abbildung 46: "Hyperbel Plot" (Geschwindigkeit gegen Substrat) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Levulinsäure (0 μM , 1441 μM , 2882 μM und 5764 μM (unterste Kurve)).

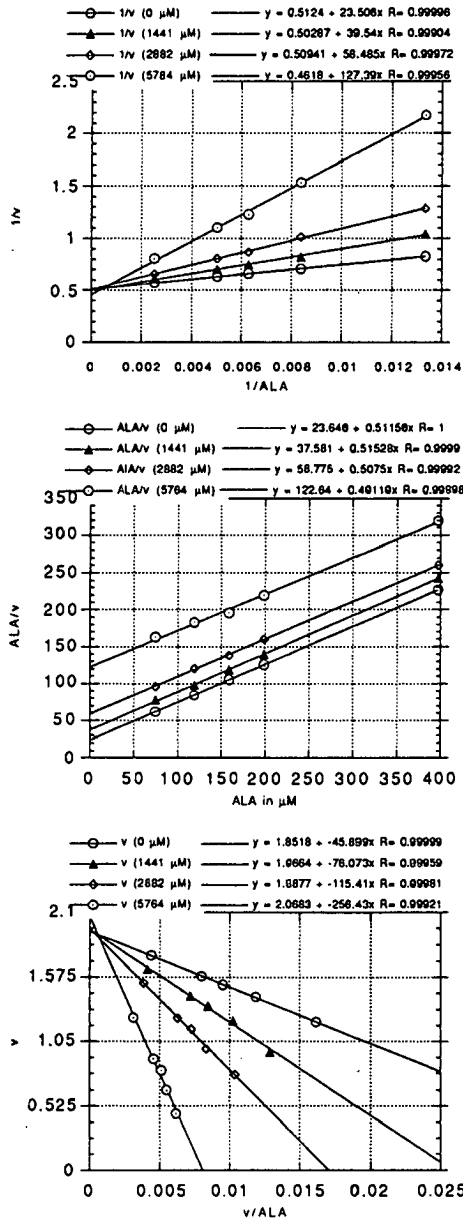


Abbildung 47: Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee Plot im Vergleich in Anwesenheit der Levulinensäure (0 μM, 1441 μM, 2882 μM und 5764 μM)

Die einfachste Art, kinetische Daten graphisch aufzuzeichnen, ist das Auftragen der Konzentration an ALA gegen die Anfangsgeschwindigkeit gemäss der Michaelis-Menten Gleichung (Abbildung 46). Im Gegensatz zu dem dabei resultierenden "Hyperbel Plot" zeigen die graphischen Auswertungen der anderen drei Plots keine Kurven sondern Geraden (Abbildung 47) [75]. Die Gleichungen, die den einzelnen Geraden der jeweiligen Plots zu Grunde liegen, sind in Schema 14 wiedergegeben. Die Herleitungen dieser Geradengleichungen beruhen auf mathematischen Umformungen der Michaelis-Menten Gleichung [81,82].

Michaelis-Menten	Lineweaver-Burk
$v = \frac{V_{\max} \times [ALA]}{K_{\text{mapp}} + [ALA]}$	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_{\text{mapp}}}{V_{\max}} \times \frac{1}{[ALA]}$
Hanes	Eadie-Hofstee
$\frac{[ALA]}{v} = \frac{K_{\text{mapp}}}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \times [ALA]$	$v = V_{\max} - \frac{v}{[ALA]} \times K_{\text{mapp}}$

Schema 14.

V_{\max} und K_{mapp} lassen sich beim Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee Plot aus der Geradensteigung und dem Achsenabschnitt ableiten. Beim Lineweaver-Burk Plot beispielsweise errechnet sich K_{mapp} aus dem Multiplikationsprodukt von V_{\max} und der Geradensteigung (Tabelle 13).

Levulin säure	y-Achsenabschnitt	(y-Achsenabschnitt) ⁻¹ = V_{\max}	Steigung	$V_{\max} \times \text{Steigung}$ = K_{mapp}
0 μM	0.5124	1.9516	23.506	45.87 (K_{m})
1441 μM	0.50287	1.98858	39.538	78.62
2882 μM	0.5094	1.96309	58.488	114.81
5764 μM	0.46179	1.78002	127.39	226.75

Tabelle 13.

Die aus den verschiedenen Plots berechneten Daten sind untereinander vergleichbar. In Tabelle 14 sind die aus den vier Auswertungen resultierenden V_{\max} und K_{mapp} aufgezigt.

Aus Tabelle 14 wird ersichtlich, dass der Wert von V_{\max} invariant von der eingesetzten Konzentration an Levulin säure ist, hingegen ist bei steigender Inhibitorkonzentration eine signifikante Zunahme des Wertes von K_{mapp} auszumachen. Dieses Verhalten von V_{\max} und K_{mapp} kennzeichnet einen kompetitiven Inhibitor.

Aus dem Verlauf der Geraden des Lineweaver-Burk, Hanes, aber auch des Eadie-Hofstee Plot kann ein kompetitiver Inhibitor direkt erkannt werden. Die Geraden beim Lineweaver-Burk Plot haben einen gemeinsamen y-Achsenabschnitt, beim Hanes Plot kommen sie parallel zu liegen. Kompetitive Inhibitoren wurden im Rahmen dieser Arbeit aufgrund des typischen Verhaltens von V_{\max} und K_{mapp} und mit Hilfe dieser beiden zuletzt genannten Plots identifiziert.

Levulinsäure	0 μM	1441 μM	2882 μM	5764 μM
V_{max} (1)	1.95	1.99	1.96	1.78
K_{mapp} (1)	45.87	78.62	114.81	226.75
K_i (1)		2018	1917	1461
V_{max} (2)	1.95	1.9	1.97	2.03
K_{mapp} (2)	46.22	72.89	115.81	249
K_i (2)		2497	1914	1309
V_{max} (3)	1.95	1.96	1.97	2.07
K_{mapp} (3)	45.90	76.07	115.41	256.43
K_i (3)		2191	1902	1256
V_{max} (4)	1.95	1.95	1.97	2.02
K_{mapp} (4)	45.95	74.24	115.91	245.18
K_i (4)		2341	1893	1324

Tabelle 14: Auswertung der kinetischen Daten mit der Levulinsäure als Inhibitor mittels Lineweaver-Burk (1), Hanes (2) und Eadie-Hofstee (3) und "Hyperbel Plot" (4).

Aus K_{mapp} kann bei der jeweiligen Konzentration an Levulinsäure bei den einzelnen Auswertungen K_i bestimmt werden. In Schema 15 ist diesbezüglich die Berechnung der K_i gezeigt. Für uns sind nicht die einzelnen K_i 's (Tabelle 14) von Bedeutung, sondern deren Mittelwerte (Tabelle 15).

$$K_{\text{mapp}} = K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \rightarrow K_i = \frac{1}{(K_{\text{mapp}} / K_m) - 1} \times [I]$$

Schema 15

Levulinsäure	Lineweaver-Burk	Hanes	Eadie-Hofstee	"Hyperbel Plot"
Mittelwerte der K_i 's	1798 μM	1906 μM	1783 μM	1852 μM

Tabelle 15: Mittelwerte der K_i von Levulinsäure im Vergleich.

Zur Bestimmung von K_i kann ein Sekundärplot zum Lineweaver-Burk Plot angewendet werden [81]. Trägt man die Geradensteigung des primären Plots (siehe Abbildung 47 und Tabelle 16) gegen die Inhibitorkonzentration auf, resultiert eine Gerade (Abbildung 48), aus deren Achsenabschnitt und Steigung sich K_i (883 μM) direkt berechnen lässt (Schema 16).

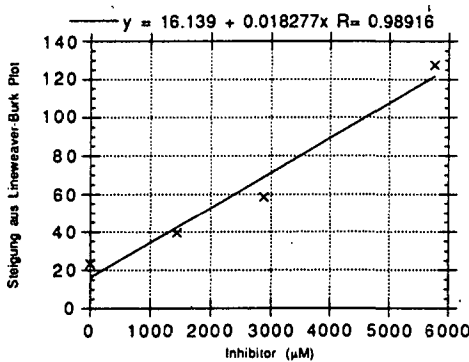


Abbildung 48.

Levulinsäure	0 µM	1441.03 µM	2882.07 µM	5764.15 µM
Steigung	23.506	39.538	58.488	127.39

Tabelle 16.

$$\text{Steigung} = y = \frac{K_m}{V_{max} \times K_i} \times [I] + \frac{K_m}{V_{max}}$$

Schema 16.

7.5.2. Auswertungsschema der 4,6-Dioxoheptansäure (als Beispiel eines unkompetitiven Inhibitors)

4,6-Dioxoheptansäure (10) ist das nicht natürliche Abbauprodukt von Tyrosin und wurde aus dem Urin von Patienten isoliert, die an Tyrosinämie litten. 4,6-Dioxoheptansäure (10) wurde in der Literatur als sehr guter Inhibitor beschrieben [49-51,64]. Bei der Porphobilinogen Synthase aus *Escherichia coli* verhält sich 10 als unkompetitiver Inhibitor. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten u.a. verschiedene Diketone unkompetitives Inhibitionsverhalten (siehe Kapitel 8.4.). Stellvertretend wollen wir hier am Beispiel von 10 die kinetischen Daten auswerten.

Die Berechnung von K_{mapp} und V_{max} erfolgt wie bei der Levulinsäure aus den verschiedenen graphischen Auswertungen (Geradensteigung und Achsenabschnitt). Die dabei resultierenden kinetischen Daten sind untereinander vergleichbar (Tabelle 17).

Die Werte von V_{max} und K_{mapp} nehmen mit zunehmender Inhibitorkonzentration kontinuierlich ab. Dies ist ein Merkmal für unkompetitive Inhibition. Ebenfalls kann mit den drei Plots, die Geraden liefern, ein unkompetitiver Inhibitor als solcher identifiziert werden. Hingegen liefert der "Hyperbel Plot" auch bei einer unkompetitiven Inhibition ausschliesslich die kinetischen Werte für K_{mapp} und V_{max} . Wir haben anhand der Geradenführung des Lineweaver-Burk und des Hanes Plot die unkompetitiven Inhibitoren bestimmt. Beim Lineweaver-Burk Plot liegen die Geraden parallel zueinander, beim Hanes Plot haben sie im Idealfall einen gemeinsamen Achsenabschnitt (Abbildung 49).

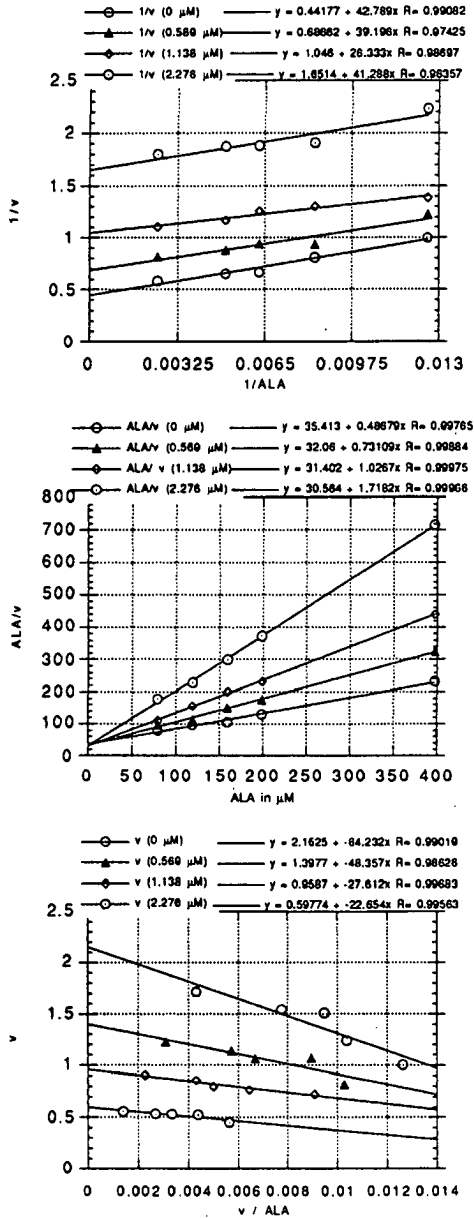


Abbildung 49: Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee Plot im Vergleich in Anwesenheit der 4,6-Dioxiheptansäure (0 μM, 0.569 μM, 1.138 μM und 2.276 μM).

4,6-Dioxoheptansäure	0 μM	0.569 μM	1.138 μM	2.276 μM
$V_{\text{max}}(1)$	2.26	1.46	0.96	0.61
$K_{\text{mapp}}(1)$	96.87	57.09	27.09	25.00
$K_i(1)$		0.816	0.442	0.792
$V_{\text{max}}(2)$	2.05	1.37	0.97	0.58
$K_{\text{mapp}}(2)$	72.75	43.85	30.59	17.79
$K_i(2)$		0.863	0.826	0.737
$V_{\text{max}}(3)$	2.15	1.40	0.96	0.60
$K_{\text{mapp}}(3)$	84.22	48.36	27.51	22.65
$K_i(3)$		0.767	0.552	0.837
$V_{\text{max}}(4)$	2.12	1.40	0.96	0.60
$K_{\text{mapp}}(4)$	79.75	48.17	28.57	22.36
$K_i(4)$		0.343	0.408	0.887

Tabelle 17: Kinetische Daten der 4,6-Dioxoheptansäure basierend auf dem Lineweaver-Burk (1), Hanes (2), Eadie-Hofstee Plot(3) und "Hyperbel Plot" (4) im Vergleich.

Aus K_{mapp} lassen sich die K_i 's für die einzelnen Konzentrationen der 4,6-Dioxoheptansäure ausrechnen (Schema 17).

$$K_{\text{mapp}} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \rightarrow K_i = \frac{1}{\left(\frac{K_m}{K_{\text{mapp}}}\right) - 1} \times [I]$$

Schema 17.

Die so errechneten Mittelwerte der verschiedenen Auswertungen für 4,6-Dioxoheptansäure sind in Tabelle 18 aufgeführt.

4,6-Dioxoheptansäure	Lineweaver-Burk	Hanes	Eadie-Hofstee	"Hyperbel Plot"
Mittelwerte der K_i 's	0.683 μM	0.808 μM	0.719 μM	0.546 μM

Tabelle 18: Mittelwerte der K_i von 4,6-Dioxoheptansäure im Vergleich.

Wiederum kann mittels eines Sekundärplots K_i direkt ermittelt werden. Der inverse Wert vom K_{mapp} wird gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen (Tabelle 19). Aus Achsenabschnitt und Steigung der resultierenden Geraden lässt sich K_i (0.92 μM) und K_m (79.4 μM) ermitteln (Abbildung 50 und Schema 18).

4,6-Dioxoheptansäure	0 μM	0.569 μM	1.138 μM	2.276 μM
K_{mapp}^{-1}	0.0103	0.01751	0.0369	0.0399

Tabelle 19.

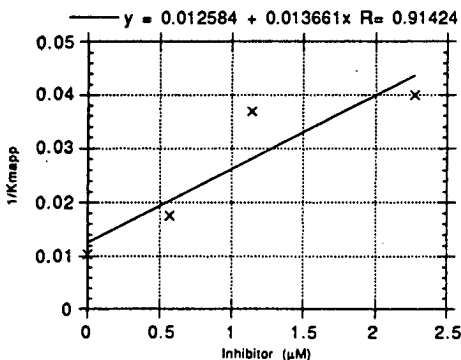


Abbildung 50.

$$\frac{1}{K_{mapp}} = \frac{1}{K_i K_m} \times [I] + \frac{1}{K_m}$$

Schema 18.

7.5.3. Differenzierung zwischen "Slow Binder" und irreversiblen Inhibitor gezeigt am Beispiel des 2-Nitrobenzaldehyd

Bei gewissen Inhibitoren wie bei 2-Nitrobenzaldehyd (39) zeigt das Verhalten der Geraden des Lineweaver Burk, Hanes und Eadie Hofstee Plot eine gemischte Inhibition (Abbildung 51).

Die kinetischen Daten in Anwesenheit von 2-Nitrobenzaldehyd zeigen weder das typische Verhalten eines kompetitiven noch eines unkompetitiven Inhibitors (Tabelle 20). Die Werte von K_{mapp} bleiben bei ansteigender Inhibitorkonzentration konstant, wobei die Werte von V_{max} tendenziell abnehmen. Dieses Verhalten der kinetischen Daten werden bei "nonkompetitiven" und irreversiblen Inhibitoren beobachtet [81].

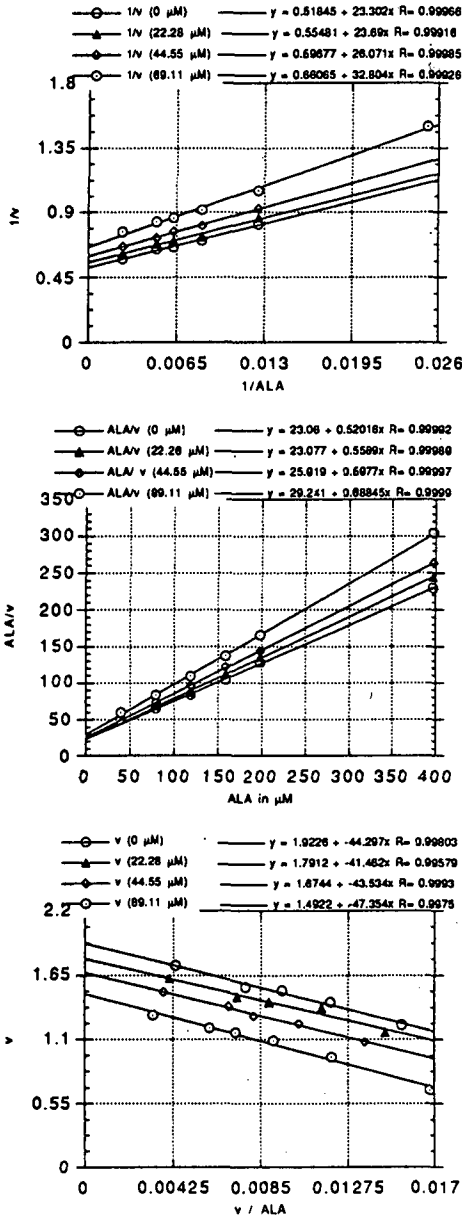


Abbildung 51: Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee Plot im Vergleich in Anwesenheit des 2-Nitrobenzaldehyds (0 μM, 22.28 μM, 44.55 μM und 89.11 μM).

2-Nitrobenzaldehyd	0 μM	22.28 μM	44.55 μM	89.10 μM
Vmax(1)	1.93	1.80	1.67	1.51
K _{m_{app}} (1)	44.95	42.70	43.69	49.65
Vmax(2)	1.92	1.79	1.67	1.45
K _{m_{app}} (2)	44.32	41.29	43.36	42.47
Vmax(3)	1.92	1.79	1.67	1.49
K _{m_{app}} (3)	44.2	41.46	43.53	47.36
Vmax(4)	1.92	1.79	1.67	1.47
K _{m_{app}} (4)	44.08	41.22	43.52	45.09

Tabelle 20: Auswertung der kinetischen Daten mit 2-Nitrobenzaldehyd als Inhibitor mittels Lineweaver-Burk (1), Hanes (2) und Eadie-Hofstee (3) und Hyperbel Plot (4).

Bei potentiellen irreversiblen Inhibitoren wie dem 2-Nitrobenzaldehyd kann die Irreversibilität mit Hilfe eines Kontrollversuchs (Variieren der Vorinkubationszeit) leicht erkannt werden. Ist die Abnahme der Aktivität bei gleicher Inhibitorkonzentration proportional zur Vorinkubationszeit, kann auf einen irreversiblen Inhibitor geschlossen werden (Tabelle 21).

Vorinkubation [min]	2-Nitrobenzaldehyd [μM]	ALA [μM] Inkubation 14 min	Absorption (554 nm)	Vorinkubation [min]	2-Nitrobenzaldehyd [μM]	ALA [μM] Inkubation 14 min	Absorption (554 nm)
20	0	397	0.446	20	0	79	0.302
20	108	397	0.342	20	108	79	0.260
81	0	397	0.459	81	0	79	0.308
81	108	397	0.244	81	108	79	0.179

Tabelle 21: Ausschnitt aus dem Versuch für die Bestimmung des irreversiblen Verhaltens von 2-Nitrobenzaldehyd. (PBGS: Enzymprobe: ca. 1.1 mg PBGS in 100 ml Inkubationspuffer gelöst; Endvolumen: 1.5 ml (ALA + 400 μl PBGS-Lösung + Inhibitor + Inkubationspuffer))

Aus diesem Test folgt, dass 2-Nitrobenzaldehyd ein irreversibler Inhibitor oder ein "Slow Binder" ist. Dialyseversuche erlauben zwischen diesen beiden Hemmtypen zu unterscheiden. Das vorinkubierte Enzym-Inhibitorengemisch wird dabei während mehrerer Stunden bei 4°C dialysiert. Der Dialyseversuch von 2-Nitrobenzaldehyd dauerte 45 Stunden und es konnten 80 % der spezifischen Aktivität regeneriert werden (siehe auch Kapitel 7.10.).

7.6. Inhibitionsergebnisse der Substratanaloga

Ausgehend vom Standardinhibitor, der Levulinsäure (8), wollen wir die Wertebereiche der K_i 's festlegen, nach denen wir einen Inhibitor als einen excellenten, sehr guten, guten oder schwachen Inhibitor bezeichnen (Tabelle 22). Levulinsäure (8) ist mit einem K_i von 2'220 μM ein guter Inhibitor. Die Inhibitionskonstante eines excellenten Inhibitors liegt im gleichen Wertebereich wie die Michaeliskonstante ($K_m = 50 \mu\text{M}$).

	K_i
Excellenter Inhibitor	$\mu\text{M} < X < 100 \mu\text{M}$
Sehr guter Inhibitor	$\mu\text{M} < X < 1'000 \mu\text{M}$
Guter Inhibitor	$\mu\text{M} < X < 10'000 \mu\text{M}$
Schwacher Inhibitor	$10'000 \mu\text{M} < X < 100'000 \mu\text{M}$

Tabelle 22.

Alle die in Tabellen 25 - 34 mit einem Stern (*) versehenen Inhibitionskonstanten gelten als nicht gesichert.

In diesem Kapitel werden die Inhibitionsresultate der Substratanaloga der ALA gezeigt. ALA wurde in den Positionen 1 bis 5 modifiziert.

7.6.1. Variation in Position 1

Die beiden Nitroanaloga 40 und 41 waren die mit Abstand besten kompetitiven Inhibitoren, wobei die zusätzliche Einführung der Hydroxygruppe in Position 5 nur geringen Einfluss auf die Inhibitionskonstante hatte.

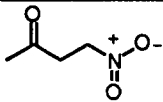
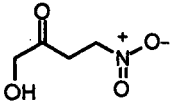
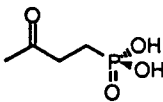
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	40	50 μM	28 μM	kompetitiv
	41	44 μM	17 μM	kompetitiv
	42	57 μM	34'400 μM	kompetitiv

Tabelle 23.

Ein K_i -Wert von 15 μM resp. 28 μM bedeutet, dass die Nitroanaloga die enzymatische Reaktion ungefähr 100 mal stärker hemmen als die Levulinsäure und rund 2 mal besser erkannt werden als ALA (4). Das Phosphonsäureanalogon 42 erwies sich im Enzymtest nur als sehr schwacher Inhibitor ($K_i = 34'400 \mu\text{M}$).

7.6.2. Variation in Position 2

Die ungesättigten β -Acetylacrylanaloga 43 und 44 sind keine Inhibitoren der PBGS. Dennoch wurde eine plötzliche Abnahme der PBG-Bildung ab einer Konzentration an 44 von 7'700 μM beobachtet. In Anwesenheit von 44 konnte das Quecksilbersalz nur noch partiell gefällt werden, was danach wahrscheinlich eine Zersetzung des Ehrlichreagens ergab.

2-Hydroxylevulinsäure (45) ist ein guter unkompetitiver Inhibitor mit einem K_i von 4'130 μM .

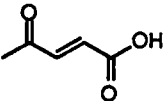
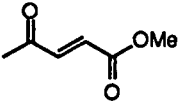
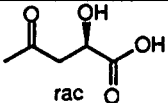
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	43	59 μM	–	kein Inhibitor
	44	52 μM	–	kein Inhibitor
	45	61 μM	4'130 μM	unkompetitiv/ gemischt

Tabelle 24.

7.6.3. Variation in Position 3

Veränderungen in Position 3 brachten nur mässige bis schlechte Inhibition mit sich. Acetylglycin (46) weist ein K_i von 18'700 μM auf. Die Einführung einer Ethoxycarbonyl- (47) resp. einer Azidogruppe (48) führen ebenfalls nur zu mässigen Inhibitoren. Die Azidogruppe von 48 wird wahrscheinlich im Inkubationspuffer partiell zur Aminogruppe reduziert.

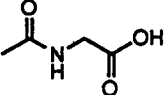
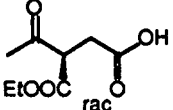
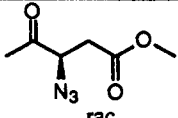
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	46	49 μM	18'700 μM	kompetitiv
	47	54 μM	23'400 μM	kompetitiv
	48	47 μM	12'400 μM^*	kompetitiv

Tabelle 25.

7.6.4. Variation in Position 4

Das Weglassen der Carbonylgruppe führt zu äusserst schlechten Inhibitoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde 5-Aminovaleriansäure (49) und 4-Nitrobutan (50) getestet, welche beide mit K_i 's von 90'420 μM resp. 55'100 μM sehr hohe Werte aufweisen und daher schwache kompetitive Inhibitoren sind (Tabelle 26).

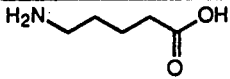

Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	49	56 μM	90'400 μM^*	kompetitiv
	50	61 μM	55'100 μM	kompetitiv

Tabelle 26.

7.6.5. Variation in Position 5

Die meisten Substratanaloga, die im Enzymassay getestet wurden, waren in Position 5 modifiziert. Levulinsäure (8) besitzt ein K_i von 2'220 und ist ein guter kompetitiver Inhibitor. Die korrespondierenden Ester 9 und 51 hemmen das Enzym nicht. Hingegen kann man in Anwesenheit des Benzylesters 52 eine Aktivierung der PBGS feststellen. Ebenfalls 53 aktivierte die PBGS (Tabelle 27).

Im Kontrollversuch konnte gezeigt werden, dass 5-Azidolevulinsäuremethylester (54) im Inkubationspuffer partiell zu 5-Aminolevulinsäuremethylester reduziert und zum veresterten PBG umgesetzt wird.

Die Einführung einer Hydroxy- oder Nitrogruppe wirkt sich auf die Hemmung der PBGS signifikant aus, wobei die freien Säuren 55 und 58 die ungefähr 20mal besseren Inhibitoren im Vergleich mit ihren korrespondierenden Methylestern 56 und 59 sind. Bei 55 und 56 handelt es sich um kompetitive Inhibitoren, hingegen ist die 5-Nitrolevulinsäure (58) ein unkompetitiver oder gemischter Inhibitor. Der 5-Nitrolevulinsäuremethylester (59) wird als schwacher kompetitiver Inhibitor identifiziert. Bei 59 besteht aber auch der Verdacht auf einen "Slow Binder" (Tabelle 28).

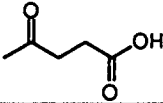
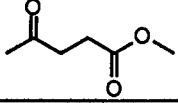
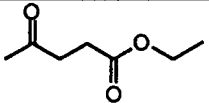
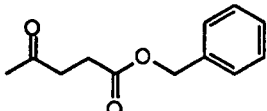
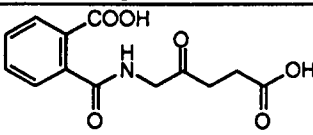
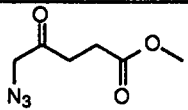
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	8	46 μM	2'220 μM	kompetitiv
	51	60 μM	-	kein Inhibitor
	9	47 μM	-	kein Inhibitor
	52	60 μM	-	Aktivator
	53	43 μM	-	Aktivator
	54	65 μM	-	Azidogruppe wird partiell zur Aminogruppe reduziert.

Tabelle 27.

5-Oximolevulinic acid (57) wird mit einem K_i von 1048 ungefähr zweimal so gut erkannt wie die Levulinic acid (8).

Führt man in Position 5 eine Carboxylatgruppe resp. eine Acetatgruppe ein, erhält man 2-Oxoglutaric acid (60) resp. 3-Oxoadipic acid (61). 60 und 61 werden im Vergleich zur Levulinic acid (8) viermal resp. fünfmal schlechter von der PBGS erkannt.

5-Cyanolevulinic acid methyl ester (62) weist sich im Enzym Assay durch irreversibles Verhalten aus. In einem Dialyseversuch konnte aber gezeigt werden, dass es sich bei 62 um einen "Slow Binder" handelt.

Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	55	56 μM	333 μM	kompetitiv
	56	50 μM	5'800 μM	kompetitiv
	57	57 μM	1'050	kompetitiv
	58	53 μM	711 μM	unkompetitiv
	59	54 μM	17'100 μM	kompetitiv/ ("slow binder")*
	60	57 μM	8'450 μM	kompetitiv
	61	60 μM	10'400 μM *	kompetitiv
	62	60 μM	-	"slow binder"

Tabelle 28.

7.7. Inhibitionsergebnisse der Zwischenproduktanaloga

In Tabelle 29 sind alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten Diketone aufgeführt. Alle Diketone zeigen ein unkompetitives Verhalten. 4,6-Oxoheptansäure (10) ist mit Abstand der beste Inhibitor in dieser Reihe ($K_i = 1.4 \mu\text{M}$). Der korrespondierende Methylester 24 ist mit einem K_i von 319 μM der um das 300fache schlechtere Inhibitor als 10, aber noch immer ein sehr guter Inhibitor. Acetylaceton (64) und 2-Acetylcyclohexanon (65) werden von der PBGS gut erkannt. Das Homolog von 64, Acetylaceton (66), ist im Vergleich zu Acetylaceton der deutlich schlechtere Inhibitor.

Mesityloxid (67) und 2,4-Pentandiol (68), die 64 strukturell sehr nahe kommen, sind keine Inhibitoren. Hingegen ist das Lithiumsalz des Acetylacetat (69) ein schlechter kompetitiver Inhibitor ($K_i = 39'500 \mu\text{M}$). Auch 63 verhält sich als kompetitiver Inhibitor.

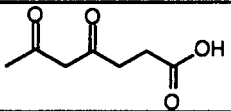
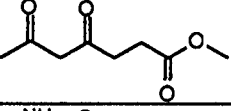
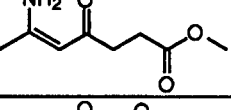

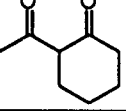
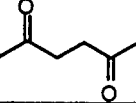
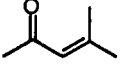
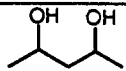
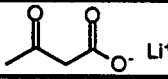
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	10	70 μM	1.4 μM	unkompetitiv
	24	62 μM	319 μM	unkompetitiv
	63	56 μM	2'610 μM^*	kompetitiv
	64	76 μM	3'679 μM	unkompetitiv
	65	60 μM	5'520 μM	unkompetitiv
	66	45 μM	24'910 μM	unkompetitiv
	67	58 μM	-	Aktivator
 Diastereoisomerengemisch	68	45 μM	-	kein Inhibitor
	69	39 μM	39'500 μM	kompetitiv

Tabelle 29.

Die Zwischenproduktanaloga 12 und 13 sind Enantiomerenpaare, bei denen die Seitenketten, welche die Carbonsäuregruppen tragen, unlike (bei 13) und like (bei 12) stehen (Tabelle 30). 12 und 13 sind aufgrund ihrer K_i 's schwache Inhibitoren, wobei eine zuverlässige Interpretation schwierig ist, denn bei hoher Substratkonzentration erhöhen 12 und 13 die Aktivität des Enzyms.

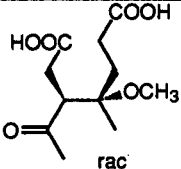
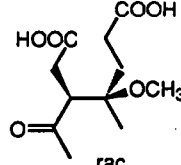
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
 <p>rac</p>	12	56 μM	17'000 μM^*	kompetitiv/ Aktivator
 <p>rac</p>	13	52 μM	11'900 μM^*	kompetitiv/ Aktivator

Tabelle 30.

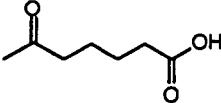
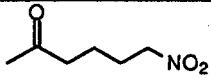
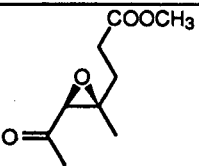
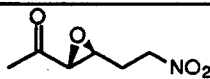
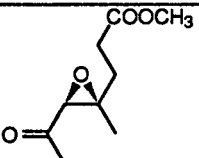
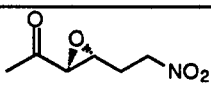
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	20	56 μM	10'800 μM	kompetitiv
	21	48 μM	8'790 μM	kompetitiv
	22	53 μM	-	irreversibel
	23	52 μM	3'490 μM^*	kompetitiv*/ irreversibel
	70	69 μM	-	irreversibel
	71	56 μM	-	irreversibel

Tabelle 31.

6-Oxoheptansäure **20** ist mit einem K_i von $10'800 \mu\text{M}$ ein schwacher Inhibitor. Der Austausch der Carboxylatgruppe durch eine Nitrogruppe (**21**) ergibt keine wesentlich bessere Inhibition.

Sämtliche Epoxide (**22,23,70** und **71**) zeigen irreversibles Verhalten. In einem Kontrollexperiment konnte gezeigt werden, dass die chiralen Verbindungen **23** und **71** in gleichem Masse vom Enzym erkannt werden. Ein ungesichertes Resultat besagt, dass **71** ebenfalls kompetitives Verhalten zeigt (Tabelle 31).

In einem Dialyseversuch konnte in Anwesenheit von **70** die Aktivität der PBGS nicht vollständig regeneriert werden, was auf einen irreversiblen Inhibitor hindeutet (siehe Kapitel 7.10.).

Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	72	$53 \mu\text{M}$	$8'600 \mu\text{M}$	kompetitiv
	73	$60 \mu\text{M}$	$12'400 \mu\text{M}$	kompetitiv
	74	$57 \mu\text{M}$	$12'500 \mu\text{M}$	kompetitiv
	75	$50 \mu\text{M}$	$10'700 \mu\text{M}$	kompetitiv
	76	$50 \mu\text{M}$	$11'500 \mu\text{M}$	kompetitiv
	77	$49 \mu\text{M}$	$12'500 \mu\text{M}$	kompetitiv
	78	$51 \mu\text{M}$	$26'000 \mu\text{M}$	kompetitiv

Tabelle 32.

Pimelinsäure (**73**) ist ein schwacher Inhibitor ($K_i = 12'400 \mu\text{M}$). Durch die Einführung einer Ketogruppe in Position 4 erreicht man eine Erhöhung der Erkennung durch die PBGS um den Faktor 1.5. 4-Oxopimelinsäure (**72**) weist ein K_i von $8'600 \mu\text{M}$ auf.

Die Inhibitionskonstanten der Bernsteinsäure (**74**), Fumarsäure (**75**), Maleinsäure (**76**) und Phtalsäure (**77**) liegen im gleichen Wertebereich.

Der Ersatz der einen Carbonsäuregruppe der Phthalsäure (**77**) durch eine Nitrogruppe hat eine signifikante Abnahme bezüglich der Erkennung durch die PBGS zur Folge.

7.8. Inhibitionsergebnisse von aromatischen Nitrocarbonylverbindungen

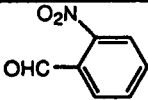
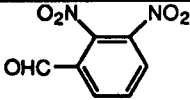
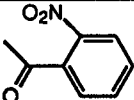
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	39	46 μM	-	"slow binder"
	79	50 μM	-	irreversibel/ "slow binder"
	80	55 μM	10'400 μM^*	kompetitiv

Tabelle 33.

Die aromatischen Nitroverbindungen 39 und 79 sind Aldehyde und zeigen im Enzym Assay ein Verhalten eines irreversiblen Inhibitors. Nach einem Dialyseversuch von 39 konnte aber die Aktivität der PBGS wieder zurückgewonnen werden. 39 ist ein "Slow Binder". 2-Nitrobenzophenon (80) hingegen zeigt kompetitives Verhalten.

7.9. Inhibitionsergebnisse der Produktanaloga

In der Reihe der Produktanaloga erwiesen sich die Azaanaloga des Mixed-Pyrrols (81) und des PBG (82) als die effizientesten Inhibitoren.

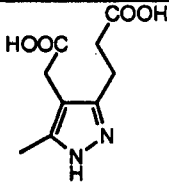
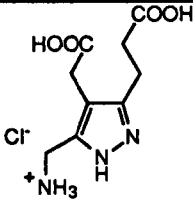
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	81	59 μM	10'600 μM	kompetitiv
	82	48 μM	5'730 μM^*	kompetitiv

Tabelle 34 a.

Chlorpyrrol (83) und Thioimidazolylsäure 84 werden von der PBGS äusserst schwach erkannt. Hämaminsäure (85) ist ebenfalls ein schwacher Inhibitor. Die 4-Maleinimidobutansäure (86) zeigt bis zu einer Konzentration von 2'800 μM keine Inhibition. Bei höherer Konzentration

nimmt der Umsatz an PBG rasch ab, was aber wahrscheinlich auf eine Reaktion zwischen 86 und ALA zurückzuführen ist.

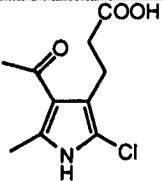
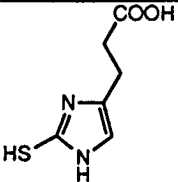
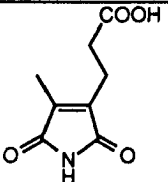
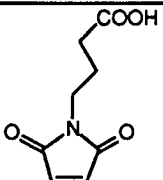
Struktur	Nr.	K_m	K_i	Hemmtyp
	83	57 μM	27'100 μM	kompetitiv
	84	54 μM	27'400 μM	kompetitiv
	85	59 μM	13'200 μM	kompetitiv
	86	52 μM	-	kein Inhibitor

Tabelle 34 b.

7.10. Dialyseversuche von einer Auswahl irreversibler Inhibitoren

Wie man aus den Inhibitionsresultaten erkennen kann, zeigen eine Reihe von Molekülen (22, 23, 39, 62, 63, 70, 71) irreversibles Verhalten im Enzymtest. Eine Auswahl dieser Moleküle wurde im Dialyseversuch getestet (Tabelle 35).

	Spezifische Aktivität (Beginn)	Spezifische Aktivität (final)	Dauer
2-Nitrobenzaldehyd (39)	4.4 (18 %)	9.5 (47 %)	16 Stunden
Kontrollexperiment (ohne Inhibitor)	23.8 (100 %)	20.2 (100 %)	16 Stunden
2-Nitrobenzaldehyd (39)	6.1 (19 %)	24.6 (80 %)	45 Stunden
Kontrollexperiment (ohne Inhibitor)	32.6 (100 %)	30.7 (100 %)	45 Stunden
5-Cyanolevulinsäuremethylester (62)	12.6 (60 %)	20.9 (97 %)	45 Stunden
Kontrollexperiment (ohne Inhibitor)	20.9 (100 %)	21.6 (100 %)	45 Stunden
(4S,5R)-Epoxi-4-Methyl-6-oxo- octansäuremethylester (70)	8.65 (44 %)	15.08 (64 %)	98 Stunden
Kontrollexperiment (ohne Inhibitor)	19.6 (100 %)	23.51 (100 %)	98 Stunden

Tabelle 35.

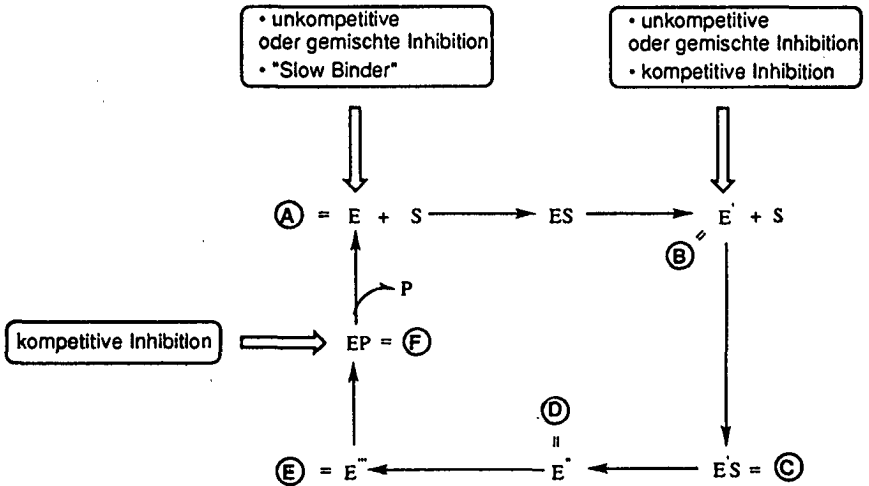
Bei den durchgeführten Dialyseversuchen konnte klar gezeigt werden, dass 62 und 39 reversibel an die PBGS binden, wogegen in Gegenwart von 70 die Aktivität der PBGS trotz Ersetzen des Puffers und hoher Dialysezeit nicht gänzlich regeneriert werden kann. So könnte es sich bei 70 um einen "wahren" irreversiblen Inhibitor handeln. Auch bei den Epoxiden 22, 23 und 71, welche im Inhibitionstest irreversibles Verhalten zeigen, dürfte ähnliches Dialyseverhalten erwartet werden.

8. DISKUSSION DER INHIBITIONSRESULTATE

8.1. Mechanistische Arbeitshypothese

Für das Aufstellen der Arbeitshypothese gehen wir von folgenden Beobachtungen aus:

- 1) Die Porphobilinogen Synthase enthält zwei Erkennungsstellen für die beiden Substrate (A-Site und P-Site) [14].
- 2) Die P-Site enthält ein Lysin und bildet mit ALA eine Schiffsche Base aus [87].
- 3) Aus Dialyseversuchen konnte geschlossen werden, dass die Dissoziationskonstante für die A-Site grösser ist als die für die P-Site [48].
- 4) Die Sequenz der Erkennung der beiden ALA ist: zuerst Erkennung an der P-Site, dann an der A-Site [22].
- 5) Zusätzlich weisen Metallbindungsstudien daraufhin, dass mindestens zwei verschiedene Bindungsstellen für Metalle vorhanden sind [40]. Im Falle der PBGS von *Escherichia coli* wird postuliert, dass ein Metall für die Katalyse mitverantwortlich ist (Zn_A , welches mit der A-Side ALA in Wechselwirkung treten soll). Dem zweiten Metall (Zn_B) wird eine strukturelle Funktion zugeordnet. Eine Reaktion zwischen 5-Chlorlevulinsäure mit der PBGS aus *Escherichia coli* deutet daraufhin, dass diese Metallbindungsstelle in der Nähe der P-Site lokalisiert ist [16,88].
- 6) In NMR-Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Produkt an der PBGS gebunden ist [89]. Aus diesen Daten ergibt sich eine Minimalvorstellung über die Active Site und über den Mechanismus der Porphobilinogen Synthase (siehe Abbildung 52). Die Schritte, die von A nach C führen, lassen sich direkt aus den oben erwähnten Beobachtungen ableiten. Der Enzymproduktkomplex F konnte von *Jaffe* nachgewiesen werden [89]. Die beiden Schritte, die von D nach E führen, entsprechen dem Vorschlag von *Jordan* [15].



Schema 19: Vorgeschlagene Interventionsstellen der Inhibitoren.

K_M beschreibt ausschliesslich die Dissoziationskonstante des zweiten Substrats, welches an die A-Site bindet. Daraus folgt, dass Substratanaloga, die rein kompetitives Verhalten zeigen, mit der A-Side ALA konkurrieren (Schema 19). Unkompetitive und gemischte Inhibitoren können sowohl an die A-Site wie an die P-Site binden. "Slow Binder" hingegen binden nur an die P-Site. Von den Produktanaloga ist ein kompetitives Verhalten zu erwarten.

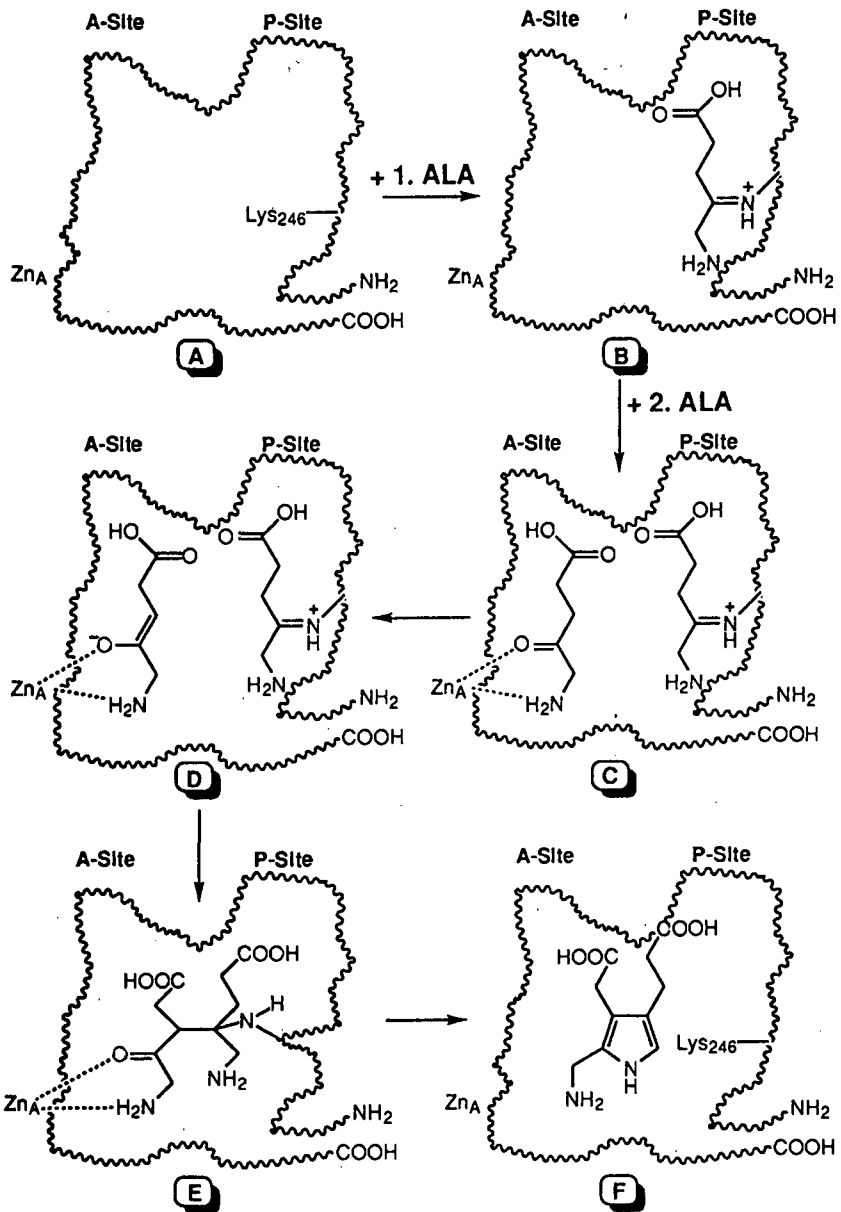


Abbildung 52.

8.2. Diskussion der Inhibitionsresultate der Substratanaloga

Ausgehend von unseren mechanistischen Vorstellungen ist das Inhibitionsverhalten der Substratanaloga nur eine Funktion der Besetzung durch den Inhibitor an der A-Site der PBGS. Diese Inhibitoren konkurrieren dabei mit dem zweiten Substrat um die Bindungsstelle (Abbildung 53).

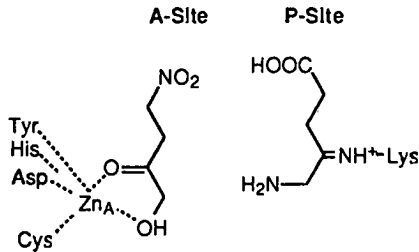


Abbildung 53: Vorgeschlagene Bindung der kompetitiven Substratanaloga gezeigt am Beispiel des 1-Hydroxy-4-nitro-2-butanon.

Die PBGS der *Escherichia coli* erkennt die Carboxygruppe des Substrates resp. der Substratanaloga sehr gut. Ersetzt man die Carboxyfunktion der Levulinsäure mit einer Phosphonsäuregruppe oder einer Nitrogruppe, so hat das drastische Auswirkungen auf die Erkennung durch die PBGS zur Folge.

4-Nitro-2-butanon (40) und 1-Hydroxy-4-nitro-2-butanon (41) erwiesen sich im Rahmen dieser Arbeit als die deutlichsten kompetitiven Inhibitoren. 40 und 41 zeigen im Vergleich zur Levulinsäure ungefähr die 1000 mal kleineren K_i 's. Offensichtlich sorgt die Nitrogruppe anstelle der Carboxygruppe für die signifikant bessere Hemmung. *Bright et al.* beobachteten [90], dass der Ersatz der Carboxyfunktion durch eine Nitrogruppe bei mehreren Enzymen zu starken Hemmungen führte. Bei den von *Bright* aufgeführten Enzymen wird durch Deprotonierung der Nitrogruppe eines gegebenen Inhibitors der Übergangszustand des enzymkatalysierten Prozesses imitiert, was zu starken Inhibitionen führt [91,92].

Die Nitroanionen von 4-Nitro-2-butanon (40) und 1-Hydroxy-4-nitro-2-butanon (41) sind keine Übergangzustandanaloga und eine gute Inhibition kann nicht durch die Imitation des Übergangszustands erklärt werden. Dennoch stellt sich die Frage, ob die neutrale Nitrogruppe oder ob das Nitronatanion von der PBGS erkannt wird. Der pK_A von 40 wurde durch Titration experimentell bestimmt und weist einen Wert von 9.3 auf (Abbildung 54). Im verwendeten Inkubationspuffer (pH 8.0) liegt 40 mehrheitlich als Nitroverbindung vor. Wir können trotzdem nicht ausschließen, dass am Enzym das Nitronat gebunden wird (Vergleiche Beobachtungen bei der Fumarase [93]).

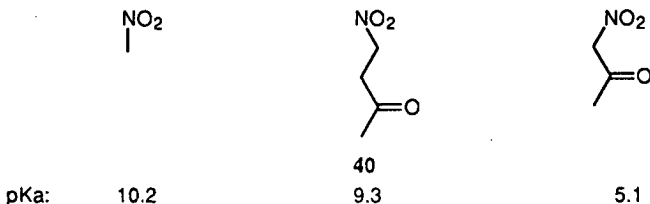


Abbildung 54: pKa von Nitroverbindungen im Vergleich [94]

Vergleicht man die Nitro- resp. die Nitronatgruppe mit der Carboxylatgruppe, so sind Ähnlichkeiten nicht zu übersehen. Die Nitro- resp. die Nitronatgruppe ist ein isosterischer Ersatz der Carboxylatgruppe. Sie imitieren die Polarität und Ladung des Carboxylats (Abbildung 55) [90,95].

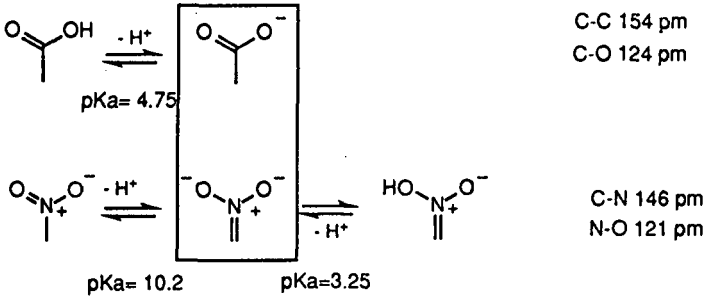


Abbildung 55: Nitro- mit Carboxygruppe im Vergleich.

Bei der Carboxypeptidase A [96] ist beispielsweise bekannt, dass die Carboxylatgruppe durch ein Guanidiniumion eines Arginins in der Active Site erkannt wird. Ein solcher Erkennungsmechanismus ist durchaus auch bei der PBGS wahrscheinlich. Es ist bekannt, dass 2,3 Butadion sich spezifisch an Arginin bindet und so Enzyme desaktivieren kann [83]. Diese Desaktivierung konnte von *Liedgens et al.* bei der PBGS isoliert aus *Spinacia oleracea* gezeigt werden [97]. Im Guanidiniumion, wie auch in der Carboxylat resp. in der Nitrogruppe sind die Bindungswinkel ähnlich (120 °C), was zu einer optimalen Ausbildung von Wasserstoffbrücken führt (Abbildung 56).

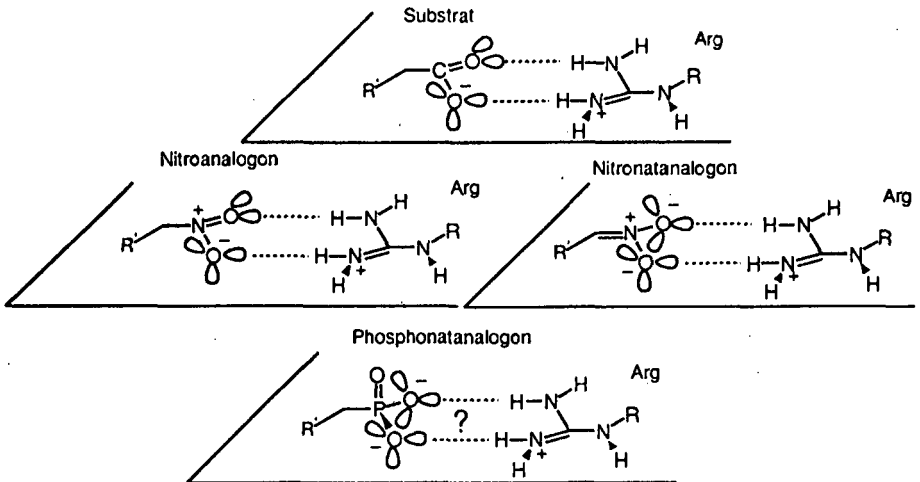


Abbildung 56.

Im Gegensatz zu 40 und 41 ist das Phosphonsäureanalogon 42 ein äusserst schlechter Inhibitor. Geht man davon aus, dass ein Arginin die sp^2 -hybridisierte Carboxylat- resp. Nitrogruppe in Position 1 erkennt, ist einsichtlich, warum das Phosphonsäureanalogon 42 der Levulinsäure ein schlechter Inhibitor ist. Die Phosphonsäure wird im Inkubationspuffer von $pH=8$

vorwiegend zweifach deprotoniert ($pK_{A,2} = 7.65$ [98]) vorliegen, so könnte dies für die Ausbildung von schwachen Wasserstoffbrücken zwischen dem Arginin und dem Phosphorsäurerest der Grund sein.

Im weitem sind die Methyl- (51), Ethyl- (9) und Benzylester- (52) der Levulinsäure keine Inhibitoren. Die Carboxylat- resp. die Nitrogruppe in Position 1 ist essentiell zur Erkennung an der A-Site der PBGS.

Die Einführung einer Doppelbindung zwischen Position 2 und 3 führt zu den β -Acetylacrylanaloga 43 und 44. Beide Moleküle zeigen keine Hemmung gegenüber der PBGS, obwohl sie strukturell der Levulinsäure sehr ähnlich sind. Bei 43 und 44 sind die Carboxylgruppen und die Carbonylgruppen relativ zueinander fixiert. Die Nichterkennung von 43 und 44 durch das Enzym weist darauf hin, dass beim natürlichen Substrat zur Erkennung in der Active Site die Konformationen um die Bindung C2 und C3 nicht gehindert sein dürfen.

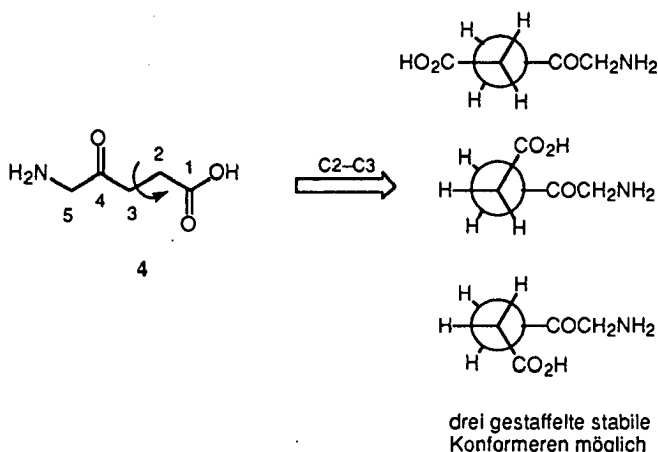


Abbildung 57.

2-Hydroxyvalerinsäure (45) zeigt ein gemischtes Inhibitionsverhalten. Gemäss unserer Arbeitshypothese kann 45 sowohl an die P-Site wie auch die A-Site binden.

Substratanaloga, welche in Position 3 variiert wurden, führten zu schlechten Inhibitoren. Ersetzt man das Kohlenstoffatom der Levulinsäure in Position 3 durch ein Stickstoffatom, so erhält man Acetylglycin (46). Acetylglycin ($K_i = 18'761 \mu\text{M}$) ist wie 3-Ethoxycarbonylvalerinsäure (47) ($K_i = 23'340 \mu\text{M}$) ein schlechter kompetitiver Inhibitor. Beide binden in der A-Site der PBGS. Acetylglycin beinhaltet eine Amidbindung, was zur Folge hat, dass bei 46 partiell zwischen den Positionen 3 und 4 eine Doppelbindung vorliegt (Abbildung 58). Diese konformelle Einschränkung könnte die schlechte Hemmung von Acetylglycin erklären.

Bei 3-Ethoxycarbonylvalerinsäure (47) ist das Proton am Kohlenstoff der Position 3 durch die Ethoxycarbonylgruppe aktiviert. Aus dem pK_a des strukturell ähnlichen 2-Acetyllessigsäuremethylesters ($pK_a=10$) ist zu folgen, dass 47 im Inkubationspuffer ($\text{pH}=8$) in der protonierten Form vorliegt. Die Aktivierung des Protons in Position 3 hätte zur Folge, dass nach der Erkennung von 47 in der A-Site die Enolsierung zum Enol begünstigt ist und so eine gute Inhibition zu beobachten wäre. Wahrscheinlich wird 47 aus sterischen Gründe (P-Site ist mit ALA schon belegt) von der Active Site nicht erkannt und ist folglich ein schlechter Inhibitor.

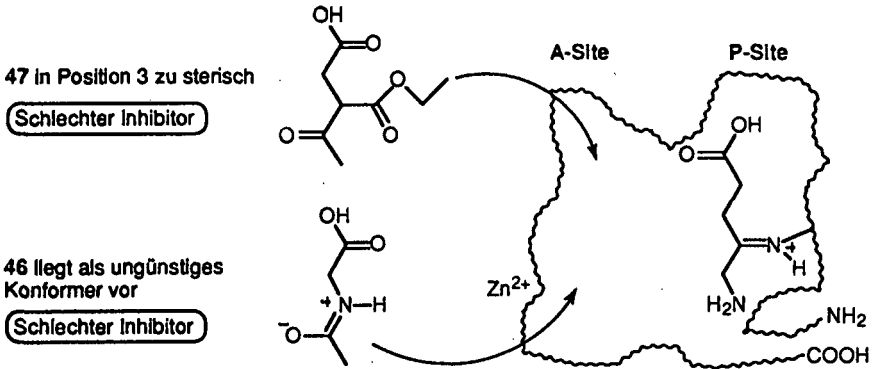


Abbildung 58.

Variationen in Position 4 führten zu sehr schwachen Inhibitoren. Durch das Weglassen der Carbonylgruppe bei 5-Aminovaleriansäure (49) und Nitrobutan (50) können diese beiden Moleküle nur noch durch die Nitrogruppe resp. durch das Carboxylat in der A-Site der PBGS erkannt werden.

Besonders interessante Ergebnisse lieferten die Inhibitoren, bei denen die Position 5 variiert wurde. Der Standardinhibitor Levulinsäure (8) ($K_i = 2'220 \mu\text{M}$) wird 40mal schlechter als ALA von der PBGS erkannt. 5-Hydroxylevulinsäure (55) ($K_i = 333 \mu\text{M}$) und 5-Oximolevulinsäure (57) ($K_i = 1'050 \mu\text{M}$) weisen im Vergleich zu Levulinsäure die signifikant kleineren Inhibitionskonstanten auf. Diese Beobachtungen lassen sich gut mit unserer Arbeitshypothese vereinbaren. 55 und 57 weisen wie das natürliche Substrat zwei Stellen für die Komplexbildung mit Zn(II) auf, hingegen kann Levulinsäure (8) nur über die Carbonylgruppe mit dem Metall komplexieren (Abbildung 59).

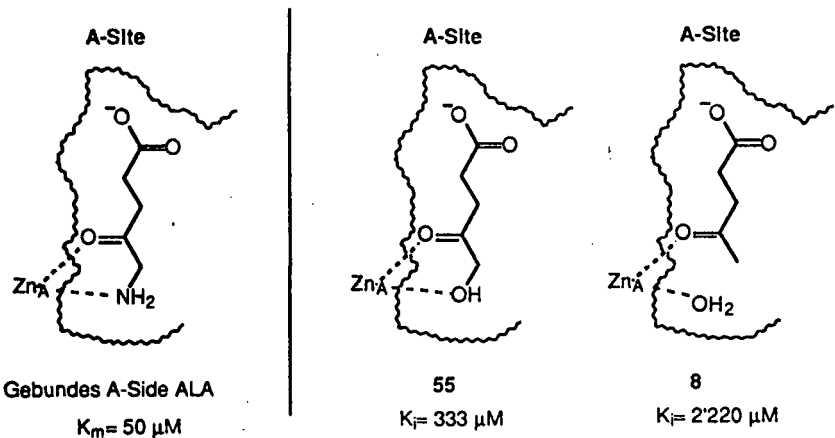


Abbildung 59.

2-Oxoglutar säure (60) und 3-Oxoadipinsäure (61) fallen mit einem K_i um $8'000 \mu\text{M}$ in den Wertebereich der guten Inhibitoren, dennoch weisen sie ein signifikant kleineres K_i als beispielsweise 5-Oximolevulinsäure (57) auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine zusätzliche

basische Stelle in der Active Site über Wasserstoffbrücken die einzelnen Inhibitoren erkennen könnte (Abbildung 60).

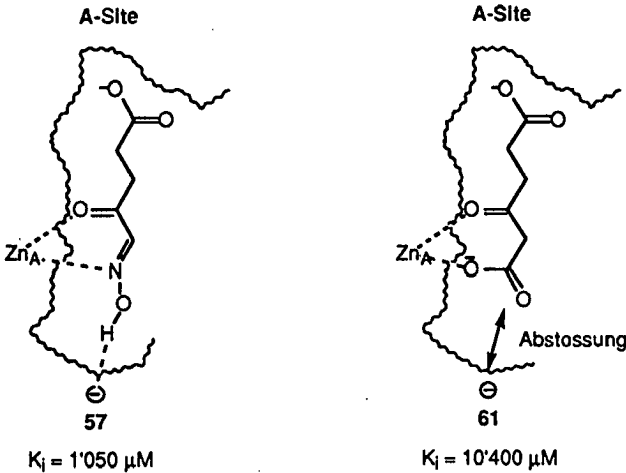


Abbildung 60.

Wie wir schon bei den Estern der Levulinsäure festgestellt haben, ist die Carboxylatgruppe in Position 1 unerlässlich für eine gute Hemmwirkung. So ist der 5-Hydroxylevulinsäuremethylester (56) der rund 17 mal schlechtere Inhibitor als die freie Säure (55).

5-Cyanolevulinsäuremethylester (62) zeigte im Inhibitionsversuch das Verhalten eines irreversiblen Inhibitors. Im Dialyseversuch konnte 62 als "Slow Binder" erkannt werden. 62 bindet gemäss unserer Arbeitshypothese an die P-Site. Die Inhibition kann durch eine Enaminbildung zwischen C4 und C5 erklärt werden, welche aufgrund der starken elektronenziehenden Cyanogruppe begünstigt wird (Abbildung 61). Im Vergleich zur P-Side ALA, die mittels einer Schiffsbasis ans Enzym gebunden ist, geht durch das Enamin die Elektrophilie des Kohlenstoffs in Position 4 verloren.

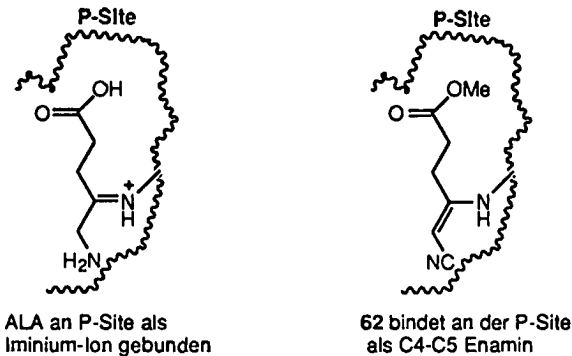


Abbildung 61.

Die strukturellen Ähnlichkeiten von 2-Nitrobenzophenon (80), 2-Nitrobenzaldehyd (63) als auch 2,4-Dinitrobenzaldehyd (79) mit 4-Nitro-2-butanon (40) sind in Abbildung 62 aufgezeigt.

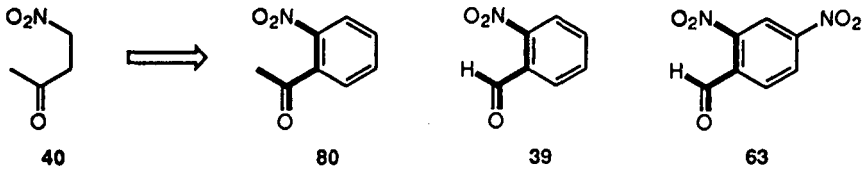


Abbildung 62: Strukturelle Ähnlichkeit mit 4-Nitro-2-butanon (40)

2-Nitrobenzaldehyd (39) und 2,4-Dinitrobenzaldehyd (63) zeigen irreversibles Verhalten, wobei bis anhin nur 39 im Dialyseversuch untersucht und als "Slow Binder" identifiziert wurde. Es ist aber anzunehmen, dass es sich bei 63 ebenfalls um einen "Slow Binder" handelt. 2-Nitrobenzophenon (80) hingegen ist ein kompetitiver Inhibitor mit einem K_i von $10^4/400 \mu\text{M}$.

Die beiden Aldehyde 39 und 63 binden als "Slow Binder" an die P-Site. Die zur Formylgruppe in Position 2 resp. 2 und 4 stehenden Nitrogruppen liegen mit dieser in einer Ebene und der -M-Effekt kommt dadurch voll zum Tragen. Dies erklärt die hohe Reaktivität des Aldehyds und die Ausbildung einer stabilen Schiffsbasis mit dem Lysin in der Active Site (Abbildung 63).

Bei 2-Nitrobenzophenon (80) ist die Reaktivität der Carbonylgruppe vermindert. Dies hat zur Folge, dass 80 kein "Slow Binder" ist, sondern ein kompetitiver Inhibitor, der an die A-Site bindet (Abbildung 63).

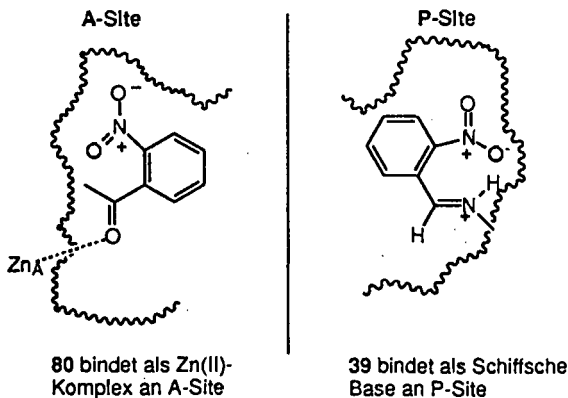


Abbildung 63.

8.3. Diskussion der Inhibitionsstudien der Produktanaloga

Jaffe konnte mittels ^{13}C NMR zeigen, dass das finale Enzymprodukt, PBG, ans Enzym gebunden ist [89]. Potentielle Produktanaloga konkurrieren demnach mit dem PBG um die Bindungsstelle am Enzym und zeigen kompetitives Verhalten. Die interessantesten und besten Inhibitionsresultate zeigen in dieser Reihe Pyrazol 81 und das Azaanalogon des PBG (82), weil insbesondere das letztere der Struktur des natürlichen Endprodukts der Porphobilinogen Synthese sehr nahe kommt (Abbildung 64).

Aus den NMR-Daten von *Jaffe* [89] kann die Dissoziationskonstante vom PBG-Enzymkomplex abgeleitet werden. Falls das Octamer der PBGS vier Moleküle PBG (5) binden kann, beträgt die Dissoziationskonstante $300 \mu\text{M}$, falls hingegen acht Moleküle PBG an das Octamer gebunden werden können, ist die Dissoziationskonstante fünfmal grösser ($1500 \mu\text{M}$). *Jordan* schätzte einen Wert von $2000 \mu\text{M}$ für die Dissoziationskonstante ab [15].

Der Vergleich dieser Dissoziationskonstanten mit der Inhibitionskonstante vom Azaanalogon des PBG (82) lässt darauf schliessen, dass das Octamer acht Bindungsstellen aufweist.

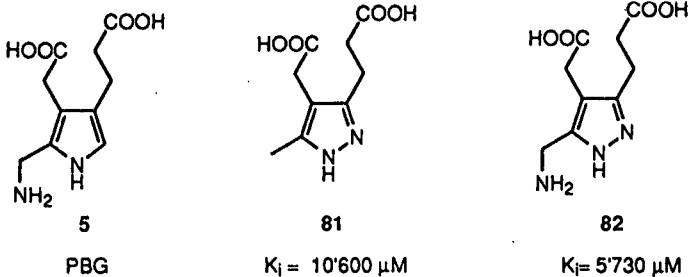


Abbildung 64.

8.4. Diskussion der Inhibitionsstudien der Zwischenproduktanaloga

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe 1,3- und 1,4-Diketone getestet, wobei 4,6-Dioxoheptansäure (10) die beste Inhibitionswirkung zeigt. 10 ist im Vergleich zur Levulinsäure der rund 1500mal bessere Inhibitor.

Die ausserordentlich gute Inhibitionswirkung von 10 könnte in Einklang mit der Arbeitshypothese erklärt werden, indem der Inhibitor über einen Zinkkomplex an die A-Site bindet (Abbildung 65). Falls 10 aber nur an die A-Site bindet, müsste er ein rein kompetitives Inhibitionsverhalten aufweisen.

Die kinetischen Daten beschreiben aber eindeutig ein Verhalten eines unkompetitiven oder gemischten Inhibitors, d.h. 10 bindet ausschliesslich über eine Schiff'sche Base an die P-Site, oder er kann sowohl an die P-Site als auch an die A-Site binden (Abbildung 65).

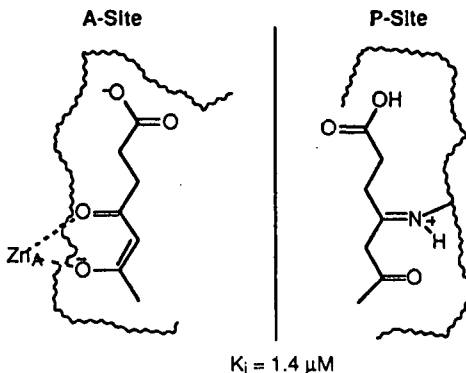


Abbildung 65.

Wenn also die Möglichkeit der Bindung an die P-Site gegeben ist, setzt dies voraus, dass die Dissoziationskonstante des gebundenen Diketons in der gleichen Größenordnung oder kleiner ist als die Dissoziationskonstante der P-Side ALA. Des Weiteren muss die Rückreaktion zum freien Enzym in der gleichen Größenordnung wie bei ALA sein, ansonsten würde man einen "Slow Binder" beobachten.

Bei verschiedenen Enzymsystemen, die wie die Porphobilinogen Synthase mit dem Substrat eine Schiffische Base ausbilden, konnte nachgewiesen werden, dass sie mit 1,3-Dicarbonylverbindungen ein stabiles kovalentes vinyloges Amid ausbilden.

Bei UV-Untersuchungen einer Aldolase der Klasse I konnte *Blonski et al.* die Bildung eines vinylogenen Amids von (2,4-Dioxo)-pentylphosphat (36) beobachten [80]. Dabei wird 36 zuerst über eine Schiffische Base an das Enzym gebunden und dann in das vinyloge Amid überführt (Abbildung 66), welches eine starke Absorption bei 317 nm aufweist. 36 wurde als "Slow-Binder" der Aldolase identifiziert.

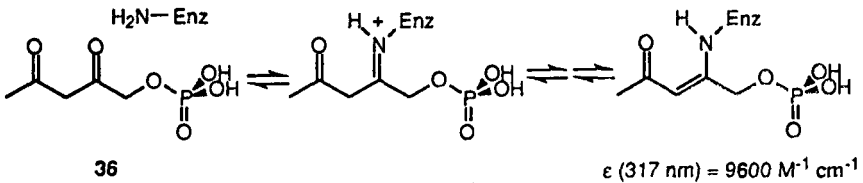


Abbildung 66.

Bei der Acetyllessigsäure Decarboxylase ist Acetylbrenztraubensäure ein sehr starker kompetitiver Inhibitor, bei dem ebenfalls die Ausbildung eines vinylogenen Amids über UV-Spektroskopie nachgewiesen wurde [99,100].

Lerner et al. hat die Antikörper 38C2 und 33F12 untersucht, welche die Aldolreaktion zwischen Aceton und verschiedenen Aldehyden katalysieren [101]. 1,3-Dicarbonylverbindungen bilden mit den Antikörpern vinyloge Amide.

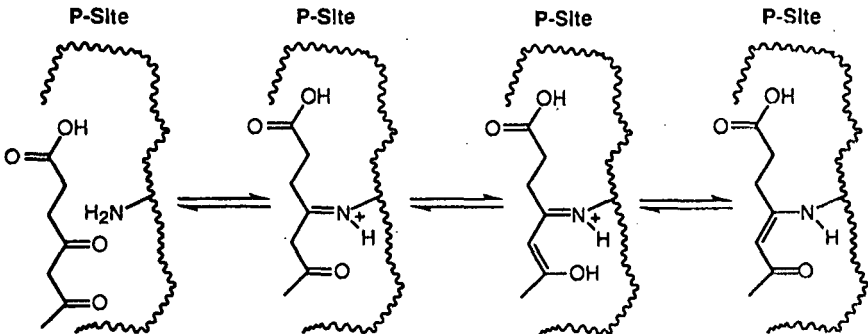


Abbildung 67.

Prinzipiell ist bei der Porphobilinogen Synthase ein ähnliches Verhalten zu erwarten. Die 4,6-Dioxoheptansäure (10) wird von der P-Site erkannt, bildet eine Schiffische Base aus und wandelt sich in das stabile vinyloge Amid um (Abbildung 67).

Neben der 4,6-Dioxoheptansäure (10) wurde eine Reihe anderer Diketone auf der Porphobilinogen Synthase getestet. Der 4,6-Dioxoheptansäuremylester (24) ist der rund 200 mal schwächere Inhibitor als 10, ist aber mit einem K_i von 319 μM immer noch ein sehr guter

Inhibitor. Lässt man die Säurefunktion ganz fallen, zeigt sich am Beispiel von Acetylaceton (64) und 1-Acetylcyclohexanon (65) eine signifikante Abschwächung der Inhibition. 1,4 Diketone wie Acetonylaceton (66) führen zu schwachen Inhibitoren. In Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass strukturelle Änderungen von Acetylaceton (64) zu keinen oder sehr schwachen Inhibitoren führen (Abbildung 68).

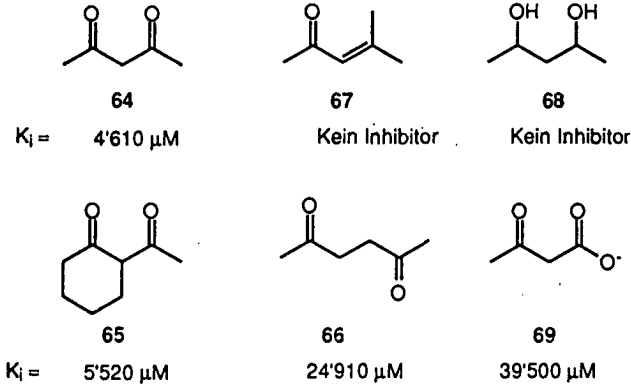


Abbildung 68.

5-Nitrolevulinsäure (58) ist ebenfalls ein sehr guter gemischter Inhibitor, der sowohl an die P-Site als auch an die A-Site binden kann (Abbildung 69).

Interessanterweise zeigt der 5-Nitrolevulinsäuremethylester (59) kompetitives Verhalten und bindet deshalb nur an die A-Site (Abbildung 70). Daraus folgt, dass die freie Säure 58 wesentlich zur Erkennung in der P-Site beiträgt.

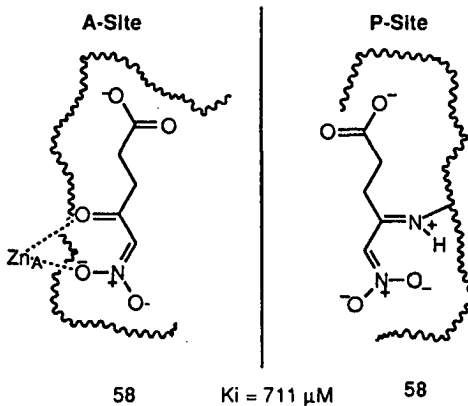


Abbildung 69.

3-Oxo-5-Aminohept-4-ensäuremethylester (63) ist ein guter kompetitiver Inhibitor und bindet an die A-Site (Abbildung 70).

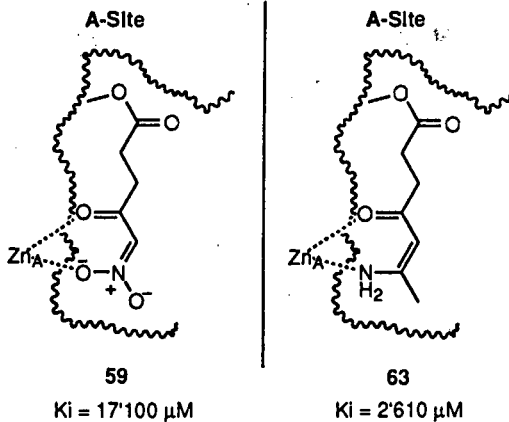


Abbildung 70.

Bis anhin haben wir sämtliche besprochenen Zwischenproduktanaloga in Einklang mit der von uns aufgestellten Arbeitshypothese diskutiert. Wir wollen an dieser Stelle darauf hinweisen, dass die 4,6-Dioxoheptansäure den von *Shemin* und *Jordan* vorgeschlagenen Zwischenproduktanaloga strukturell sehr nahe ist (Abbildung 71).

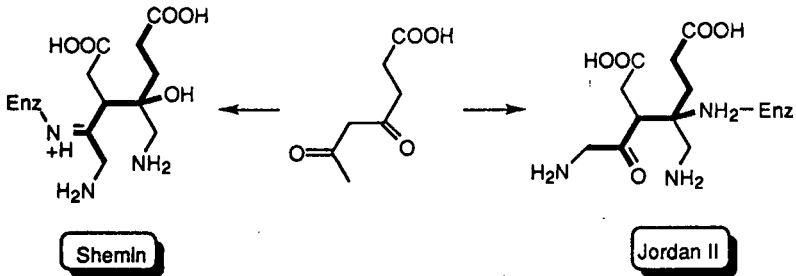


Abbildung 71.

Die beiden Racemate 12 und 13, bei denen die Ketten, welche die Säurefunktionen tragen, like (12) oder unlike (13) stehen, kommen dem vom *Shemin* postulierten Zwischenproduktanalogon der Enzymreaktion strukturell ebenfalls sehr nahe (Abbildung 72). Die Diskussionen der Inhibitionsstudien von 12 und 13 gestalten sich schwierig, weil im Enzymassay bei hoher Substratkonzentration 12 und 13 als Aktivatoren wirken. Auch punktuelle Vergleiche des Umsatzes bei konstanter Konzentration an Inhibitor, geben keinen Aufschluss darüber, welches Enantiomerenpaar von der PBGS besser erkannt wird.

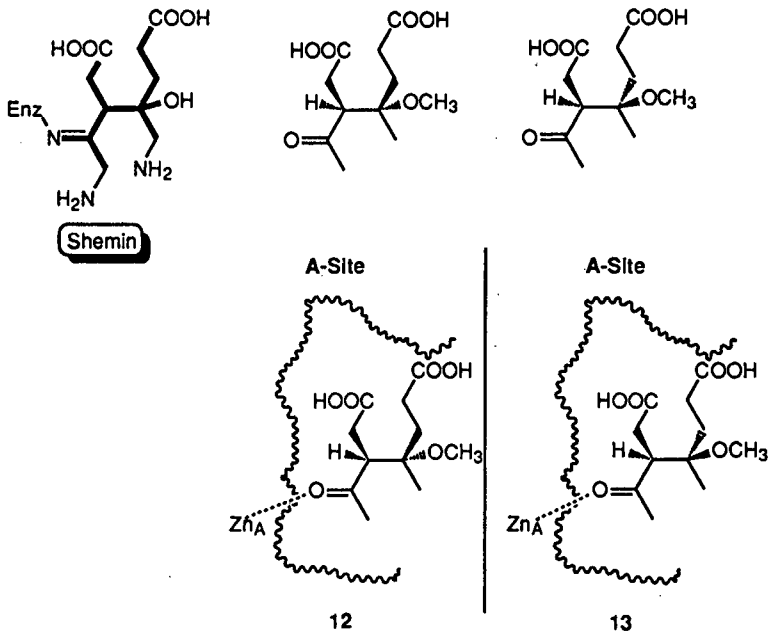


Abbildung 72.

Die in Abbildung 73 gezeigten enantiomerenreinen Epoxide zeigen alle irreversibles Verhalten im Enzymassay. In einem Parallelversuch konnte gezeigt werden, dass **22** und **71** die PBGS gleich stark deaktivieren. Im Dialyseversuch gibt es Hinweise, dass sich bei **70** um einen Suizid-Inhibitor handelt. Es ist anzunehmen, dass auch die drei anderen Epoxide (**22**, **23** und **71**) Suizid-Inhibitoren sind.

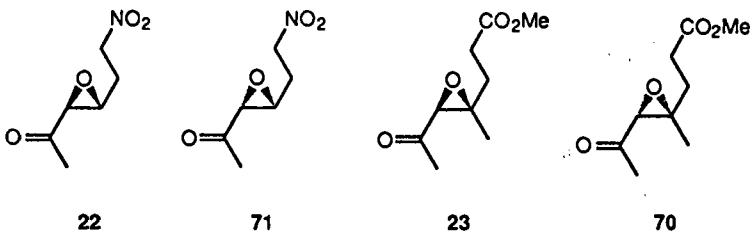


Abbildung 73.

Gemäss unseren Vorstellungen könnten diese Verbindungen auf zwei Arten in der A-Site intervenieren, um dann unter Öffnung des Epoxids eine neue kovalente Bindung auszubilden.

Beim linken Bild der Abbildung 74 muss der nukleophile Angriff innerhalb der A-Site erfolgen, beim rechten Bild kommt der nukleophile Angriff von der P-Site.

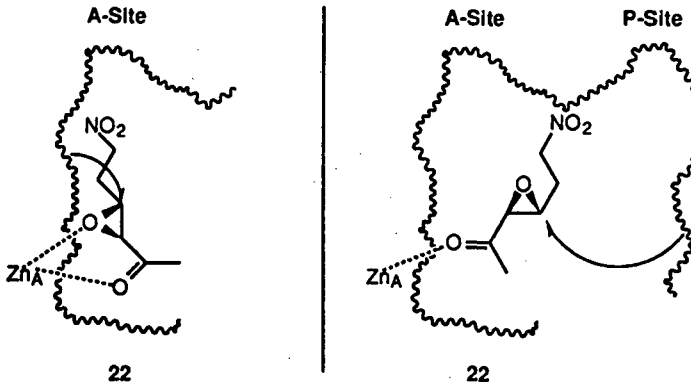


Abbildung 74.

Erweitern wir unsere mechanistische Arbeitshypothese, so könnte die Carbonylgruppe der Epoxide eine Schiffsche Base mit dem Lysin in der P-Site ausbilden. Die Öffnung des Epoxids würde durch einen nukleophilen Angriff von der A-Site aus erfolgen (Abbildung 75).

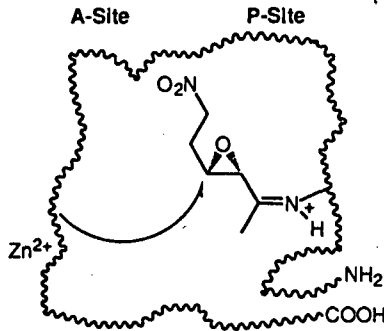


Abbildung 75.

6-Oxoheptansäure (20) und sein Nitroanalogon 21 wurden im Kontrollexperiment als kompetitive Inhibitoren ($K_i = 10'800 \mu M$ resp. $8'790 \mu M$) erkannt, welche die A-Site besetzen. Der Austausch der Carboxylatgruppe durch die Nitrogruppe führt nicht zu einer signifikant besseren Erkennung.

4-Oxopimelinsäure (72) kommt dem vorgeschlagenen Zwischenprodukt nach Jordan nahe (Abbildung 76).

72 ist ein guter kompetitiver Inhibitor mit einer Dissoziationskonstante von $8'599 \mu M$. Betrachtet man seine Struktur etwas genauer, kommt er dem Zwischenproduktanalogon von Jordan II recht nahe. Lässt man bei 72 die Carbonylgruppe weg, findet man in Form der Pimelinsäure (73) einen immer noch akzeptablen Inhibitor ($K_i = 12'404 \mu M$). Offenbar reichen zu einer Erkennung durch das Enzym die zwei Carboxylatgruppen des Inhibitors aus. Weitere Dicarbonsäuren wie Bernsteinsäure (74), Fumarsäure (75), Maleinsäure (76) und Phthalsäure (77) werden gleich gut wie die Pimelinsäure (73) erkannt.

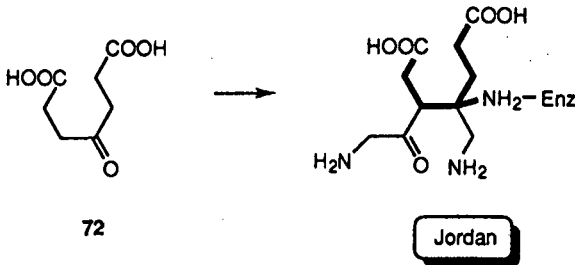


Abbildung 76.

Die 4-Oxopimelinsäure (72) und die Dicarbonsäuren 73-77 müssen gemäss Arbeitshypothese in der A-Site intervenieren (Abbildung 77).

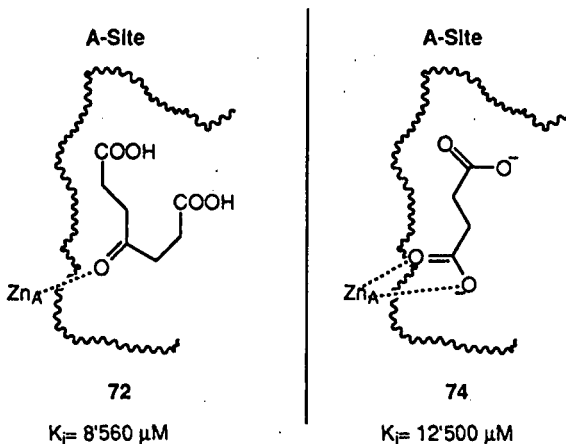


Abbildung 77.

8.5. Vorgeschlagener Mechanismus der PBGS aus *E. coli*

Der hier vorgeschlagene Mechanismus stimmt im wesentlichen mit der im vorhergehenden Kapitel besprochenen Arbeitshypothese überein (Punkte A-D in Abbildung 78). Nach Punkt D erfolgt ein nukleophiler Angriff der Aminogruppe an die Carbonylgruppe unter Ausbildung eines Halbaminals (E). Nach Wasserelimination wird das Iminiumion ausgebildet (F), und eine zweimalige Protonenabstraktion (F nach G und H nach J) führt zum PBG (Abbildung 78). Das Zwischenprodukt bleibt dadurch möglichst lange an das Enzym gebunden, und das Enzym wird erst im zweitletzten Schritt regeneriert.

Der so vorgeschlagene Mechanismus kann mit der in unserer Gruppe ausgearbeiteten biomimetischen Reaktion in Einklang gebracht werden (siehe Kapitel 3.2.), bei der die C-C Verknüpfung chemisch den anspruchsvollsten Schritt darstellt. Deshalb steht die C-C Verknüpfung im Enzymmechanismus ziemlich am Anfang und wird als entscheidender Schritt betrachtet.

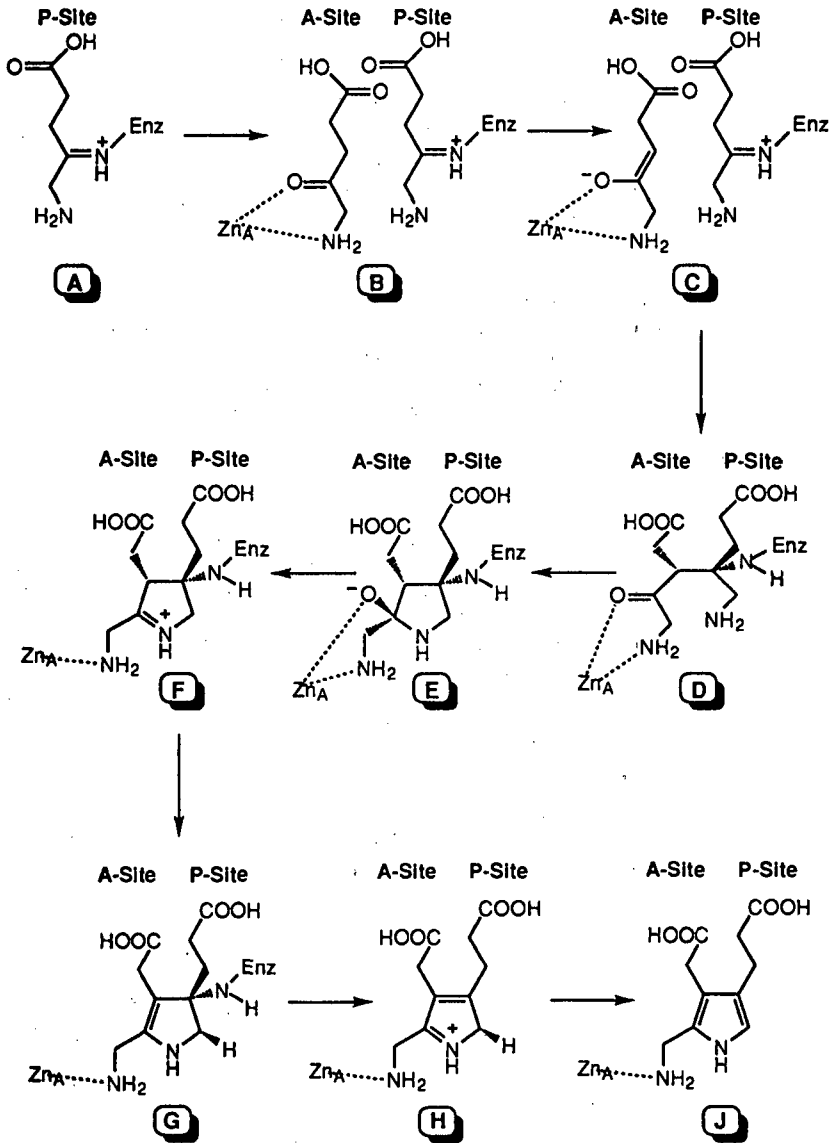


Abbildung 78: Vorgeschlagener Mechanismus der Porphobilinogen Synthese aus *Escherichia coli*.

8.6. Inhibitionsstudien der PBGS von *E. coli* und *Rhodobacter spheroides* im Vergleich

In seiner Dissertation hat *R. Löönd* [20] Inhibitionsstudien einiger in dieser Arbeit besprochenen Substrat-, Zwischenprodukt- und Produktanaloge auf der Porphobilinogen Synthase aus *Rhodobacter spheroides* durchgeführt. Vergleiche jener Studien mit der vorliegenden Arbeit ergeben, dass die Michaeliskonstante bei *E. coli* um einen Faktor 7 kleiner als bei *R. spheroides* ist, und dass die Inhibitionskonstanten der auf beiden Enzymen getesteten Molekülen in der gleichen Größenordnung liegen.

Weitere Schlussfolgerungen können nicht gezogen werden, weil der Einfluss verschiedener Metalle auf die Reaktivität der Porphobilinogen Synthase aus *Escherichia coli* genau untersucht wurde. Bei denen in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitionsstudien sind die Bedingungen angewandt worden, welche höchste Aktivität ergaben. Bei der PBGS aus *Rhodobacter spheroides* ist der Einfluss der Metalle auf die Reaktivität nicht geklärt, und es ist nicht klar, ob die Inhibitionsstudien von *R. Löönd* unter den optimalsten Bedingungen für die enzymatische Reaktion durchgeführt wurden.

8.7. Ausblick

Es ist von Interesse zu wissen, wo die einzelnen Inhibitoren tatsächlich in der Active Site intervenieren. Wahrscheinlich binden die meisten Inhibitoren in Abwesenheit des Substrats über eine Schiff'sche Base an die P-Site. Erste Hinweise diesbezüglich wurden von *Shemin* erwähnt [14] und konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels isoelektrischer Fokussierung gezeigt werden (siehe experimenteller Teil). Diesbezüglich sind die Epoxide als Suizid Inhibitoren von besonderem Interesse. Falls **23** in Abwesenheit des Substrats in der P-Site eine Schiff'sche Base ausbildet, könnte der nukleophile Angriff aus einer A-Site kommen. Nach erfolgter Reduktion der Schiff'schen Base mit Natriumborhydrid könnte eine potentielle Quervernetzung zwischen zwei Untereinheiten mittels SDS-Elektrophorese und Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Abbildung 79). Derartige Messungen sind momentan im Gange.

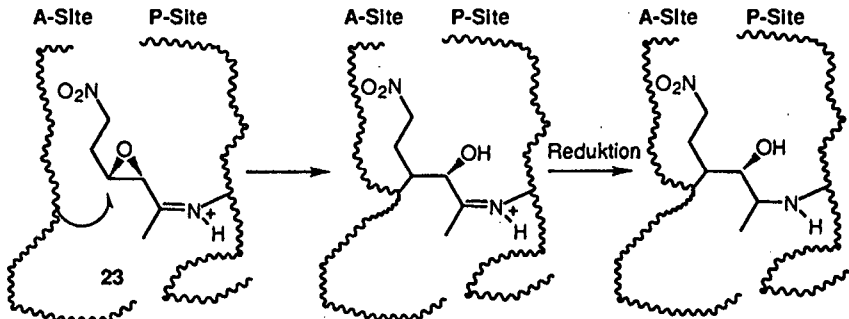


Abbildung 79.

Zur gleichen Frage nach dem Ort der Besetzung muss die potentielle Ausbildung des vinylogenen Amids zwischen der 4,6 Dioxoheptansäure (10) und der P-Site der PBGS mittels UV Messungen nachgewiesen werden (Abbildung 80).

Im weiteren sollen zur Mechanismusaufklärung der Porphobilinogen Synthase fluorierte Substratanaloge synthetisiert werden und in Inhibitionsversuchen getestet werden. Von zentralem Interesse wäre das difluorierte Analogon von 10: 4,6-Dioxo-5,5'-difluoroheptansäure (87) kann

mit der P-Site kein vinyloges Amid ausbilden, würde deshalb nur in der A-Site intervenieren und müsste gemäss unserer Arbeitshypothese ein rein kompetitiver Inhibitor sein .

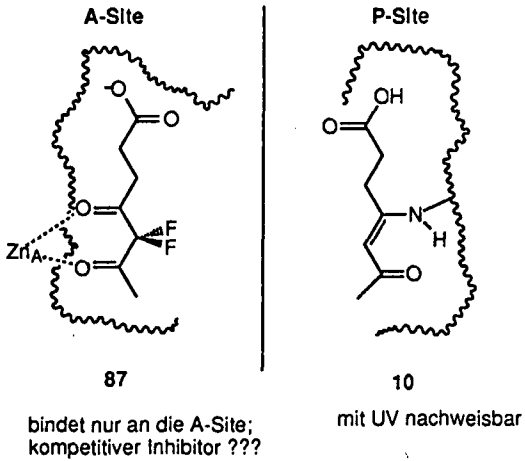


Abbildung 80.

9.1.2. Bestimmung der Reinheit der ALA mittels HPLC

Das Resultat der Elementaranalyse bewog uns, die Reinheit der ALA (4) mittels HPLC zu untersuchen. Es wurde eine Reverse Phase Säule (RP 8) gewählt, und es konnte gezeigt werden, dass in einem 0.129 M KH_2PO_4 -Puffer bei pH 4.5 die Säure als einziger scharfer Peak mit einer Retentionszeit von 5.66 Minuten erscheint (Abbildung 82). Bei Erhöhung des pH auf 6.9 konnte ein zweiter Peak mit einer deutlich höheren Retentionszeit festgestellt werden.

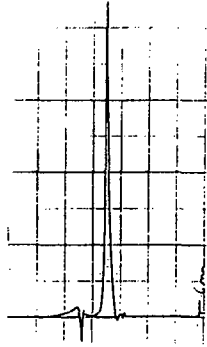


Abbildung 82: HPLC- Analyse (RP 8) bei pH 4.5

Dieser zweite Peak, welcher innerhalb einiger Stunden signifikant grösser wurde, entspricht dem Pyrazin (7), welches aus einer Dimerisierung von zwei ALA entstanden ist (Abbildung 83).

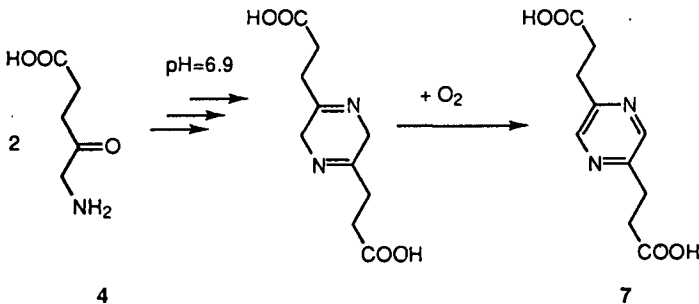


Abbildung 83: Bildung von Pyrazin (7)

Die Bildung von 7 bei pH=6.9 konnte im UV bei einer Wellenlänge von 274 nm verfolgt werden (Abbildung 84). Die Kinetik zeigt eine Reaktion 0ter Ordnung. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Oxidation des Diimins zum Pyrazin 7. Der Sauerstoffgehalt in Wasser beträgt bei Raumtemperatur 3.16 g/l [105]. Wir gehen davon aus, dass der Sauerstoffgehalt im Vergleich zum gebildeten Diimin im grossen Überschuss vorliegt und deshalb über eine gewisse Zeitspanne beinahe konstant bleibt. Mit diesen Überlegungen kann eine Reaktion 0-ter Ordnung leicht erklärt werden (Abbildung 84).

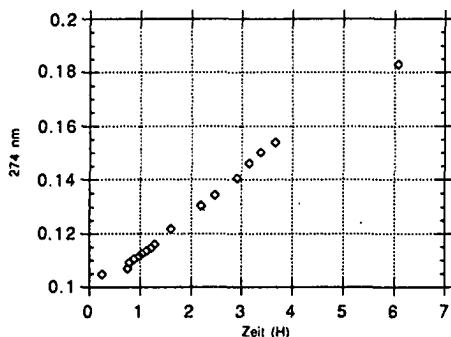


Abbildung 84: Pyrazinbildung Reaktion 0ter Ordnung

9.1.3. Symmetrische Dimerisierung der ALA

Die Pyrazinbildung wurde auch synthetisch nachgewiesen [9]. Es konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit eines Puffers von pH=6.9 mit einer Ausbeute von 20% Pyrazin entsteht. Durch Zugabe von Quecksilber(II)chlorid und bei höherem pH konnte die Ausbeute an Pyrazin erhöht werden (30%).

9.2. Synthese verschiedener potentieller Inhibitoren

9.2.1. Synthese von Substratanaloga

Levulinsäurebenzylester (90). Zur Herstellung des Levulinsäurebenzylester (90) wurde eine Methode nach *Eschenmoser* ohne Zusatz von basischen oder sauren Katalysatoren gewählt (Abbildung 85) [106]. DMF-dibenzylacetal (91) wurde im 1.5 fachen Überschuss mit Levulinsäure (8) verestert und zum Rückfluss erhitzt. Nach erfolgter Säulenchromatographie und fraktionierter Vakuumdestillation im Kugelrohrforn erhielt man den Levulinsäurebenzylester in einer Ausbeute von 50%.

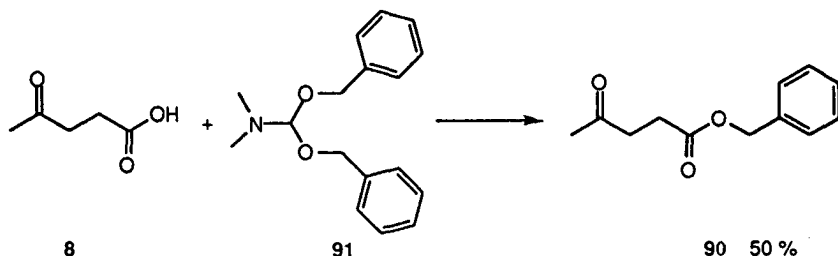


Abbildung 85.

4-Chlor-2-butanon (92). Der hier dargestellten Synthese von 4-Chlor-2-butanon (92) liegt ein in der Literatur beschriebenes NMR-Experiment zu Grunde [107]. Ausgehend von

Methykvinylnketon (93) und Tetralkylammoniumchlorid in Trifluoressigsäure haben wir 4-Chlor-2-butanon (92) nach Vakuumdestillation in einer Ausbeute von 79% erhalten.

4-Nitro-2-butanon (40). wurde nach einer Synthesevorschrift von *Rainer Lüönd* [25][20] in einer Kornblum Reaktion mit Natriumnitrit in 4-Nitro-2-butanon (40) umgewandelt und durch Destillation gereinigt. (Ausbeute: 51%). Durch leichte Modifizierung der gegebenen Vorschrift, indem man zur Aufarbeitung EtOAc anstelle des Et₂O verwendet wurde, konnte die Ausbeute signifikant gesteigert werden (Abbildung 86).

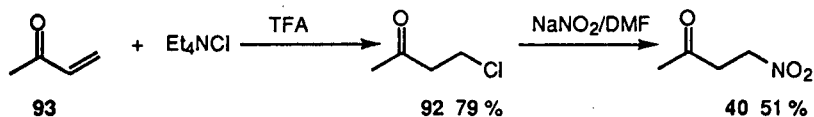


Abbildung 86.

3-Thiocyanat- (94) und 5-Thiocyanatlevulinsäuremethylester (95). 3-Brom-(96) und 5-Bromlevulinsäuremethylester (88) wurde in einer nukleophilen Substitution mittels Kaliumthiocyanat zu 3-Thiocyanat- (94) und 5-Thiocyanatlevulinsäuremethylester (95) umgewandelt (Abbildung 87).

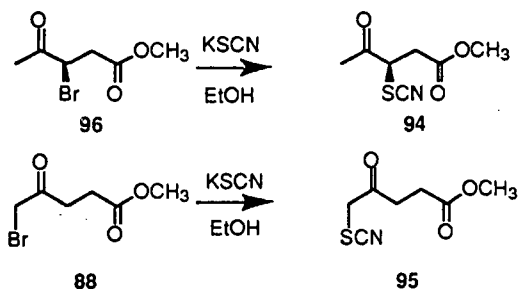


Abbildung 87.

5-Cyano-4-oxopentansäuremethylester (62). 62 wurde nach einer Arbeitsvorschrift von *Rainer Lüönd* synthetisiert [20].

4-Oxo-2-pentensäure (43) und 2-Hydroxylevulinsäure (45). 43 und 45 wurden nach einer Arbeitsvorschrift von *Rainer Lüönd* synthetisiert[20].

9.2.2. Synthese von Zwischenproduktanaloga

9.2.2.1. Synthese von 3-Acetyl-4-oxopentansäuresäure

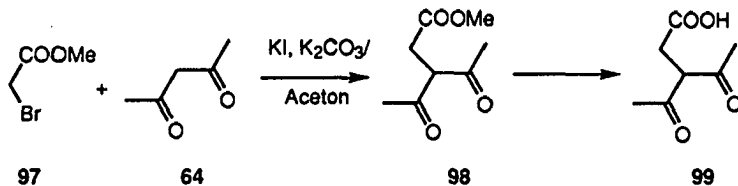


Abbildung 88.

Acetylacetone (64) reagiert mit Bromessigsäuremethylester (97) in Anwesenheit von KI und Kaliumcarbonat zu 3-Acetyl-4-oxopentansäuremethylester (98) [108]. Anschliessende enzymatische Hydrolyse liefert die freie Säure (99) (Abbildung 88).

EXPERIMENTELLER TEIL**10. ALLGEMEINES****10.1. Geräte zum biologischen Arbeiten****Fermenter**

2 Liter Fermenter; Multigen; New Brunswick Scientific Co. Inc.; New Brunswick, New Jersey, USA; Fermenter mit Rückflusskühler versehen.

10 Liter Fermenter; Bioengineering

Rotationschüttler

HF, Infros AG

FPLC

Liquid Chromatography LCC 500, Pharmacia

Filtration

Ultrafiltrationszelle 8050 und dazu passende Diaflo Ultrafiltrationsmembran PM-10 von Amicon.

Fraktionensammler

LKB, 7000 Ultrac

Elektrophorese

SDS-PAGE 12%, 0.75mm, Minigel, System Lämmli

Zentrifugen

Tischzentrifuge MSE, Mistral 2000

Kühlzentrifuge Sorvall RC 5C Plus

UV/VIS Spektroskopie

UV/VIS-Spektren wurden auf einem HP 8452A Diode Array Spectrophotometer gemessen.

10.2. Geräte zum synthetischen Arbeiten**IR-Spektroskopie**

Die Spektren wurden auf einem IR Perkin Elmer FT-IR 1720 X gemessen. Die Auflösung der Spektren beträgt 10 cm^{-1} zwischen 4000 und 2000 cm^{-1} und 4 cm^{-1} zwischen 2000 und 4000 cm^{-1} . Die Verbindungen wurden als Film zwischen NaCl-Platten (Film) oder als Pillenpressling in KBr (Pille) gemessen. Die Banden sind in cm^{-1} angegeben. Abkürzungen: w=schwach, m=mittel, br=breit, s=stark, vs=sehr stark.

MS-Spektren

Die MS-Spektren wurden auf einem Massenspektrometer Nermag R30-10 mit einer MS-Datenbank Wiley-Library gemessen. Die Signale wurden in m/e und % zum Basis-Peak (100%) angegeben.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden bei Ciba-Geigy SA (Abteilung Kunststoffe und Additive) in Marly FR in Auftrag gegeben.

Schmelzpunkt

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Büchi Le003 (Schmelzpunktsbestimmungsapparat nach Dr. Tottoli) und einem Gallenkamp MFB-595 gemessen.

NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Spektren wurden auf dem Spektrometer *Gemini Varian 200 MHz*. TMS (Tetramethylsilan) war die benutzte Referenz. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm und die Kopplungskonstanten in Hz angegeben.

Abkürzungen: s=Singulett, d=Doublett, t=Triplet, q=Quadruplett, m=Multiplet

Gaschromatographie

Die Messungen wurden auf einem Chromatographen des Typs Dani 3900 mit OV1 durchgeführt.

HPLC

Knauer's Zwei-Pumpensystem (HPLC Pump 64) mit Programmer (HPLC Programmer 50), mit Detektor (Applied Biosystem (757 Absorbance Detector), mit Säule (0.4cm X 25cm; Li Chrosorb RP 8) und mit Schreiber ausgestattet.

10.3. Chemikalien und Biochemika

Acetylaceton	Fluka puriss. p.a.
Acetonitril	SDS
Ammoniumsulfat	Fluka, puriss. p.a.
Ampicilin Sodium Salt	Fluka, BioChemika
Antifoam	Sigma
Brom	Siegfried
Bromessigsäuremethylester	Fluka purum
di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka, BioChemika
Dimethylaminformamid	Fluka, puriss. p.a.
DMF-dibenzylacetal	Fluka, pract.
Dioxan	Fluka, BioChemika
cØplete™, Proteasen Inhibitoren-Cocktail	Boehringer Mannheim
Essigsäure	Fluka, purum
Fluram	Fluka, BioChemika
Glycerin Hydrat	Fluka, BioChemika
Hefeextrakt	Fluka, BioChemika
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, BioChemika
Kaliumhydroxyd	Fluka, BioChemika
Kaliumthiocyanat	Fluka, puriss. p.a.
Levulinsäure	Fluka, purum
Lysozym aus Hühnereiweiss	Fluka, BioChemika
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fluka, BioChemika
Mercaptoethanol	Fluka, BioChemika
Methanol	tech., destilliert über CaO
Methylvinylketon	Fluka, purum
Natriumchlorid	Fluka, puriss. p.a.
Natriumnitrit	Fluka, puriss. p.a.
p-Dimethylaminobenzaldehyd	Fluka, puriss. p.a.
Perchlorsäure 70%	Fluka, puriss. p.a.

Phtalimid-Kalium	Fluka, purum
Quecksilber(II)chlorid	Fluka, puriss. p.a.
Rinderserumalbumin	Fluka, BioChemika
Schweineleberesterase	Fluka, BioChemika
Salzsäure 32%	Fluka, puriss. p.a.
Tetraethylammoniumchlorid	Fluka, purum
Trans-4-oxo-2-pentensäuremethylester	Fluka, purum
Trichloressigsäure	Fluka, purum
Trifluoressigsäure	Merck, zur Synthese
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka, BioChemika
Trypton	Fluka, BioChemika
Zinkchlorid	Fluka, puriss. p.a.

11. MIKROBIOLOGISCHER UND ENZYMATISCHER TEIL

11.1. Kultivierung der *E. coli* CR 261 und Aufreinigung der PBGS

11.1.1. Vorkultur

In einem 500ml Erlenmeyerkolben wurden 100ml LB, 188µl Ampicilin (4mg/ml) mit einer einzelnen Kolonie bei 37° C und einer Rührgeschwindigkeit von 230 rpm auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Man liess die Vorkultur während 8 Stunden bis zur einer Absorption von 0.83 (600nm) anwachsen (exponentielle Wachstumsphase).

11.1.2. Hauptkultur

Ausgehend von den 100ml Vorkultur wurde die Hauptkultur angeimpft, indem die ganze Vorkultur mit 9l LB, 450mg Ampicilin und ca. 2ml Antifoam vereinigt wurde. Man liess die Kultur in einem 10l Fermenter bei einer Rührgeschwindigkeit von 200 rpm, 37°C und einer externer Luftzufuhr von 10 l/min während 21.5 Stunden zu einer Absorption (600nm) von 5.85 anwachsen.

11.1.3. Rohextrakt und Darstellung des Lysats

Nach der Zentrifugation der Kultur bei 3000 x g, 4°C und während 20 Minuten eine Zellfeuchtmasse von 88.2g. Die Aufreinigung der Zellfeuchtmasse geschah in 4 Portionen (15.4g, 22.9, 21.9g, 29.2g). Die Aufreinigung der 1. Portion erfolgte sogleich anschliessend, indem die Zellfeuchtmasse (15.4g) in 25ml Phosphatpuffer (0.1 M NaPO₄ (pH=7.3), 1mM MgCl₂·6H₂O, 10 µM ZnCl₂, 12.3 mM Mercaptoethanol) aufgenommen, mit 26 mg Lysozym versetzt und auf dem Rotationsschüttler während 1 Stunde bei Raumtemperatur und 260 rpm inkubiert wurde. Nach anschliessendem Einfrieren und langsamem Auftauen wird während 20 Minuten bei 4°C und bei 48000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag kann verworfen werden, und der Überstand entspricht dem Lysat.

Die Zellfeuchtmasse, welche nicht sogleich weiter verarbeitet wurde (Aufreinigung 2-4), wurde bei -20° eingefroren und bei Gebrauch aufgetaut (Tabelle 36).

	Zellfeuchtmasse [g]	Aufnehmen in Phosphatpuffer [ml]	Zugabe von Lysozym [mg]	Units
1. Aufreinigung	15.4	25	26	31570
2. Aufreinigung	22.9	40	42	34464
3. Aufreinigung	21.9	35	46	33572
4. Aufreinigung	29.2	50	60	38844

Tabelle 36.

11.1.4. Zugabe von Proteaseninhibitoren und Ammoniumsulfatfällung

Bei Aufreinigung 2-4 wurde zum Lysat ein Proteaseninhibitorën-Cocktail zugegeben (Das Lysat der 1. Aufreinigung wurde lediglich mit PMSF als Proteaseninhibitor versetzt). Eine Proteaseninhibitorëtablette (Boehringer Mannheim) wurde dabei in 5ml 1 M KPO₄, 100 mM MgCl₂, 100 µM ZnCl₂, 100 mM Mercaptoethanol (pH=7.6) gelöst und nach Zugabe während einer Stunde bei 4° inkubiert.

Anschliessend wird das Lysat zu einer 25% (NH₄)₂SO₄-Lösung aufkonzentriert und während 20 Minuten bei 48 000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wird verworfen und der Überstand weiter verarbeitet.

11.1.5. Phenylsapharose-Säule

Der Überstand nach der 25% Ammoniumsulfatfällung wurde auf die Phenylsapharose-Säule (2.5 X 26 cm) geladen. Die Fliessgeschwindigkeit betrug 75ml/h. Man sammelte Fraktionen zu 10ml. Grundsätzlich verminderte man im Laufe der Trennung die Polarität des Eluiermittels (Tabelle 37). Danach wurden die aktivsten Fraktionen über ein Ultrafiltrationsmembransystem (PM 10) aufkonzentriert.

Eluiermittel A: 50mM KPO₄ pH=7, 1mM MgCl₂, 10µM ZnCl₂, 10mM Mercaptoethanol, 0.5M (NH₄)₂SO₄

Eluiermittel B: 50mM KPO₄ pH=7, 1mM MgCl₂, 10µM ZnCl₂, 10mM Mercaptoethanol

Eluiermittel C: 100mM KPO₄ pH=7.1, 1mM MgCl₂, 10µM ZnCl₂, 10mM Mercaptoethanol, 0.5M (NH₄)₂SO₄

Eluiermittel D: 100mM KPO₄ pH=7.1, 1mM MgCl₂, 10µM ZnCl₂, 10mM Mercaptoethanol

Eluiermittel E: 50mM KPO₄ pH=7.1, 0.5 mM MgCl₂, 5 µM ZnCl₂, 5 mM Mercaptoethanol

Eluiermittel F: 50mM KPO₄ pH=7.1, 1mM MgCl₂, 10µM ZnCl₂, 10mM Mercaptoethanol, 0.5M (NH₄)₂SO₄

Eluiermittel G: 50mM KPO₄ pH=7.1, 1mM MgCl₂, 10µM ZnCl₂, 10mM Mercaptoethanol

	Anzahl Fraktionen			Gradient	Aktivste Fraktionen
1. Aufreinigung	117	1-30 100% A	30-90 0-100%B	91-117 100% B	91-117
2. Aufreinigung	117	1-12 100% A	13-88 0-100%B	89-117 100% B	88-116
3. Aufreinigung	167	1-12 100% C	13-88 0-100%D	89-131 100% D 133-167 100%E	135-155
4. Aufreinigung	148	1-48 100% F		49-148 100% G	67-92

Tabelle 37.

11.1.6. Sephacryl 300

Die Trennung auf der S-300 geschah auf einer Säule mit den Dimensionen 2.6 X 65 cm (bei der 1. Aufreinigung wurde eine Säule mit den Dimensionen 84 x 2 cm gewählt) und erfolgte mit 0.1 M Na₂PO₄ (pH=7.3), 1mM MgCl₂·6H₂O, 10µM ZnCl₂, 10mM Mercaptoethanol als

Eluiermittel. Die Fließgeschwindigkeit betrug 29ml/h, und es wurden Fraktionen zu ca. 6ml gesammelt. Die aktivsten Fraktionen, welche nach einer Eluierzeit von ca. 6 Stunden auftraten, wurden über ein Ultrafiltrationssystem (PM 10) auf ca. 7ml aufkonzentriert.

11.1.7. Aufbewahrung der PBGS

Die Aufbewahrung geschah in kleinen Fraktionen in Eppendorf-Röhrchen in Gegenwart von ca. 50% Glycerin. Insgesamt wurden 36251 Units und 814.6 mg an PBGS aufgereinigt (Tabelle 38).

	Anzahl Proben	Volumen PBGS [μ l] / Volumen Glycerin [μ l]	Units PBGS	Menge an PBGS [mg]
1. Aufreinigung	160	50/50	6949	132.9
2. Aufreinigung	208	35/30	8275	224.4
3. Aufreinigung	208	35/30	7572	185.4
4. Aufreinigung	256	35/30	13455	277.3

Tabelle 38.

11.2. Methoden zur Protein- und Aktivitätsbestimmung

11.2.1. Proteinbestimmung nach Biorad

Der Bio-Rad Protein Assay basiert auf der Farbveränderung von Coomassie Brilliant Blue-G-250 bei der Anlagerung von verschiedenen Proteinmengen. Die Farbänderung wurde durch Messung der Absorption bei 596nm festgehalten. Je nach Proteinmenge wurden die einzelnen Proben mit Puffer verdünnt, um Messwerte in einem linearen Bereich der Kurve zu erhalten. Als Referenz wählte man Rinderserumalbumin (10mg/100ml). Nach der Messung der jeweiligen Enzymproben wurde der Gehalt an Enzym mittels der Eichkurve errechnet.

Eichkurve: X μ l Rinderserumalbuminlösung + (800 μ l-X μ l) Puffer

+ 200 μ l Bio-Rad Protein Assay (wobei X= 10,20,30,40,50)

Nullwert: 200 μ l Bio-Rad Protein Assay + 800 μ l H₂O

Enzymproben: X μ l Proteinlösung + (800 μ l-X μ l) Puffer + 200 μ l Bio-Rad Protein Assay (wobei X= 10,20,30,40,50)

11.2.2. Proteinbestimmung mittels Fluoreszenz

Fluorescamin reagiert mit den Aminogruppen der einzelnen Lysine und der endständigen Aminogruppen des Proteins [109-111]. Aufgrund der Kenntnis der Primärstruktur eines Referenzproteins und eines zu bestimmenden Proteins kann das Protein mittels Fluoreszenz quantifiziert werden. Es wurde bei 390nm angeregt und die Emission bei 475nm gemessen. Als Referenzprotein diente Rinderserumalbumin (7.4g/100ml).

Fluramlösung: ca. 2.5 Fluorescamin/ 100ml Dioxan

Puffer: 0.049M K₂HPO₄

In 4.5ml Küvetten wurde wie folgt pipettiert:

(1) Eichkurve: X μ l Rinderserumalbuminlösung + (1.5ml-X μ l) Puffer + 0.5 ml Fluramlösung

(wobei X= 10,20,30,40,50).

(2) Nullwert: 1.5ml Puffer + 0.5ml Fluramlösung.

(3) Enzymproben: X μ l Proteinlösung + (1.5ml-X μ l) Puffer + 0.5ml Fluramlösung (wobei X= 10,20,30,40,50).

Nach 5 Minuten wurden die Intensitäten der Emission gemessen. Die Emission des Nullwertes (2) wurde von der Emission der Enzymproben subtrahiert. Dieser so erhaltene Wert wurde gegen die Anzahl Lysine aufgetragen. Der Proteingehalt der Probe wurde mittels der erhaltenen Eichkurve eruiert.

11.2.3. Bestimmungen der PBGS Aktivität während der Enzymanreicherung

Lösungen:

Puffer: (pH=7.6) 0.2M Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 30 μ M ZnCl₂, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 12.3 mM Mercaptoethanol

Substrat δ -Aminolevulinsäure: 29.8 mM δ -Aminolavulinsäure-Hydrochlorid (50mg/10ml H₂O)

Ehrlich's Reagenz: *p*-Dimethylaminobenzaldehyd 500mg, 9 ml Perchlorsäure 70% (HClO₄); Essigsäure ad. 25 ml.

Stopreagenz: 20% CCl₃COOH, 0.1M HgCl₂

In Einweg-Plastikreagenzgläschen wurde die Enzymprobe (X μ l) im Puffer (1300 μ l-X μ l) bei 37°C während 30 Minuten vorinkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l ALA wurde während 20 Minuten inkubiert. Nach Abkühlung im Eis wurde 1ml Stopreagenz zugesetzt, und der weisse Niederschlag wurde bei 2'400 x g während 4 Minuten zentrifugiert. 1ml des resultierenden Überstandes wurde auf 1ml Ehrlichreagenz gegeben und erneut bei 2'400 x g während 4 Minuten zentrifugiert. Anschliessend wurde die optische Dichte bei 554 nm gegen den Nullwert (0.5ml Ehrlichreagenz und 0.5ml Wasser) bestimmt. Aus der gemessenen Absorption lässt sich die Spezifische Aktivität wie folgt errechnen.

$$SA = (3.333 * ABS * 1000) / (\epsilon * Protein (mg) * t(h)) \quad [mol \text{ PBG} \times mg^{-1} \times h^{-1}]$$

Extinktionskoeffizient 62'000 [l mol⁻¹ x cm⁻¹]

Inkubationszeit 0.333 [h]

ABS: Absorption bei 554 nm

11.2.4. Bestimmung der pH-Abhängigkeit der PBGS

Die PBGS wurde auf ihre pH-Abhängigkeit innerhalb eines pH-Bereiches von 4.3 - 10.5 (Puffer 1- 8; siehe Tabelle 40) untersucht. Jeder Puffer enthielt neben NaPO₄ zusätzlich 10 μ M ZnCl₂, 10 mM MgCl₂ und 12.3 β -Mercaptoethanol. Puffer 6,7,8 erwiesen sich als trübe Lösungen. Das Enzym wurde in 25 ml 10 μ M ZnCl₂, 10 mM MgCl₂ und 12.3 β -Mercaptoethanol wässrigen Lösung aufgenommen. Zur Aktivitätsbestimmung wurde die Methode des PBGS-Assay angewandt. Wie im untenstehenden Pipettierschema wurde die Aktivität für drei ALA-Konzentrationen (79 μ M, 159 μ M, 397 μ M) ermittelt (Tabelle 39). Die Vorinkubation betrug 30 und die Inkubation 14 Minuten. Im Inkubationsversuch mit Puffer bei pH 8 wurde am meisten PBG gebildet

PBGS-Lösung	100 µl	100 µl	100 µl
Puffer 1-8	1360 µl	1320 µl	1200 µl
ALA [2.985 mM]	40 µl	80 µl	200 µl

Tabelle 39: Pipettierschema zur Bestimmung der Aktivität der PBGS in Abhängigkeit des pH

	pH	NaH ₂ PO ₄ [M]	Na ₂ HPO ₄ [M]	Na ₃ PO ₄ [M]	PBG [µM][1]	PBG [µM][2]	PBG [µM][3]
Puffer 1	4.3	0.100			0	0	0
Puffer 2	5.8	0.080	0.020		0.0654	0.0158	0
Puffer 3	6.7	0.050	0.050		0.948	0.6527	0.42258
Puffer 4	7.3	0.020	0.080		1.515	1.2697	0.96221
Puffer 5	8.0	0.005	0.095		1.8748	1.7002	1.3272
Puffer 6	8.25		0.100		1.839	1.6546	1.3312
Puffer 7	9.15		0.095	0.005	1.7161	1.4701	1.1666
Puffer 8	10.5		0.090	0.010	1.1725	0.92451	0.68842

Tabelle 40: PBG-Bildung in Abhängigkeit des pH bei verschiedenen ALA-Konzentrationen: [1] 79 µM; [2] 159 µM; [3] 397 µM

11.3. Enzym Assay der PBGS

11.3.1. Allgemeines

Die Inkubationen wurden in 5 ml Einweg-Tuben aus Polypropylen mit den Dimensionen (12 x 75 mm) durchgeführt. Während der Vorinkubations- und Inkubationszeit wurden die Tuben mit Weich-Polyethylenstopfen (Ø 11mm) verschlossen. Die Konzentration an PBGS war in allen Tuben während eines Inhibitionsversuches identisch (ca. 6 µg). Die Inkubationen wurden jeweils in zwei parallelen Ansätze durchgeführt.

Der Inhalt eines Eppendorfröhrchens, welches angereichertes Enzym aus der 4. Aufreinigung der Hauptkultur beinhaltet, wird aufgetaut und in 100 ml Inkubationspuffer verdünnt.

11.3.2. PBGS bei reversiblen Inhibitoren

In Tuben wurde 400 µl PBGS Lösung mit PO₄-Puffer und Inhibitor, wenn nicht anders spezifiziert, während 30 Minuten vorinkubiert. Es wurde in folgender Sequenz in die Tuben

pipettiert : (1) Inhibitor- (2) PBGS- (3) Pufferlösung. Dabei war der Inhibitor in H₂O oder im Inkubationspuffer gelöst. (Tabelle 41 und 42)

Bei Verwendung von DMSO als Kosolvens des Inhibitors wurde die Sequenz der Zugabe leicht modifiziert: (1) Inhibitor- (2) Wasser/DMSO- (3) PBGS- (4) Pufferlösung. Der Inhibitor wurde in einem Volumen von 10 ml H₂O/DMSO Gemisch gelöst, wobei der Anteil an DMSO maximal 1 ml betrug. Jede Tube wurde mit einem gleichen DMSO/H₂O Gemisch versetzt, so dass sich in allen Tuben gleiche Menge an DMSO (maximal 20 µl) befanden (Tabelle 43).

Nach Zugabe von x µl einer 2.985 mM ALA Lösung erreichte man ein Volumen von 1.5 ml.

	A	B	C	D
Inhibitor in H ₂ O	0 µl	50 µl	100 µl	200 µl
PBGS-Lösung	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
Puffer	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml
ALA	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl

Tabelle 41: Typisches Pipettierschema für einen Inhibitor gelöst in H₂O.

	A	B	C	D
Inhibitor gelöst in Puffer	0 µl	300 µl	500 µl	700 µl
PBGS-Lösung	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
Puffer	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml
ALA	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl

Tabelle 42: Typisches Pipettierschema für einen Inhibitor gelöst im Inkubationspuffer.

	A	B	C	D
Inhibitor gelöst in DMSO/H ₂ O	0 µl	50 µl	100 µl	200 µl
DMSO/H ₂ O	200 µl	150 µl	100 µl	0 µl
PBGS-Lösung	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
Puffer	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml
ALA	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl	20, 40, 60, 80, 100, 200 µl

Tabelle 43: Typisches Pipettierschema für einen Inhibitor gelöst in DMSO/H₂O

Nach einer Inkubationszeit von genau 15 resp. 20 Minuten wurde die enzymatische Reaktion gestoppt, indem man die Tuben in Eis stellte, sogleich mit 1 ml des Stopreagens versetzte und anschliessend während 4 Minuten bei 2'400 x g zentrifugierte. Der Überstand wurde jeweils auf 1 ml Ehrlichreagenz gegeben, welches zuvor in eine neue Tube pipettiert wurde. Nach erneuter

Zentrifugation (4 Minuten, $2'400 \times g$) wurde zur Messung der Absorption bei 556 nm die rosa farbige Lösung in 1.5 ml Plastikküvetten aus Polystyrol gegeben.

11.3.3. Bestimmung des irreversiblen Verhaltens der Inhibitoren im Enzym Assay

Bei diesen Inkubationsversuchen wurde durch Variation der Inkubationszeit wie in Tab. 44 aufgeführt der Assay nur für eine Inhibitorenkonzentration durchgeführt. Im Idealfall blieben die PBGS-Bildung im Fall A und C identisch und eine Abnahme im Fall D im Vergleich zu Fall B kennzeichnen ein irreversibles Verhalten.

	A	B	C	D
Inhibitor gelöst in Puffer	0 μ l	400 μ l	0 μ l	400 μ l
PBGS-Lösung	400 μ l	400 μ l	400 μ l	400 μ l
Puffer	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml
Vorinkubationszeit (z. B.)	20 min	20 min	120 min	120 min
ALA	20, 40, 60, 80, 100, 200 μ l	20, 40, 60, 80, 100, 200 μ l	20, 40, 60, 80, 100, 200 μ l	20, 40, 60, 80, 100, 200 μ l

Tabelle 44: Typisches Pipetierschema zur Bestimmung der Irreversibilität.

Oft konnten potentielle irreversible Inhibitoren nur in einem $H_2O/DMSO$ gelöst werden (Tabelle 45).

	A	B	C	D
Inhibitor gelöst in $DMSO/H_2O$	0 μ l	200 μ l	0 μ l	200 μ l
$DMSO/H_2O$	200 μ l	0 μ l	200 μ l	0 μ l
PBGS-Lösung	400 μ l	400 μ l	400 μ l	400 μ l
Puffer	ad. 1.5 ml	ad. 1.5 ml	ad 1.5 ml	ad 1.5 ml
Vorinkubationszeit (z. B.)	20 min	20 min	120 min	120 min
ALA	20, 40, 60, 80, 100, 200 μ l	20, 40, 60, 80, 100, 200 μ l	20, 40, 60, 80, 100, 200 μ l	20, 40, 60, 80, 100, 200 μ l

Tabelle 45: Typisches Pipetierschema für einen Inhibitor gelöst in $DMSO/H_2O$ zur Bestimmung der Irreversibilität

11.3.4. Dialyseversuch zur Unterscheidung zwischen Slow Binder und reinem irreversiblen Inhibitor

11.3.4.1. Dialyseversuch gezeigt an 5-Cyanolevulinsäuremethylester

Eine PBGS-Probe isoliert bei der 4. Aufreinigung wurde in 10 ml 0.1 M Na_2PO_4 Puffer (pH=8.0), 10mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 μM ZnCl_2 , 12.3 mM Mercaptoethanol aufgenommen und je 4 ml dieser Enzymlösung wurden auf zwei 5 ml Einwegtuben verteilt.

Die eine Tube wurde zuvor mit 5.5 mg 5-Cyanolevulinsäuremethylester und 50 μl DMSO versetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden und 45 Minuten konnte folgende spezifische Aktivität ausgemacht werden.

Spezifische Aktivität:

Tube mit Inhibitor: 12.6 U/mg

Tube ohne Inhibitor: 20.9 U/mg

Je 1 ml dieser Enzymlösungen wurden in einen Dialyseschlauch (1 x 10 cm) gegeben und beidseitig verschlossen. Der eine Dialyseschlauch (mit Inhibitor) wurde in ein Becherglas, welches 3 l 0.1 M NaPO_4 Puffer (pH=8.0), 10 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 μM ZnCl_2 , 12.3 mM Mercaptoethanol enthält. Der zweite Dialyseschlauch (ohne Inhibitor) wurde in ein mit 1 l desselben Puffers versehenes Becherglas gegeben. Nach einer Dialysezeit von 48 Stunden bei 4°C wurde die spezifische Aktivität bestimmt:

Spezifische Aktivität:

Tube mit Inhibitor: 20.8 U/mg

Tube ohne Inhibitor: 21.6 U/mg

11.3.4.2. Bemerkung zur Durchführung des Dialyseversuchs

Bei Inhibitoren, wie beispielsweise 2-Nitrobenzaldehyd, die sich gut im Puffer lösen liessen, wurde kein DMSO als Kosolvens verwendet. Im weiteren kann der Dialysepuffer während der Dialyседauer ausgewechselt werden.

12. SYNTHETISCHER TEIL

12.1. Synthese der ALA und dessen Dimerisationsprodukt

12.1.1. Synthese von 5-Bromolevulinsäuremethylester

In einem 1.5l Sulferkolben (Thermometer, Rückflusskühler, Tropftrichter) wurden 104.59g (0.903 mol) Levulinsäure (8) in 900ml MeOH vorgelegt. Über eine Dauer von 8 Stunden wurden portionenweise 47 ml (146.17 g; 0.914 mol) Br₂ zugegeben, so dass sich die Reaktionslösung nicht über 30°C erwärmte. Nach weiteren 15 Stunden hat sich das anfangs rötliche Reaktionsgemisch entfärbt. Es wurde während 3 Stunden zum Rückfluss erhitzt und anschließend zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 400ml CH₂Cl₂ aufgenommen, zweimal mit je 200ml Wasser und einmal mit 200ml 20% NaHCO₃ ausgeschüttelt. Danach wurde die organische Phase mit 200ml Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Einengen zur Trockene wurde die braungelbe Flüssigkeit (126 g) bei 0.04 mbar über eine Widmer Kolonne (20cm) destilliert. Nach der Destillation erhielt man 63.8 g 5-Bromolevulinsäure (88), was einer Ausbeute von 33.8 % entspricht.

Rf: (Kieselgel 60, 2,4-Dinitrophenylhydrazin, Hexan:AcOEt 1:1): 0.4

Sdp.: 68-75°C 0.04

¹H-NMR: (CDCl₃) 3.953 (s, 2H, CBrH₂ (C5)); 3.687 (s, 3H, OCH₃, (C6)); 2.97

(t, ³J(2,3)= 6.09 CH₂ (C2 od.C3)); 2.69 (t, ³J(2,3)= 6.45 CH₂ (C2 od.C3))

¹³C-NMR: (CDCl₃) 200.6 (C(4)); 172.8 (C(1)); 51.99 (C(6)); 34.45 und 31.15 (C(2) und C(3)); 28.18 (C(5))

IR: (NaCl-Film) 3450 w, 3000vs, 2954vs, 2849m, 1742 vs br, 1439 vs, 1412 vs, 1359vs, 1322vs, 1207vs br, 1080s, 1025s, 988s, 863m, 844m, 770w, 694m.

GC: Rf: 8.2-8.6 min; 100°C; Säule: OV1

12.1.2. Synthese von 5-Phthalimidlevulinsäuremethylester

41.3g (0.22 mol) Kaliumphthalimid wurden in einem 2-Halskolben in 240 ml DMF aufgenommen und unter Stickstoff auf 0° abgekühlt. 46.16 (0.22 mol) 5-Bromolevulinsäure wurden über eine Dauer von 2 Stunden zugegeben, wobei sich das Reaktionsgemisch rostrot verfärbte. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur liess man über Nacht weiterreagieren. Durch Zugabe von H₂O fiel ein Niederschlag aus, welcher nach Filtration in CHCl₃ aufgenommen mit 2N NaOH extrahiert und mit Wasser gewaschen wurde. Nach Trocknen über MgSO₄ wurde zur Trockene eingeeengt und in Hexan/CHCl₃ umkristallisiert. Man erhielt 31.308g (0.113 mol) Kristalle von 5-Phthalimidlevulinsäuremethylester (89), was einer Ausbeute von 52% entspricht.

Rf: (Kieselgel 60, UV, Hexan:AcOEt 1:1): 0.28

¹H-NMR: (CDCl₃) 7.90-7.85 (AA'XX' System, 2H, CH(C10) und CH(C10')); 7.76-7.72

(AA'XX' System, 2H, CH(C9) und CH(C9')); 4.55 (s, 2H, CH₂ (C5)); 3.69 (s, 3H, CH₃ (C6)); 2.86-2.82 (m, CH₂ (C2 od.C3)); 2.71-2.67 (m, CH₂ (C2 od.C3))

12.1.3. Synthese von 5-Aminolevulinsäure

Über Nacht wurden 19.019g (0.07 mol) 5-Phthalimidlevulinsäuremethylester (89) in 200ml 5N HCl zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde auf -30° abgekühlt, es fiel ein Niederschlag aus, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde mit einer Spatelspitze Aktivkohle versetzt, während 10 Minute erwärmt und über Cellit filtriert. Das Filtrat wurde eingeeengt und in MeOH/iPrOH/Hexan

umkristallisiert. Die Kristalle wurden in 35ml 5N HCl aufgenommen und über Nacht zum Rückfluss erhitzt. Anschliessendes Lyophilisieren brachte reine δ -Aminolevulinsäure (4).

Smp. 149-150° C (Zersetzung)

R_f (RP-18 F245S, Ninhydrin, gelb, CH₃CN/H₂O 13:1): 0.24

¹H-NMR (D₂O) 4.08 (s, 2H, CH₂(C5)); 2.89-2.83 (m, CH₂ (C2 od.C3)); CH₂ (C2 od.C3)

$\lambda_{266}=29.7$

Anal. Ber. für C₅H₁₀ClNO₃ (167.5): C 35.84, H 6.01, N 8.35, Cl 21.15;

gef. C 34.98, H: 5.94, N: 8.08

HPLC: Säule: 0.4cm X 25cm; Li Chrosorb RP 8; R_f: 5.66min, Abs. 266nm,

Fliessgeschwindigkeit: 0.5ml/min, Fliessmittel: 0.1M Puffer KH₂PO₄ (pH=4.5)

12.1.4. Synthese von 2,5 Dipropionsäurepyrazin

g (2.3 mmol) 5-Aminolevulinsäure (4) wurden in 25ml 5N KOH gelöst und mit 1.3g HgCl₂ (4.7 mmol) versetzt, wobei sich die Reaktionslösung anfangs grünlich und allmählich schwarz verfärbte. Nach einer Reaktionsdauer von 4 Stunden (unter N₂) wurde während 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Die dabei resultierende überstehende braune Lösung wurde mit HCl sauer (pH=1) gestellt und anschliessend dreimal mit je 100ml AcOEt extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Nach Einengen zur Trockene erhielt man 80mg (0.3mmol) des Produktes (7) in einer Ausbeute von 30%.

R_f (RP-18 F245S, UV, MeOH/H₂O 3:7): 0.35

Anal. Ber. für C₁₀H₁₂N₂O₄ (224.2): C 53.57, H 5.39, N 11.49 ;

gef. C 51.25, H: 5.27 N: 11.90

¹H-NMR: (DMSO) 8.47 (s, 2H, CH (C2) und CH (C2')); 2.984 (t, 4H, ³J(4,5) resp.

³J(4',5')= 7.14, CH₂ (C4) und CH₂(C4') oder CH₂ (C5) und CH₂(C5'));

2.689 (t, 4H, ³J(4,5) resp. ³J(4',5')= 7.14, CH₂ (C4) und CH₂(C4') oder CH₂ (C5) und CH₂(C5'))

¹³C-NMR: (DMSO) 173.7, C(6) und C(6'); 152.96, C(3) und C(3'); 143.26, C(2) und C(2');

32.16, C(4) und C(4') oder C(5) und C(5'); 29.1, C(4) und C(4') oder C(5) und C(5')

CI-MS: 225 (M⁺+1, 62); 224 (M⁺, 16); 207 (8); 179 (44); 161 (2); 133 (17); 85 (100)

12.2. Synthese von Substrat- und Zwischenproduktanaloga

12.2.1. Synthese von Levulinsäurebenzylester

Zu 0.934 g (8 mmol) Levulinsäure (8) in 40 ml trockenen Benzol wurde unter Stickstoff 3.195 g (11 mmol) DMF-dibenzylacetal (91) getropft und zum Rückfluss erhitzt. Nach 4 Stunden wurde das gelbe Reaktionsgemisch in Et₂O aufgenommen, zweimal mit je 100 ml 1 N HCl, anschliessend mit 100 ml H₂O, zweimal mit je 100 ml gesättigter NaHCO₃ Lösung und nochmals dreimal mit je 100 ml H₂O ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde zur Trockene eingeeengt (3.3 g). Bei der anschliessenden Säulenchromatographie (130 g Kieselgel, 33x37, Hexan/EtOAc 6.5:3.5) wurden die letzten Fraktionen vereinigt, zur Trockene eingeeengt. Bei der nachfolgenden fraktionierten Kugelrohrdestillation (150 °C, 8x10⁻² mbar) konnten 0.832 g an reinem Produkt (90) gewonnen werden, was einer Ausbeute von 50 % entspricht.

R_f (Hexan/EtOAc 1:1) 0.433 (KMnO₄)

¹H-RMN (CDCl₃): 7.38-7.29 (m, 5H Aromat), 5.11 (s, 1H, C1'), 2.76(t, ³J=6.57, 2H, C2 oder C3), 2.63(t, ³J=6.38, 2H, C2 oder C3), 2.1797 (s, 1H, C5).

^{13}C -NMR (CDCl_3): 206.46 (C4), 172.51(C1), 135.79(C2'), 128.49(C4'), 128.17(C5'), 128.11(C3'), 66.41(C1'), 37.84(C3), 29.80(C5), 27.94 (C2)

12.2.2. Synthese von 4-Chlor-2-butanon

Nach Kühlung auf 0 °C eines mit 30.0 g (181 mmol) *tetra*Ethylammoniumchlorid versehenen trockenen 250 ml Zweihalskolben werden 6.33 g (90.4 mmol) Buten-2-on werden zugegeben. Nach Zugabe von 80 ml Trifluoressigsäure wurde innert 10 Minuten sämtliches Ausgangsprodukt umgesetzt.

Die gelbe Reaktionslösung wurde in ein Becherglas gegeben und mit NaHCO_3 neutralisiert. Nachdem fünf Mal mit CH_2Cl_2 extrahiert wurde, wurde die organische mit Wasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach Einengen zur Trockene wurde das Produkt in einer Vakuumdestillation (64-66 °C; 86-89 mbar) gereinigt. Es wurden 7.65 g (71.8 mmol; 80%) 4-Chlor-2-butanon (92) erhalten.

Rf: (Hexan/EtOAc 1:1) 0.5

^1H -RMN (CDCl_3): 3.73 (t, $^3\text{J}=6.6$, 2H, C3 oder C4), 2.93 (t, $^3\text{J}=6.6$, 2H, C3 oder C4), 2.22 (s, 3H, C1).

^{13}C -NMR (CDCl_3): 205.18 (C2), 45.79 (C4), 38.22 (C3), 30.28 (C1)

12.2.3. Synthese von 4-Nitro-2-butanon

In einem getrockneten 250 ml Zweihalskolben wurden unter N_2 7.65 g (71.7 mmol) 4-Chlorbutanon (92) und 9.9 g (143 mmol) in 80 ml DMF bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden wurde das Reaktionsgemisch über Cellit filtriert. Das Cellit wurde mit AcOEt nachgewaschen. Die organische Phase wurde 6 mal mit je 150 ml H_2O gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde zur Trockene eingengt. Mittels einer Vakuumdestillation (40 mbar, 65 °C) wurde das DMF entfernt. Anschliessende Kugelrohrdestillation (25 mbar, 130-150 °C) lieferte 4.27 g (36.4 mmol; 51%) reines 4-Nitro-2-butanon (40).

Rf: (Hexan/EtOAc 3:2) 0.266 (KMnO_4)

^1H -RMN (CDCl_3): 4.64 (t, $^3\text{J}=6.05$, 2H, C3 oder C4), 3.09 (t, $^3\text{J}=6.05$, 2H, C3 oder C4), 2.27 (s, 3H, C1).

pKa-Bestimmung pKa = 9.17: Potentiometrische Titration: 0.478 g (4.741 mmol) KNO_3 und 58.4 mg (0.499 mmol) 40 wurden in 7 ml H_2O vorgelegt und mit 1M NaOH titriert. Die pKa-Bestimmung erfolgte am halben Äquivalenzpunkt.

12.2.4. Synthese von 5-Cyanolevulinsäuremethylester

In einem 50 ml Kolben werden 0.62 g (9.5 mmol) in 10 ml H_2O und 20 ml THF gelöst. Langsam werden 1.0 g (4.78 mmol) 5-Bromlevulinsäure, welches zuvor in 5 ml THF gelöst wurde, zugeben. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden konnte auf dem DC kein Edukt mehr sichtbar gemacht werden. Die gelbliche Reaktionslösung wurde in 20 ml H_2O aufgenommen und 3 mal mit je 20 ml AcOEt extrahiert, mit 2 mal mit je 15 ml gesättigter NaCl Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und zur Trockene eingengt. (Die wässrige Phase, die gemäss DC noch immer Produkt enthielt, wurde in einem späteren Versuch über Nacht einer kontinuierlichen AcOEt Extraktion unterworfen.) Nach einer Kugelrohrdestillation (155 °C; 5x 10-2 mbar) wurde 0.432g des Rohproduktes chromatographisch (23 g Kieselgel; Hexan/AcOEt 2:1) aufgereinigt. Die letzten Fraktionen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Es resultierten 75 mg (10%) an reinem 5-Cyanolevulinsäuremethylester (62).

R_f: (Hexan/EtOAc 1:1) 0.22 (KMnO₄)

¹H-RMN (CDCl₃): 3.69 (s, 3H, CH₃ (C6)); 3.56 (s, 2H, CH₂ (C5)); 2.92-2.86 (m, CH₂ (C2 od.C3)); 2.72-2.65 (m, CH₂ (C2 od.C3))

12.2.5. Synthese von 3-Thiocyanolevulinsäuremethylester

g (34.3 mmol) 3-Bromlevulinsäuremethylester (96) werden zusammen mit 60 ml trockenen EtOH in einem Zweihalskolben vorgelegt. Nach Zugabe von 5.00 g (51.5 mmol) KSCN dauerte die Reaktion unter mechanischem Rühren zwei Stunden. Nach Filtration wurde zur Trockene eingeeengt, und der Rückstand wurde in einem Wasser/AcOEt-Gemisch aufgenommen. Nach Trennung der Phase wurde die wässrige Phase viermal mit AcOEt extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschliessend zur Trockene eingeeengt. Man erhielt 4.514 g (24.11mmol) 3-Thiocyanolevulinsäuremethylester (94), was einer Ausbeute von 70% entspricht.

IR m (ν C-H); 2852 m (ν C-H); 2158 m (ν SCN); 1723 s (ν C=O); 1439 m (ν CH₃C=O); 1411 m; 1363 m (δ C-H); 1213 m; 1159 m (δ OCH₃); 1046 m; 1021 m; 999 m; 946 m; 900 m; 849 m
¹H-RMN (CDCl₃): 4J(3,2^a)= 5.5 4J(3,2^b)= 8.0, 1H, CH (C3)); 3.73 (s, 3H, CH₃ (C6)); 3.25 (dd, 4J(2^b,3)= 8.1 3J(2^b,2^a)= 18.00, 1H, CH^b (C2)); 2.94 (dd, 4J(2^a,3)= 5.4 3J(2^a,2^b)= 17.00, 1H, CH^a (C2)); 2.46 (s, 3H, CH₃ (C5))
¹³C-RMN (CDCl₃): C(4)); 170.3 (s, C(1));109 (s, C(7)); 52.56 (q, C(6)); 49.91 (d, C(3)); 35.55 (t, C(2)); 27.74 (q, C(5))
 MS (EI; CH₂Cl₂) (M⁺+1); 156 (100, M⁺-CH₃O); 149 (3); 145 (12); 1443 (2); 138 (6); 129 (8, M⁺- SCN); 118 (26); 97 (18); 85 (3); 69 (1); 55 (3); 45 (1); 43 (14, CH₃C=O);

12.2.6. Synthese von 5-Thiocyanolevulinsäuremethylester (95)

Prinzipiell gleiches Vorgehen wie bei der Herstellung von 3-Thiocyanolevulinsäuremethylester.

Ausgangsprodukte:

7.052g (33.73 mmol) 88

5.0494 g(52 mmol) KSCN

Produkt:

6.543 g (34.9 mmol) 95

R_f (EtOAc): = 0.57

IR m (ν C-H); 2929 m (ν C-H); 2850 w (ν C-H); 2159 m (ν SCN); 1729 vs (ν C=O); 1439 s (ν CH₃C=O); 1397 m; 1373 s (δ C-H); 1327 m (δ C=O ester); 1245 s; 1245 s; 1207 s; 1180 s (δ OCH₃);1084 m; 1045 m; 990 m; 927 w; 867 w; 847 w
¹H-RMN (CDCl₃): 2H, CH₂ (C5)); 3.69 (s, 3H, CH₃ (C6)); 2.89-2.82 (m, 2H, CH₂ (C2)); 2.73-2.67 (m, 2H, CH₂ (C3))
¹³C-RMN (CDCl₃): C(4)); 172.6 (s, C(1));134 (s, C(7)); 52.16 (q, C(6)); 43.72 (t, C(5)); 35.82 (t, C(3)); 28.01 (t, C(2))
 MS (EI; CH₂Cl₂) M⁺+1); 156 (12, M⁺-CH₃O); 128 (7, M⁺-COOCH₃ ou M⁺- HSCN); 115 (100, M⁺- CH₂SCN); 101 (5, M⁺-CHCH₂COOCH₃); 87 (2; CH₂CH₂COOCH₃); 72 (1; CH₂SCN); 59 (1; HSCN)

12.2.7. Synthese von 2-Hydroxylevulinsäure (43) und *trans*-4-Oxo-2-pentensäure (45)

In einem Zweihalskolben wurden 2.00 g (15.6 mmol) *trans*-4-Oxo-2-pentensäuremethylester (44) in 20 ml 2 N H₂SO₄ während 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Danach wurde die wässrige Phase 10 mal mit je 30 ml Et₂O extrahiert und zur Trockene eingengt. Nach der folgenden Säulenchromatographie (60g; Kieselgel; EtOAc/Heptan 2:3) wurde das Rohprodukt in EtOAc/Hexan umkristallisiert. Man erhielt dabei 132 mg an 43, was einer Ausbeute von 8 % entspricht.

Die oben erhaltene wässrige Phase wurde zur Isolation von 45 über Nacht einer kontinuierlichen Etherkonzentration unterworfen. Nach Einengen zur Trockene und Umkristallisation in THF/Hexan erhielt man 60.9 mg (Ausbeute: 3%) an 45.

trans-4-Oxo-2-pentensäure

Smp = 122-123°C

R_f (MeOH/CH₂Cl₂ 1:3 + 6.25 % de CH₃COOH): R_f = 0.765

¹H-RMN (CDCl₃): ³J(2,3) = 16.2, 1H, CH (C2)); 6.89 (d, ³J(3,2) = 16.1, 1H, CH (C3)); 2.40 (s, 3H, CH₃ (C5))

2-Hydroxylevulinsäure

R_f (MeOH/CH₂Cl₂ 1:3 + 6.25 % de CH₃COOH): 0.3

¹H-RMN (CDCl₃): ⁴J(2,3^a) = 4.4 ⁴J(2,3^b) = 6.0, 1H, CH (C2)); 3.15-2.92 (m, 2H, CH₂ (C3)); 2.23 (s, 3H, CH₃ (C5))

12.2.8. Synthese von 3-Acetyllevulinsäuremethylester (98)

In einem 200 ml 3-Halskolben werden in 30 ml getrocknetem Aceton 5 g (50 mmol) Acetylaceton (64), 1.7 g (10 mmol) Kaliumiodid und 3.3 g (30 mmol) Kaliumcarbonat. Es werden 5 g (30 mmol) Bromessigsäuremethylester (97) während einer Minute zugetropf. Unter mechanischem Rühren wurde während 8 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde anschliessend filtriert und einer Kugelrohrdestillation unterworfen (120°C, 0.1 mbar). Nach Kieselgelchromatographie (200 g, 40 x 45 cm, Hexan : AcOEt 2:1) und Einengen zur Trockene wurde 2.7 g an Produkt (98) erhalten, was einer Ausbeute von 54 % entspricht.

R_f: (Hexan/EtOAc 2:1) 0.25

¹H-NMR (CDCl₃): 4.07 (t, J = 7.2, 1H, CH), 3.62 (s, 3H, COOCH₃, Enol), 3.58 (s, 3H, COOCH₃, Keton), 3.19 (s, CH₂, Enol), 2.79 (d, J = 7.2, 2H, CH₂, Keton), 2.18 (s, 6H, H₃CC=O, Keton), 2.06 (s, H₃CC-OH, Enol); Keton : Enol = 60 : 40

¹³C-NMR (CDCl₃): 202.0 (C=O), 191.3 (C=COH), 171.4 (COOCH₃, Enol), 171.1 (COOCH₃, Keton), 103.9 (C=COH), 62.2 (CH), 51.35 (COOCH₃, Enol), 51.3 (COOCH₃, Keton), 32.2 (CH₂, Enol), 31.6 (CH₂, Keton), 29.1 (CH₃C=O) 22.6 (CH₃COH)

IR 3005 (w), 2956 (m), 1734 (vs), 1605 (m), 1438 (s), 1360 (s), 1256(s), 1203 (s), 1163 (s), 1003 (m), 953 (m), 841 (w), 762 (w), 703 (w)

MS 172 (M⁺, 11), 154(6), 141 (22), 130 (77), 113 (67), 98 (100), 71 (83), 55 (30)

12.2.9. Synthese von 3-Acetyllevulinsäure (99)

In 100 ml einer 0.1M K₂PO₄ Lösung (pH=7.5) wurde 0.36 g (0.002 mol) 3-Acetyllevulinsäuremethylester (98) in Anwesenheit von 400 µl PLE hydrolysiert. Nach einer Stunde wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 0.5 N NaOH gestoppt. Die wässrige

Lösung wies einen pH-Wert von 9 auf und wurde zweimal mit je 25 ml Chloroform extrahiert. Die wässrige Lösung wurde mit 4N HCl sauer gestellt und mit gesättigter NaCl Lösung versetzt. Nach 24 Stunden kontinuierlicher Etherextraktion wurde chromatographisch (Kieselgel, 25 cm x 2 cm; Hexane/Aceton/Essigsäure 100/100/1) und anschliessend mit Kugelrohrdestillation (170 °C, 40 mbar) aufgereinigt. Man erhielt 0.11g an 3-Acetyllevulinsäure (99), was einer Ausbeute von 35 % entspricht.

Rf: (Hexan/Aceton/AcOH 100:100:1) 0.64

¹H-RMN (CDCl₃): 10.75(s, 1H, COOH), 4.09(t, J = 7.1, 1H, CH) 3.28 (s, CH₂, Enol), 2.90 (d, 2H, CH₂, Keton, ³J = 7.0); 2.14 (s, 6H, H₃CC=O, Keton), 2.06 (s, H₃CC-OH, Enol)

¹³C-NMR (CDCl₃): 202.51 (C=O), 192.15 (C=COH), 177.74 (COOH, Enol), 177.65 (COOH, Keton), 103.9 (C=COH), 62.99 (CH), 33.06 (CH₂, Enol), 32.25 (CH₂, Keton), 29.65(CH₃C=O) 23.34 (CH₃COH)

IR 3400-2600 (br), 2986 (s), 1709 (vs), 1417 (s), 1361(s), 1233 (s), 1157 (s), 1042 (m), 951 (m), 759 (w), 678 (w), 611(w)

MS 158 (7), 140 (4), 125(4), 113 (17), 98 (100), 71 (44), 55(21)

13. LITERATUR

- 1) B. Franck, *Angew. Chem.* 1996, 94, 327-400.
- 2) D. Shemin, *Bio Essays* 1989, 10, 30-35.
- 3) A.R. Battersby, *Science* 1994, 264, 1551-1557.
- 4) A.R. Battersby, B. Cameron, J. Crouzet, L. Debussche, D. Thibaut, M. Vuilhorgne, F.J. Leeper, Blanche F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 383-411.
- 5) A.R. Battersby, K. Frobel, *Chemie in unserer Zeit* 1982, 16, 124-134.
- 6) I. Scott, *Tetrahedron* 1994, 50, 13315-13333.
- 7) F.J. Leeper, *Natural Product Reports* 1989, 171-202.
- 8) I. Scott, *Chemie in unserer Zeit* 1993, 86-93.
- 9) B. Franck, H. Stratmann, *Heterocycles* 1981, 15, 919-923.
- 10) Neier, R. CHEMICAL SYNTHESIS OF PORPHOBILINOGEN AND STUDIES OF ITS BIOSYNTHESIS. In: *Advances in Nitrogen Heterocycles*, Greenwich, Connecticut: JAI Press Inc., 1996, p. 35-146.
- 11) Jackson, H.A. Pyrroles. In: *Comprehensive Organic Chemistry*, edited by Barton, D. and Ollis, D. Oxford New York Toronto: PERGAMON PRESS, 1997, p. 275-321.
- 12) T. Laue, A. Plagens. *Namen- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie*, Stuttgart: Teubner Studienbücher, 1995.
- 13) A. Gossauer. *Die Chemie der Pyrrole*, Berlin. Heidelberg. New York: Springer Verlag, 1974.
- 14) D. Shemin, D.L. Nandi, *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 1236-1242.
- 15) Jordan, P.M. The biosynthesis of 5-aminolaevulinic acid and its transformation into uroporphyrinogen III. In: *Biosynthesis of Tetrapyrroles*, edited by Jordan, P.M. Amsterdam London New York Tokyo: Elsevier, 1991, p. 1-66.
- 16) E.K. Jaffe, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1995, 27, 169-179.
- 17) D. Shemin, F.K. Baker-Cohen, D.L. Nandi, *J. Biol. Chem.* 1968, 213, 1224-1230.
- 18) Shemin, D. δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase. In: *The Enzymes*, edited by Boyer, P.D. New York and London: Academic Press, 1972, p. 323-333.
- 19) H. Bertschy. *Pyrrole über die gekreuzte Aldolreaktion*, Universität Fribourg, Péroilles, CH-1700 Fribourg: Inaugural-Dissertation, Diss n° 1003, 1991.
- 20) R. Lüdnd. *Untersuchungen Zum Enzymmechanismus der δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase aus Rhodospseudomonas spheroides*, Universität Fribourg, Péroilles, CH-1700 Fribourg: Inaugural-Dissertation, Diss n° 1001, 1991.
- 21) R. Lüdnd, R. Neier, *Biochem. Biophys. Acta* 1996, 1289, 83-86.
- 22) P.M. Jordan, J.S. Seehra, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1980, 240-242.
- 23) Z. Zaman, P.M. Jordan, M. Akhtar, *Biochem. J.* 1973, 135, 257-263.
- 24) Y. Shioi, M. Doi, *Plant Cell Physiol.* 1988, 29, 843-848.
- 25) R. Neier, R. Lüdnd, J. Walker, *J. Org. Chem.* 1992, 57, 5005-5013.
- 26) P.M. Anderson, R.J. Desnick, *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 6924-6930.

- 27) I. Tsukamoto, T. Yoshinaga, S. Sano, *Biochem. Biophys. Acta* 1979, 570, 167-178.
- 28) I. Tsukamoto, T. Yoshinaga, S. Sano, *Int. J. Biochem.* 1980, 12, 751-756.
- 29) I. Tsukamoto, T. Yoshinaga, S. Sano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975, 67, 294-300.
- 30) A.J. Dent, D. Beyersmann, C. Block, S.S. Hasnain, *Biochemistry* 1990, 29, 7822-7828.
- 31) E.K. Jaffe, G.D. Markham, *Biochemistry* 1988, 27, 4475-4481.
- 32) E.K. Jaffe, G.D. Markham, J.S. Rajagopalan, *Biochemistry* 1990, 29, 8345-8350.
- 33) H.Wu. Wen, D. Shemin, K.E. Richards, R.C. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1974, 71, 1767-1770.
- 34) P.M. Jordan, J.S. Seehra, *Eur. J. Biochem.* 1981, 113, 435-446.
- 35) Y. Echelard, J. Dymetryszyn, M. Drolet, A. Sasarman, *Mol Gen Genet* 1988, 214, 503-508.
- 36) E.K. Jaffe, H.L. Carrell, J.P. Glusker, L. Shimoni, L.J. Keefe, C. Afshar, M. Volin, *Acta Cryst.* 1996, D52, 419-421.
- 37) P. Spencer, P.M. Jordan, *Biochem. J.* 1993, 290, 279-287.
- 38) D. Shemin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1976, 273, 109.
- 39) E.K. Jaffe. *Persönliche Mitteilung (Vortrag in Neuchâtel, 2.4.97)*, 1997. (UnPub)
- 40) P. Spencer, P.M. Jordan, *Biochem. J.* 1994, 300, 373-381.
- 41) M.M. Abboud, M. Akhtar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1976, 1007-1008.
- 42) E.K. Jaffe, *Comments Inorg. Chem.* 1993, 15, 67-92.
- 43) L.W. Myers, M.P. Terranova, H.M. Nash, M.A. Markus, G.L. Verdine, *Biochemistry* 1992, 31, 4541-4547.
- 44) E.K. Jaffe, A. Shafinaz, L.W. Mitchell, K.M. Taylor, M. Volin, G.D. Markham, *Biochemistry* 1995, 34, 244-251.
- 45) D.L. Nandi, D. Shemin, *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 1231-1235.
- 46) E.K. Jaffe, R.M. Petrovich, S. Litwin, *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 8692-8699.
- 47) F.J. Leeper, D. Appleton, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1996, 303-304.
- 48) E.K. Jaffe, W.R. Abrams, H.X. Kaempfen, K.A. Harris, *Biochemistry* 1992, 31, 2113-2123.
- 49) D.P. Tschudy, R.A. Hess, B.C. Frykholm, *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 9915-9923.
- 50) P.S. Ebert, R.A. Hess, B.C. Frykholm, D.P. Tschudy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979, 88, 1382-1390.
- 51) P.J. Brumm, H.C. Friedmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, 102, 854-859.
- 52) T. Engeloch. *Dissertation (in Vorbereitung)*, Neuchâtel: Université de Neuchâtel.
- 53) A.R. Butler, D.G. George, *Tetrahedron* 1993, 49, 7017-7026.
- 54) C. Jarret. *Dissertation (in Vorbereitung)*, Neuchâtel: Université de Neuchâtel.
- 55) R. Breslow, *Chem. Soc. Rev.* 1972, 1, 553.

- 56) R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 170-177.
- 57) A. Chaperon. *Eine kurze Synthese von Porphobilinogen (PBG) - Basierend auf einem Biomimetischen Konzept*, Neuchatel:Universität Neuchatel, 1996. pp. 1-230.
- 58) E.P. Gurba, R.E. Sennett, R.D. Kobes, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1972**, *150*, 130-136.
- 59) Rétey, J. and Robinson, J.A. Aldol and Claisen Type Condensation. In: *Stereospecificity in Organic Chemistry and Enzymology*, Weinheim Deerfield Beach Florida Basel: Verlag Chemie, 1982, p. 99-127.
- 60) Walsh, C. Enzyme- Catalyzed Aldol and Claisen Condensations. In: *Enzymatic Reactions Mechanisms*, edited by Bartlett, A.C. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1979, p. 741-776.
- 61) R.N. Perham, *Biochemical Society Transactions* **1990**, *18*, 185-187.
- 62) M. Marty. *Synthese von enantiomerenreinen Analoga eines möglichen Zwischenproduktes der PBG-Biosynthese*, Université de Neuchâtel:Faculté des Sciences, 1995.
- 63) N.A. McCarroll, *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 425-427.
- 64) B. Lindblad, S. Lindstedt, G. Steen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 4641-4645.
- 65) T.A. Brown. *Gentechnologie für Einsteiger*, Heidelberg:Spektrum, 1993. Ed. 2 pp. 9-281.
- 66) C.A Roessner, M.J. Warren, P.J. Santander, B.P. Atshaves, S.T. Ozaki, N.J. Stolowich, K. Iida, I. Scott, *FEBS Lett.* **1992**, *301*, 73-78.
- 67) C.A Roessner. *Fax*, 1992. (UnPub)
- 68) L.W. Mitchell, E.K. Jaffe, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1993**, *300*, 169-177.
- 69) M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- 70) T.G. Cooper. *The Tools of Biochemistry*, New York:Wiley, 1977.
- 71) A. Chrambach, D. Rodbard, *Science* **1971**, *12*, 440-451.
- 72) L. Stryer. *Biochemie*, Heidelberg Berlin New York:Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1990.
- 73) T. Gefflaut, C. Blonski, J. Perie, M. Willson, *Prog. Biophys. molec. Biol.* **1995**, *63*, 301-304.
- 74) C. Blonski. *Private Kommunikation* , 1997.
- 75) A. Fersht. *Enzyme Structure and Mechanism* , New York:W.H. Freeman and Company, 1985. Ed. 2
- 76) J. Wilde, W. Hunt, D.J. Hupe, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 8319-8321.
- 77) R. Motiu-DeGrood, W. Hunt, J. Wilde, D.J. Hupe, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 2182-2190.
- 78) J. Périé, C. de Albuquerque, C. Blonski, G. Chauvière, P. Gefflaut, M. Page, M. Trinquier, M. Willson, *Bull. Soc. Path. Ex.* **1994**, *87*, 353-361.
- 79) J.V. Schloss, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 348-353.
- 80) T. Gefflaut, C. Blonski, J. Périé, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4*, 2043-2054.

- 81) I.H. Segel. *ENZYME KINETICS Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore: John Wiley and Sons, Inc., 1975.
- 82) A. Cornish-Bowden. *Enzyme Kinetics*, Oxford Washington DC: IRL PRESS, 1988. pp. 1-77.
- 83) N.C. Price, L. Stevens. *Fundamentals of Enzymology*, Oxford: Oxford University Press, 1989. Ed. 2
- 84) S. Granick, D. Mauzerall, *J. Biol. Chem.* 1958, 232, 1119-1140.
- 85) D. Mauzerall, S. Granick, *J. Biol. Chem.* 1956, 219, 435-446.
- 86) D. Shemin, *Methods in Enzymology* 1970, XVII Part A, 205-211.
- 87) P.N.B. Gibbs, P.M. Jordan, *Biochem. J.* 1986, 236, 447-451.
- 88) E.K. Jaffe, M. Volin, C.B. Myers, W.R. Abrams, *Biochemistry* 1994, 33, 11554-11562.
- 89) E.K. Jaffe, G.D. Markham, *Biochemistry* 1987, 26, 4258-4264.
- 90) T.A. Alston, D.J.T. Porter, H.J. Bright, *Acc. Chem. Res.* 1983, 16, 418-424.
- 91) L. Pauling, *Chem. Eng. News* 1946, 24, 1375.
- 92) R. Wolfenden, *Acc. Chem. Res.* 1972, 5, 10-18.
- 93) D.J.T. Porter, H.J. Bright, *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 4772-4780.
- 94) G.R. Pearson, R.L. Dillon, *J. Am. Chem. Soc.* 1953, 75, 2439-2443.
- 95) D. Seebach, *Angew. Chem.* 1990, 102, 1363-1409.
- 96) G.N. Reeke, J.A. Hartsuck, M.L. Ludwig, F.A. Quioco, T.A. Steitz, W.N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1967, 58, 2220-2226.
- 97) W. Liedgens, C. Lütz, A.W. Schneider, *Eur. J. Biochem.* 1983, 135, 75-79.
- 98) D. O'Hagan, H.S. Rzepa, *Chem. Commun.* 1997, 645-652.
- 99) I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 1043-1051.
- 100) W. Tagaki, P. Guthrie, F.H. Westheimer, *Biochemistry* 1968, 7, 905-913.
- 101) J. Wagner, R.A. Lerner, C.F. Barbas III, *Science* 1995, 270, 1797-1800.
- 102) E. Benedikt, H.P. Köst, *Z. Naturforsch.* 1997, 41b, 1593-1594.
- 103) M.S. Gibson, R.W. Bradshaw, *Angew. Chem.* 1968, 23, 986-996.
- 104) H. Bertschy. 'Diplomarbeit in organischer Chemie', Universität Fribourg, 1987.
- 105) *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, 1972. Ed. 53
- 106) H. Brechbühler, H. Büchi, J. Schreiber, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* 1965, 48, 1746-1771.
- 107) J.N. Marx, *Tetrahedron* 1983, 39, 1529-1591.
- 108) H. Plieninger, P. Hess, J. Ruppert, *Chem. Ber.* 1968, 101, 240-243.
- 109) S. Stein, P. Böhlen, S. Udenfriend, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1974, 163, 400-403.

- 110) P. Böhlen, S. Stein, W. Dairman, S. Udenfriend, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1973, 155, 213-220.
- 111) S. De Bernardo, M. Weigele, V. Toome, K. Manhart, W. Leimgruber, P. Böhlen, S. Stein, S. Udenfriend, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1974, 163, 390-399.

14. ANHANG

Auf den folgenden Seiten werden eine Auswahl der Datenblätter der ausgeführten Inkubationen gezeigt. Die Tabellen geben Auskunft über die Vorinkubations- und Inkubationszeit, wie auch über die verwendeten Substrat- und Inhibitorkonzentrationen und über die gemessenen Absorptionswerte. Die in Klammern stehenden Absorptionswerten wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt, weil es sich um "Ausreisser" handelt oder um Werte, die bei zu hohem Verbrauch des Substrates ($\geq 50\%$) gemessen wurden.

Die einzelnen K_M wie auch K_i wurden über K_{mapp} mittels vierer Plots bestimmt:

- (1) Lineweaver-Burk Plot
- (2) Hanes Plot
- (3) Eadie Hofstee-Plot
- (4) "Hyperbel-Plot"

Die in Tabellen 23 - 34 aufgeführten K_i und K_M sind Mittelwerte, welche sich aus dem "Hyperbel-Plot" ergaben.

ALA [μM]	4-Nitro-2-butanon (40) [μM]		1-Hydroxy-4-Nitro-2-butanon (41) [μM]		3-Oxobutanophosphonsäure (42) [μM]							
	0	3.16	6.32	12.6	0	2.88	5.75	11.51	0	1810	3621	7243
39.7	(0.240) (0.269)	(0.239) (0.236)	(0.202) (0.205)	(0.131) (0.150)	(0.243) (0.240)	(0.208) (0.212)	(0.183) (0.173)	(0.115) (0.116)	(0.289) (0.267)	(0.262) (0.268)	(0.212) (0.255)	(0.215) (0.222)
79.4	(0.401) (0.384)	0.355 0.345	0.335 0.345	0.277 0.296	0.346 0.356	0.315 0.313	0.283 0.278	0.209 0.205	(0.432) (0.431)	(0.418) (0.419)	(0.418) (0.411)	(0.370) (0.371)
119.2	0.471 0.454	0.427 0.427	0.400 0.396	0.338 0.346	0.398 0.399	0.360 0.359	0.331 0.331	0.254 0.255	0.522 0.532	(0.533) 0.500	0.509 0.484	0.473
158.9	0.498 0.510	0.474 0.486	0.441 0.447	0.383 0.383	0.416 0.420	0.382 0.383	0.356 0.339	0.279 0.266	0.570 0.585	(0.592) 0.569	0.578 0.565	0.528 0.520
198.6	0.547 0.532	0.486 0.484	(0.482) 0.466	0.408 0.414	0.443 0.435	0.406 0.401	0.373 0.357	0.293 0.292	0.601 0.610	0.599 0.590	0.601 0.610	0.569 0.572
397.3	0.608 0.593	0.565 0.560	0.526 0.527	0.471 0.475	0.464 0.465	0.437 0.440	0.405 0.405	0.344 0.342	0.675 0.681	0.668 0.672	0.668 0.662	0.633 0.638
Vmax (1)	1.93	1.87	1.71	1.58	2.03	1.95	1.81	1.62	2.15	2.14	2.18	2.08
K _m app (1)	59.15	71.60	64.43	78.65	35.80	44.20	48.77	75.97	55.29	58.25	63.31	66.86
K _i (1)		15	70.76	38.3		12.26	15.88	10.26		33871	24968	34609
Vmax (2)	1.91	1.82	1.69	1.57	1.99	1.93	1.80	1.62	2.14	2.13	2.11	2.05
K _m app (2)	56.97	65.35	61.85	76.41	32.18	42.40	47.22	76.62	54.33	56.90	54.94	62.93
K _i (2)		21.4	73.7	37.03		9.06	12.32	8.33		38260	(321762)	45717
Vmax (3)	1.92	1.84	1.71	1.58	2.03	1.94	1.80	1.61	2.15	2.14	2.15	2.07
K _m app (3)	58.56	68.13	63.72	78.09	35.05	43.79	47.82	75.17	54.95	57.68	59.92	65.58
K _i (3)		19.3	71.6	8		11.53	15.79	10.05		36402	40002	37436
Vmax (4)	1.92	1.83	1.70	1.58	2.02	1.94	1.80	1.61	2.14	2.13	2.14	2.06
K _m app (4)	58.12	66.67	63.05	77.42	34.46	43.42	47.46	75.56	54.72	57.39	58.61	64.87
K _i (4)		21.4	74.5	38.06		11.06	15.26	9.65		37148	44258	36716
Mittelwerte	K _i (1): 41 K _i (2): 44 K _i (3): 43 K _i (4): 45		K _i (1): 13 K _i (2): 10 K _i (3): 12 K _i (4): 12		K _i (1): 31'149 K _i (2): 41'988 K _i (3): 37'946 K _i (4): 39'374							
Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min				Vorinkubation: 40 min Inkubation: 14 min				Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min				
Anzahl Tests: 3				Anzahl Tests: 3				Anzahl Tests: 4				

ALA [μM]	4-Oxopent-2-ensäure (43) [μM]		4-Oxopent-2-ensäuremethylester (44)		2-Hydroxylevulinensäure (45) [μM]							
	0	1273	2547	3821	0	3845	7691	11536	0	187	311	436
	(0.270)	(0.268)	(0.213)	(0.270)	(0.280)	0.277	0.226	0	(0.226)	(0.248)	(0.231)	(0.235)
39.7	(0.266)	(0.264)	(0.261)	(0.269)	(0.279)	0.277	0.203	0	(0.272)	(0.246)	(0.217)	(0.231)
	(0.433)	(0.437)	(0.416)	(0.413)	(0.415)	0.411	0.321	0.004	(0.441)	(0.376)	(0.356)	(0.342)
79.4	(0.435)	(0.435)	(0.395)	(0.423)	(0.417)	0.411	0.323	0	(0.428)	(0.367)	(0.354)	(0.341)
	0.519	0.528	0.524	0.504	0.498	0.488	0.380	0.0032	0.494	0.441	0.415	0.415
119.2	0.512	0.510	0.500	0.507	0.493	0.500	0.376	0.0020	0.499	0.436	0.425	0.406
	0.570	0.575	0.572	0.554	0.532	0.544	0.384	0.005	0.543	0.478	0.461	0.446
158.9	0.578	0.561	0.577	0.538	0.536	0.544	0.389	0.005	0.535	0.478	0.456	0.431
	0.605	(0.028)	0.596	0.573	0.569	0.573	0.409	0.003	0.586	0.498	0.483	0.458
198.6	0.603	0.600	0.592	0.578	0.571	0.576	0.395	0.003	0.572	0.483	0.483	0.460
	0.671	0.680	0.668	0.647	0.659	0.653	0.418	0	0.646	0.565	0.539	0.520
397.3	0.671	0.677	0.661	0.652	0.636	0.655	0.376	0.007	0.653	0.560	0.536	0.513
Vmax (1)	2.16	2.17	2.13	2.05	2.07				2.09	1.76	1.70	1.60
Kmapp (1)	58.99	60.19	57.11	55.05	60.55				61.41	53.09	54.20	49.16
Ki (1)									1191	2342	1749	
Vmax (2)	2.12	2.17	2.10	2.06	2.08				2.08	1.78	1.69	1.62
Kmapp (2)	54.70	55.40	53.55	56.67	62.25				60.36	56.38	52.72	51.92
Ki (2)										2646	2148	2681
Vmax (3)	2.15	2.17	2.11	2.05	2.07				2.09	1.76	1.70	1.60
Kmapp (3)	57.465	60.081	55.494	55.443	61.01				61.15	53.53	53.78	49.74
Ki (3)										1311	2272	1899
Vmax (4)	2.14	2.17	2.11	2.05	2.074				2.08	1.77	1.70	1.61
Kmapp (4)	56.62	59.99	54.96	55.87	61.58				60.99	54.47	53.45	50.45
Ki (4)										1559	2205	2085
Mittelwerte	Kj (1); - Kj (2); - Kj (3); - Kj (4); -		Kj (1); - Kj (2); - Kj (3); - Kj (4); -		Kj (1); - Kj (2); - Kj (3); - Kj (4); -		Kj (1); - Kj (2); - Kj (3); - Kj (4); -		Kj (1); - Kj (2); - Kj (3); - Kj (4); -		Kj (1); - Kj (2); - Kj (3); - Kj (4); -	
	Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min											
	Vorinkubation: 40 min Inkubation: 14 min											
	Vorinkubation: 45 min Inkubation: 20 min											
	Anzahl Tests: 4											
	Anzahl Tests: 3											
	Anzahl Tests: 4											

ALA [µM]	Acetylglucin (46) [µM]		3-Ethoxycarbonyllevalinsäure (47) [µM]		3-Azidovalinsäure (48) [µM]							
	0	17752	29856	41421	0	6441	10734	15028	0	1348	2695	5391
	(0.217)	(0.164)	(0.116)	(0.072)	(0.185)	(0.190)	(0.176)	(0.136)	(0.213)	(0.187)	(0.197)	(0.182)
39.7	(0.235)	(0.167)	(0.119)	(0.074)	(0.226)	(0.191)	(0.160)	(0.133)	(0.219)	(0.186)	(0.196)	(0.183)
	0.331	0.264	0.185	0.132	0.337	0.302	0.260	0.231	0.317	0.327	0.300	0.280
79.4	0.341	0.259	0.197	0.134	0.343	0.288	0.265	0.235	0.327	0.319	0.296	0.281
	0.389	0.330	0.262	0.197	0.389	0.361	0.331	0.290	0.388	0.379	0.362	0.335
119.2	0.393	0.331	0.260	0.181	0.396	0.363	0.331	0.290	0.377	0.373	0.356	0.331
	0.413	0.368	0.310	0.221	0.427	0.381	0.367	0.328	0.425	0.412	0.390	0.360
158.9	0.415	0.362	0.300	0.220	0.422	0.394	0.368	0.335	0.421	0.410	0.388	0.371
	0.432	0.388	0.331	0.242	0.442	0.427	0.381	0.354	0.447	0.426	0.420	0.392
198.6	0.434	0.387	0.317	0.242	0.438	0.424	0.393	0.353	0.449	0.431	0.409	0.396
	0.463	0.442	0.407	0.315	0.508	0.476	0.440	0.407	0.483	0.487	0.478	0.441
397.3	0.467	0.453	0.397	0.307	0.496	0.468	0.446	0.410	0.489	0.433	0.521	0.447
V _{max} (1)	2.08	2.13	2.35	2.01	2.23	2.25	2.20	2.07	2.26	2.21	2.23	2.09
K _{mapp} (1)	43.10	87.69	161.32	215.29	52.24	71.38	85.35	96.80	57.87	57.28	69.86	69.13
K _i (1)	17160	10786	10368		17572	16934	17616		?	?	13000	27697
V _{max} (2)	2.03	2.12	2.14	1.79	2.26	2.19	2.09	1.98	2.18	2.21	2.23	2.06
K _{mapp} (2)	38.06	77.06	132.39	173.88	54.85	64.54	73.41	85.13	50.19	57.74	69.42	66.34
K _i (2)	17320	11935	11605		36463	31716	27220			8959	7033	16750
V _{max} (3)	2.06	2.17	1.82	1.82	2.24	2.23	2.14	2.03	2.24	2.21	2.23	2.08
K _{mapp} (3)	41.70	82.30	139.8	180.57	52.63	68.72	79.47	91.68	55.86	57.25	69.31	68.40
K _i (3)	18234	12577	12439		21064	21048	20249			(53964)	11189	24000
V _{max} (4)	2.05	2.14	2.15	1.78	2.25	2.21	2.12	2.00	2.22	2.21	2.22	2.07
K _{mapp} (4)	40.73	79.35	132.46	170.90	53.24	67.10	76.28	87.980	54.17	57.33	69.16	67.65
K _i (4)	18725	13138	12962		24756	24814	23022			23124	9740	21667
Mittelwerte	K _i (1): 12711 K _i (2): 13620 K _i (3): 14416 K _i (4): 14941	K _i (1): 17374 K _i (2): 31799 K _i (3): 20787 K _i (4): 24197										K _i (1): 20348 K _i (2): 10914 K _i (3): 17596 K _i (4): 17691
	Vorinkubation: 40 min Inkubation: 14 min		Vorinkubation: 32 min Inkubation: 14 min		Vorinkubation: 45 min Inkubation: 14 min							
	Anzahl Tests: 3		Anzahl Tests: 4		Anzahl Tests: 2							

ALA [μM]	5-Aminovaleriansäure (49) [μM]			Nitrobutan (50) [μM]			Levulinensäure (8) [μM]				
	0	3179	7418	0	5518	9196	12875	0	1223	2446	1891
39.7	(0.261)	(0.261)	(0.250)	(0.246)	(0.178)	(0.180)	(0.161)	(0.267)	(0.217)	(0.181)	0.129
	(0.266)	(0.267)	(0.248)	(0.247)	(0.184)	(0.176)	(0.166)	(0.275)	(0.223)	(0.184)	0.128
79.4	(0.416)	(0.396)	(0.423)	(0.407)	0.288	0.282	0.253	(0.414)	0.353	0.328	0.242
	(0.432)	(0.426)	(0.420)	(0.386)	0.277	0.275	0.259	(0.415)	0.343	0.294	0.231
119.2	0.514	0.516	0.508	0.489	0.375	0.338	0.301	0.484	0.438	0.376	0.299
	0.504	0.507	0.495	0.480	0.368	0.336	0.307	0.485	0.404	0.383	0.288
158.9	(0.527)	0.548	0.556	0.534	0.410	0.362	0.317	0.523	(0.495)	0.433	0.333
	0.562	0.545	0.553	0.528	0.421	0.369	0.319	0.515	0.470	0.423	0.334
198.6	0.592	0.591	0.588	0.572	0.453	0.396	0.342	0.547	0.496	0.488	0.376
	0.600	0.598	0.588	0.567	0.448	0.407	0.352	0.546	0.501	0.475	0.378
397.3	0.657	0.662	0.649	0.642	0.517	0.441	0.380	0.605	0.571	0.546	0.469
	0.663	0.658	0.654	0.638	0.515	0.456	0.392	0.600	0.582	(0.600)	0.472
Vmax (1)	2.12	2.11	2.12	2.07	1.92	1.50	1.23	1.87	1.89	1.87	2.04
K _{mapp} (1)	58.35	58.27	56.84	64.21	110.91	73.69	57.30	46.60	71.62	88.05	181.28
K _i (1)			128208		7585	62250	?		2277	2749	1692
Vmax (2)	2.09	2.10	2.07	2.06	1.77	1.47	1.23	1.87	1.91	1.87	1.81
K _{mapp} (2)	54.42	57.59	55.87	62.07	88.90	68.27	56.85	46.61	75.47	89.66	148.84
K _i (2)		54557	65312	(279492)		12722	92057	?		1974	2230
Vmax (3)	2.11	2.10	2.12	2.07	2.0697	1.8342	1.2256	1.87	1.93	1.91	1.84
K _{mapp} (3)	57.10	57.98	60.14	56.60	63.59	71.86	56.74	46.62	77.68	95.15	154.26
K _i (3)			98354		10025	70722			1836	2349	2118
Vmax (4)	2.10	2.11	2.07	2.07	1.80	1.48	1.23	1.87	1.92	1.89	1.79
K _{mapp} (4)	56.30	58.22	59.68	63.12	92.81	70.48	56.89	46.65	76.48	92.79	144.21
K _i (4)		93688	87149	?	11730	78879	?		1912	2473	2339
Mittelwerte		K _i (1): 128208 K _i (2): 59934 K _i (3): 98354 K _i (4): 90418			K _i (1): 34917 K _i (2): 52389 K _i (3): 40373 K _i (4): 45304					K _i (1): 2239 K _i (2): 2283 K _i (3): 2101 K _i (4): 2241	
Vorinkubation: 35 min Inkubation: 20 min			Vorinkubation: 46 min Inkubation: 20 min			Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min			Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min		
Anzahl Tests: 1			Anzahl Tests: 3			Anzahl Tests: 6			Anzahl Tests: 6		

ALA [μM]	Levulin säuremethylester (51) [μM]			Levulin säureethyl ester (9) [μM]			Levulin säurebenzylester (52) [μM]		
	0	8676	17352	0	9891	16485	0	624	1248
	(0.221)	0.197	0.210	(0.230)	0.239	0.238	(0.196)	(0.200)	(0.202)
39.7	(0.200)	0.216	0.213	(0.234)	0.235	0.236	(0.194)	(0.203)	(0.213)
	(0.378)	0.366	0.360	0.346	0.350	0.349	0.315	0.322	0.323
79.4	(0.373)	0.348	0.365	0.346	0.346	0.349	0.318	0.341	0.319
	0.442	0.436	0.450	0.398	0.408	0.409	0.364	0.389	0.408
119.2	0.447	0.450	0.458	0.403	0.406	0.413	0.364	0.408	0.388
	0.498	0.503	0.494	0.413	0.435	0.436	0.399	0.416	0.429
158.9	0.494	0.498	0.495	0.423	0.429	0.427	0.387	0.415	0.432
	0.537	0.538	0.548	0.447	0.448	0.454	0.439	0.441	0.455
198.6	0.538	0.534	0.532	0.444	0.457	0.453	0.432	0.441	0.456
	0.592	0.614	0.621	0.503	0.502	0.511	0.491	0.496	0.510
397.3	0.609	0.603	0.624	0.496	0.509	0.508	0.492	0.496	0.510
Vmax (1)	1.99			2.20			2.24		
K _m app (1)	71.9			47.8			63.67		
K _i (1)									
Vmax (2)	1.95			2.23			2.28		
K _m app (2)	65.7			50.87			67.96		
K _i (2)									
Vmax (3)	1.98			2.20			2.25		
K _m app (3)	69.66			48.16			64.97		
K _i (3)									
Vmax (4)	1.97			2.21			2.27		
K _m app (4)	68.36			48.98			66.99		
K _i (4)									
Mittelwerte	K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -	K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -	K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -	K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -	K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -	K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -	K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -	K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -	K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -
	Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min			Vorinkubation: 32 min Inkubation: 14 min			Vorinkubation: 37 min Inkubation: 14 min		
	Anzahl Tests: 2			Anzahl Tests: 2			Anzahl Tests: 2		

ALA [μM]	N-(2-Carboxbenzoyl)-5-Aminolevulin säure (53) [μM]				5-Azidolevulin säuremethylester (54) [μM]				5-Hydroxylevulin säure (55) [μM]				
	0	470	941	1410	0	1202	2403	4807	0	117	233	467	
39.7	(0.278) (0.267)	0.387 0.357	0.440 0.435	0.530 0.517	(0.221) (0.227)	0.272 0.281	0.339 0.336	0.442 0.437	(0.284) (0.288)	(0.222) (0.224)	(0.195) (0.198)	(0.136) (0.140)	
79.4	(0.413) (0.406)	0.496 0.472	0.580 0.566	0.644 0.686	0.328 0.334	0.347 0.367	0.420 0.420	0.484 0.495	(0.442) (0.448)	(0.364) (0.360)	0.302 0.295	0.240 0.232	
119.2	0.471 0.483	0.551 0.553	0.627 0.634	0.737 0.712	0.404 0.401	0.442 0.431	0.478 0.468	0.537 0.526	0.526 0.517	0.443 (0.327)	0.386 (0.556)	0.313 0.310	
158.9	0.511 0.517	0.592 0.592	0.683 0.685	0.781 0.754	0.436 0.438	0.485 0.483	0.525 0.517	0.598 0.589	0.568 0.564	0.486 0.482	0.425 0.432	0.345 0.344	
198.6	0.530 0.536	0.620 0.600	0.719 0.697	0.769 0.775	0.464 0.464	0.486 0.491	0.522 0.549	0.601 0.598	0.577 0.584	0.515 0.511	0.457 0.452	0.369 0.370	
397.3	0.589 0.583	0.678 0.692	0.749 0.777	0.866 0.848	0.531 0.517	0.545 0.551	0.582 0.571	0.630 0.641	0.665 0.655	0.602 0.575	0.520 0.534	0.453 0.445	
Vmax (1)	1.80				2.47				2.05	1.90	1.89	1.65	
K _m app (1)	42.54				68.6				49.54	64.89	97.57	116.56	
K _i (1)									376	240	344		
Vmax (2)	1.80				2.42				2.07	1.91	1.78	1.58	
K _m app (2)	42.76				63.301				52.44	66.19	82.69	105.64	
K _i (2)									444	404	459		
Vmax (3)	1.81				2.45				2.05	1.90	1.82	1.60	
K _m app (3)	42.65				66.47				49.91	65.26	89.18	108.43	
K _i (3)									379	296	397		
Vmax (4)	1.80				2.43				2.06	1.90	1.80	1.58	
K _m app (4)	42.60				64.97				50.69	65.63	85.32	105.81	
K _i (4)									395	341	429		
Mittelwerte		K _i (1); - K _i (2); - K _i (3); - K _i (4); -				K _i (1); - K _i (2); - K _i (3); - K _i (4); -				K _i (1); 320 K _i (2); 435 K _i (3); 357 K _i (4); 388			
		Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min				Vorinkubation: 30 min Inkubation: 14 min				Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min			
		Anzahl Tests: 1				Anzahl Tests: 1				Anzahl Tests: 3			

ALA [μM]	5-Hydroxylevulin säuremethyl ester (S6)			5-Oximolevulin säure (S7) [μM]			5-Nitrolevulin säure (S8) [μM]					
	0	541	1081	2162	0	624	1249	1874	0	71	143	286
39.7	(0.233)	(0.195)	(0.199)	(0.177)	(0.259)	(0.185)	(0.147)	(0.112)	(0.234)	(0.256)	(0.203)	(0.173)
	(0.230)	(0.208)	(0.101)	(0.177)	(0.270)	(0.188)	(0.133)	(0.114)	(0.225)	(0.225)	(0.210)	(0.178)
79.4	0.324	0.309	0.294	0.272	(0.410)	0.310	0.241	0.198	(0.424)	(0.375)	0.357	0.273
	0.327	0.310	0.299	0.269	(0.400)	0.309	0.251	0.203	(0.414)	(0.384)	0.326	0.233
119.2	0.371	0.365	0.346	0.321	0.469	0.359	0.317	0.265	0.493	0.418	0.403	0.348
	0.375	0.352	0.341	0.318	0.459	0.382	0.306	0.262	0.499	0.470	0.392	0.338
158.9	(0.401)	0.397	0.384	0.361	0.498	0.415	0.330	0.298	0.542	0.491	0.446	0.364
	(0.420)	(0.406)	0.384	0.350	0.508	0.419	0.353	0.310	0.552	0.496	0.445	0.367
198.6	0.414	0.409	0.399	0.373	0.530	0.447	0.385	0.332	0.566	0.503	0.466	0.378
	0.419	0.408	0.405	0.374	0.534	0.446	0.405	0.331	(0.542)	(0.481)	0.471	(0.349)
397.3	0.470	0.451	0.443	0.425	0.604	0.533	0.500	0.425	0.650	(0.473)	0.489	0.391
	0.462	(0.442)	0.438	0.424	0.598	0.528	0.481	0.441	0.616	0.551	0.482	0.414
Vmax (1)	2.04	2.05	2.04	1.98	1.91	1.78	1.78	1.6929	1.99	1.71	1.53	1.21
K _m app (1)	46.51	52.75	57.75	66.96	57.59	85.75	127.99	160.71	52.44	44.49	42.36	31.903
K _i (1)		4024	4471	4916		1276	1021	1046		399	599	443.485
Vmax (2)	2.06	2.01	1.98	1.96	1.92	1.79	1.82	1.68	1.98	1.69	1.46	1.20
K _m app (2)	47.17	48.26	51.93	64.28	60.13	88.19	135.60	158.35	51.15	41.13	31.73	30.17
K _i (2)		23425	10728	5963		1337	995	1147		293	233	410
Vmax (3)	2.05	2.04	2.02	1.97	1.91	1.79	1.79	1.68	1.99	1.70	1.50	1.21
K _m app (3)	46.75	51.45	56.27	66.11	58.05	86.65	130.34	157.91	51.82	43.02	38.56	31.56
K _i (3)		5369	5308	5220		1266	1003	1089		348	415	444
Vmax (4)	2.05	2.03	2.01	1.97	1.91	1.79	1.82	1.68	1.99	1.70	1.50	1.21
K _m app (4)	46.78	50.46	55.03	65.33	58.03	87.60	135.16	157.67	51.59	42.72	38.02	31.31
K _i (4)		6877	6132	5451		1224	934	1091		343	399	440
Mittelwerte		K _i (1): 4470	K _i (2): 13372			K _i (1): 1114	K _i (2): 1037			K _i (1): 480	K _i (2): 312	
		K _i (3): 5299	K _i (4): 6153			K _i (3): 1119	K _i (4): 1083			K _i (3): 402	K _i (4): 440	
		Vorinkubation: 29 min Inkubation: 14 min				Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min				Vorinkubation: 36 min Inkubation: 20 min		
		Anzahl Tests: 3				Anzahl Tests: 3				Anzahl Tests: 4		

ALA [μM]	3-Oxo-5-Enaminohexansäuremethyl ester (63)			Acetylaceton (64) [μM]			2-Acetylcyclohexanon (65) [μM]					
	0	611	1223	1834	0	390	779	1558	0	383	766	1531
39.7	(0.264) (0.273)	(0.271) (0.280)	(0.265) (0.269)	(0.250) (0.254)	(0.228) (0.224)	(0.220) (0.227)	(0.212) (0.216)	(0.191) (0.179)	(0.219) (0.223)	(0.195) (0.223)	(0.188) (0.216)	(0.213) (0.213)
79.4	(0.415) (0.428)	(0.441) (0.421)	(0.426) (0.420)	(0.380) (0.420)	(0.332) (0.367)	0.338 0.334	0.349 0.320	0.290 0.292	0.330 0.332	0.326 0.328	0.321 0.322	0.311 0.323
119.2	(0.559) (0.536)	0.524 0.524	0.522 0.513	0.518 0.514	0.418 0.428	0.415 0.410	0.388 0.367	0.329 0.330	(0.376) 0.390	0.381 0.384	0.379 0.376	0.358 0.361
158.9	0.599 0.589	0.569 0.578	0.549 0.560	0.536 0.529	(0.503) 0.463	0.445 0.448	0.436 0.438	0.368 0.357	0.412 0.419	(0.398) 0.410	0.401 0.402	0.380 0.387
198.6	0.624 0.628	0.609 0.606	0.592 0.593	0.579 0.571	0.491 0.485	0.460 0.461	0.448 0.456	0.382 (0.363)	0.428 0.435	0.428 0.428	0.413 0.415	0.398 0.397
397.3	0.706 0.701	0.710 0.702	0.705 0.709	(0.738) 0.722	0.560 0.582	0.546 0.520	0.482 (0.523)	0.431 0.441	0.481 (0.460)	0.454 0.463	0.446 0.449	0.440 0.433
Vmax (1)	2.23	2.29	2.29	2.32	1.85	1.74	1.61	1.36	2.16	2.07	2.01	1.91
Kmapp (1)	55.72	68.95	73.45	80.20	69.11	67.03	62.97	55.79	50.21	45.64	43.88	41.06
Ki (1)		2576	3843	4175		12545	7980	6526.9		3824	5308	6869
Vmax (2)	2.23	2.31	2.36	2.50	1.87	1.72	1.52	1.39	2.14	2.01	1.95	1.91
Kmapp (2)	55.85	71.56	82.32	102.28	72.84	63.59	51.44	60.3	48.10	39.53	38.03	40.95
Ki (2)		2172	2579	2206		2676	1873	7492		1764	2890	8768.77
Vmax (3)	2.23	2.30	2.31	2.35	1.85	1.72	1.58	1.37	2.15	2.05	1.99	1.91
Kmapp (3)	55.75	69.67	75.55	83.24	70.07	64.54	59.68	56.98	49.17	46.87	42.01	40.94
Ki (3)		2450	3443	3720		4551	4479	6785		7801	4493.16	7618
Vmax (4)	2.23	2.30	2.34	2.45	1.86	1.72	1.57	1.38	2.14	2.04	1.98	1.91
Kmapp (4)	55.78	70.47	79.08	95.29	71.25	63.73	57.32	58.52	48.62	42.66	40.91	40.87
Ki (4)		2322	2927	2589		3303	3205	7161		2378	4059	8072
Mittelwerte		Ki (1): 3531 Ki (3): 3204	Ki (2): 2319 Ki (4): 2612		Ki (1): 6841 Ki (3): 5271	Ki (2): 4013 Ki (4): 4556			Ki (1): 5333 Ki (3): 6637	Ki (2): 4474 Ki (4): 4836		
		Vorinkubation: 36 min Inkubation: 20 min			Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min				Vorinkubation: 43 min Inkubation: 14 min			
		Anzahl Tests: 1			Anzahl Tests: 4				Anzahl Tests: 3			

ALA [μM]	Acetylaceton (66) [μM]		Mesityloxid (67) [μM]		2,4-Pentadiol (68) [μM]	
	0	6860	0	5264	0	1189
	(0.202)	(0.212)	(0.242)	0.267	(0.250)	(0.252)
	(0.212)	(0.210)	(0.240)	0.263	(0.246)	(0.253)
39.7	0.309	0.291	0.400	0.433	0.407	0.369
	0.314	0.283	(0.393)	0.419	(0.341)	(0.398)
79.4	0.360	0.339	0.462	0.507	0.488	0.484
	0.386	0.329	0.468	0.499	0.474	0.458
119.2	0.410	0.353	0.502	0.549	0.518	0.447
	0.420	0.348	0.501	0.556	0.527	0.518
158.9	0.435	0.361	0.552	0.591	0.527	0.535
	0.439	0.364	0.553	0.590	0.539	0.556
198.6	0.477	0.395	0.601	0.659	0.543	0.550
	0.478	0.393	0.607	0.666	0.594	0.608
397.3	0.478	0.393	0.607	0.666	0.601	0.614
Vmax (1)	2.14	1.74	1.96		1.85	
Kmapp (1)	55.35	40.61	61.11		45.44	
Kj (1)	18894	12919	13529			
Vmax (2)	1.97	1.71	1.92		1.85	
Kmapp (2)	37.17	37.41	56.80		44.79	
Kj (2)		?				
Vmax (3)	2.09	1.73	1.94		1.85	
Kmapp (3)	49.56	39.43	59.57		45.17	
Kj (3)		26724				
Vmax (4)	2.06	1.72	1.94		1.85	
Kmapp (4)	46.86	38.81	59.20		45.04	
Kj (4)		33039				
Mittelwerte	Kj (1): 15114 Kj (2): 29253 Kj (3): 19692 Kj (4): 23079		Kj (1): - Kj (2): - Kj (3): - Kj (4): -		Kj (1): - Kj (2): - Kj (3): - Kj (4): -	
	Vorinkubation: 43 min Inkubation: 14 min		Vorinkubation: 48 min Inkubation: 20 min		Vorinkubation: 34 min Inkubation: 20 min	
	Anzahl Testis: 3		Anzahl Testis: 2		Anzahl Testis: 1	

ALA [μM]	Lithiumsalz der Acetylessigsäure (6 β)			rac-Heptandisäure 12 [μM]			rac-Heptandisäure 13 [μM]					
	0	5607	9345	13082	0	3244	5407	7570	0	991	1651	2312
39.7	(0.259) (0.256)	(0.233) (0.246)	(0.239) (0.238)	(0.225) (0.226)	(0.263) (0.259)	(0.247) (0.247)	(0.220) (0.230)	(0.175) (0.201)	(0.259) (0.257)	(0.252) (0.251)	(0.250) (0.245)	(0.238) (0.236)
79.4	(0.427) (0.423)	(0.403) (0.117)	(0.400) (0.403)	(0.386) (0.390)	(0.413) (0.409)	(0.400) (0.390)	(0.374) (0.375)	0.339 0.348	(0.427) (0.417)	(0.417) (0.417)	(0.412) (0.412)	(0.409) (0.394)
119.2	0.521 0.529	0.498 0.504	0.494 (0.473)	0.483 0.474	0.484 0.489	0.495 0.485	0.476 0.458	0.446 0.440	0.503 0.489	0.493 0.503	0.494 0.492	0.492 0.488
158.9	0.568 0.569	0.551 0.556	0.541 0.539	0.528 0.537	0.546 0.543	0.548 0.553	0.534 0.523	0.510 0.490	0.535 0.521	0.545 0.538	0.542 0.538	0.526 0.504
198.6	0.585 0.595	0.571 0.570	0.561 0.564	0.545 0.549	0.577 0.576	0.593 0.589	0.570 0.573	0.543 0.542	0.573 0.554	0.576 0.571	0.577 0.561	0.549 0.553
397.3	(0.614) 0.651	0.644 0.641	0.637 0.634	0.629 0.623	0.637 0.638	0.678 0.673	0.668 0.678	0.643 0.655	0.623 0.628	0.647 0.645	0.646 0.640	0.639 0.642
V_{max} (1)	2.02	2.03	2.01	1.99	2.07	2.23	2.32	2.39	1.96	2.06	2.06	2.02
K_{mapp} (1)	45.12	53.49	54.86	58.71	61.37	83.30	93.10	116.97	50.9	58.09	58.09	60.41
K_i (1)		30235	43281	432449		9078	10458	8355		7015	11693	12377
V_{max} (2)	2.01	2.02	2.01	1.99	2.02	2.29	2.29	2.29	1.96	2.06	2.05	2.08
K_{mapp} (2)	44.63	52.88	55.39	58.99	55.47	88.29	90.25	105.46	51.72	58.00	59.01	68.14
K_i (2)		30346	38787	40654		5482	8622	8390		8152	11716	7279
V_{max} (3)	2.01	2.02	2.01	1.99	2.05	2.23	2.31	2.33	1.96	2.06	2.05	2.03
K_{mapp} (3)	44.93	52.96	54.87	58.23	59.21	80.56	91.93	110.59	51.10	58.08	59.24	61.85
K_i (3)		31336	42230	44167		9000	9786	8725		7258	10370	10990
V_{max} (4)	2.01	2.02	2.01	1.99	2.04	2.29	2.30	2.30	1.96	2.06	2.05	2.05
K_{mapp} (4)	44.82	52.93	54.99	58.50	58.12	87.34	91.07	106.76	51.45	58.06	59.14	64.81
K_i (4)		31015	41166	42871		6543	9535	9045		7715	11060	8908
Mittelwerte		K_i (1): 38988 K_i (3): 39244	K_i (2): 36595 K_i (4): 38350	K_i (1): 9297 K_i (3): 9170	K_i (2): 7500 K_i (4): 8374	K_i (1): 10631 K_i (3): 9539	K_i (2): 9049 K_i (4): 9227					
Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min				Vorinkubation: 42 min Inkubation: 20 min				Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min				
Anzahl Tests: 2				Anzahl Tests: 3				Anzahl Tests: 2				

ALA [μM]	6-Oxoheptansäure (20) [μM]			5-Oxonitrohexan (21) [μM]			Epoxid 22 [μM]					
	0	1561	2601	3642	0	2515	4191	5867	0	539	1078	2155
39.7	(0.265) (0.273)	(0.229) (0.259)	(0.238) (0.243)	(0.220) (0.224)	(0.173) (0.202)	(0.147) (0.173)	(0.169) (0.145)	(0.158) (0.144)	(0.244) (0.263)	(0.262) (0.261)	(0.257) (0.261)	(0.257) (0.252)
79.4	(0.450) (0.434)	(0.283) (0.397)	(0.393) (0.350)	(0.349) (0.350)	0.303	0.273	0.235	0.242	(0.422) (0.413)	(0.417) (0.417)	(0.409) (0.401)	(0.396) (0.391)
119.2	0.514	0.477	0.476	0.462	0.337	0.311	0.274	0.261	0.497	0.501	0.488	0.477
	0.490	0.497	0.467	0.461	0.350	0.317	0.254	0.247	0.512	0.502	0.492	0.484
158.9	0.555	0.540	0.521	0.511	0.370	0.327	0.295	(0.315)	0.549	0.540	0.533	0.522
	0.547	0.541	0.529	0.502	0.372	0.327	0.312	(0.313)	0.547	0.545	0.534	0.510
198.6	0.593	0.581	0.562	0.556	0.389	0.361	0.334	0.321	(0.612)	0.573	0.574	0.538
	0.599	0.572	0.563	0.547	0.387	0.367	0.338	0.316	0.583	0.575	0.561	0.537
397.3	0.658	0.660	0.653	0.638	0.429	0.399	0.388	0.372	0.638	0.660	0.632	0.603
	0.661	0.655	0.660	0.642	0.425	0.402	0.384	0.357	0.651	0.653	0.627	0.599
Vmax (1)	2.15	2.16	2.19	2.14	1.88	1.81	1.79	1.94	2.05	2.09	2.00	1.86
K _{mapp} (1)	63.29	70.40	80.31	80.04	44.35	56.47	75.38	116.47	54.31	60.48	54.27	47.42
K _i (1)		13885	9667	13759		9195	5988	3607				
Vmax (2)	2.11	2.14	2.19	2.14	1.89	1.82	1.85	1.82	2.03	2.10	1.99	1.87
K _{mapp} (2)	58.8	68.30	80.01	80.29	44.83	56.80	82.88	97.82	52.27	62.92	53.81	49.09
K _i (2)		9657	7211	9964		9422	4938	4963				
Vmax (3)	2.13	2.15	2.19	2.14	1.88	1.81	1.81	1.88	2.04	2.09	1.99	1.86
K _{mapp} (3)	61.86	69.69	80.20	80.16	44.52	56.19	77.33	106.94	53.79	61.11	55.3	47.75
K _i (3)		12331	8771	12312		9595	5686	4185				
Vmax (4)	2.13	2.15	2.19	2.14	1.88	1.82	1.85	1.85	2.03	2.10	1.99	1.86
K _{mapp} (4)	61.01	69.14	80.11	80.40	44.71	56.89	82.23	101.34	53.38	61.82	54.88	48.13
K _i (4)		11722	8314	11463		9218	4992	4630				
Mittelwerte		K _i (1): 12437 K _i (3): 11138 K _i (4): 10499	K _i (2): 8944 K _i (4): 6280		K _i (1): 6263 K _i (3): 6488 K _i (4): 6280						K _i (1): - K _i (3): - K _i (4): -	
		Vorinkubation: 31 min Inkubation: 20 min			Vorinkubation: 35 min Inkubation: 14 min			Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min				
		Anzahl Testis: 4			Anzahl Testis: 6			Anzahl Testis: 4				

ALA [μM]	Epoxid 23 [μM]			Epoxid 70 [μM]			Epoxid 71 [μM]					
	0	522	869	1217	0	572	1146	2291	0	186	373	746
39.7	(0.271) (0.258)	(0.217) (0.216)	(0.207) (0.210)	(0.205) (0.204)	(0.184) (0.185)	(0.193) (0.193)	(0.191) (0.184)	(0.173) (0.176)	(0.275) (0.279)	(0.268) (0.270)	(0.266) (0.274)	(0.262) (0.264)
79.4	(0.401) (0.430)	0.358 0.355	0.327 0.333	0.320 0.321	0.279 0.294	0.288 0.284	0.269 0.269	0.251 0.231	(0.431) (0.427)	(0.427) (0.421)	(0.359) (0.407)	(0.407) (0.403)
119.2	0.502 0.503	0.416 0.410	0.388 0.396	0.383 0.389	(0.217) 0.319	0.335 0.329	0.318 0.327	0.303 0.296	0.514 0.512	0.513 0.511	0.503 0.502	0.474 0.478
158.9	0.537 0.554	0.450 0.447	0.427 0.437	0.427 0.429	(0.344) 0.360	0.380 0.369	0.357 0.355	0.310 0.319	0.553 0.554	0.547 0.550	0.540 0.524	0.515 0.510
198.6	0.595 0.581	0.481 0.484	(0.583) 0.463	0.460 0.459	(0.364) 0.384	0.387 0.380	0.391 0.384	0.347 0.346	0.581 0.577	0.578 0.572	0.563 0.559	0.550 0.551
397.3	0.638 0.621	0.534 0.517	0.513 0.510	0.514 0.520	0.455 0.452	0.460 0.458	0.456 0.450	0.399 0.409	0.656 0.674	0.649 0.643	0.629 0.622	0.608 0.606
V _{max} (1)	1.99	1.68	1.69	1.73	2.12	2.14	2.15	1.90	2.03	2.01	1.93	2.04
K _{mapp} (1)	49.99	55.40	66.06	74.47	74.68	71.78	79.28	76.24	47.71	49.99	46.83	43.52
K _i (1)		4820	2704	2485								
V _{max} (2)	1.95	1.66	1.64	1.69	2.12	2.13	2.15	1.90	2.09	2.03	1.95	1.97
K _{mapp} (2)	44.31	51.68	59.64	68.15	74.68	71.78	79.28	76.24	55.74	52.15	49.34	35.89
K _i (2)		3135	2511	2260								
V _{max} (3)	1.98	1.68	1.67	1.72	2.01	2.07	2.11	1.87	2.04	2.01	1.93	2.02
K _{mapp} (3)	48.32	54.65	64.22	72.418	62.49	63.89	74.13	71.93	48.89	50.46	47.35	41.28
K _i (3)		3980	2641	2440								
V _{max} (4)	1.98	1.67	1.66	1.71	2.08	2.10	2.13	1.89	2.06	2.02	1.94	2.01
K _{mapp} (4)	47.58	53.91	62.57	70.59	69.47	67.69	77.33	74.05	51.48	51.01	48.04	40.52
K _i (4)		3920	2758	2516								
Mittelwerte		K _i (1): 3336 K _i (3): 3020	K _i (2): 2655 K _i (4): 3064			K _i (1): - K _i (3): -	K _i (2): - K _i (4): -			K _i (1): - K _i (3): -	K _i (2): - K _i (4): -	
Vorinkubation: 140 min Inkubation: 20 min										Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min		
Anzahl Tests: 3										Anzahl Tests: 3		

ALA [μM]	4-Oxopimelinsäure (72) [μM]		Pimelinsäure (73) [μM]		Bemsteinsäure (74) [μM]							
	0	2446	4892	7338	0	3765	5442	7619	0	5098	8496	11895
39.7	(0.243) (0.249)	(0.190) (0.208)	(0.134) (0.146)	(0.136) (0.140)	(0.259) (0.261)	(0.242) (0.230)	(0.210) (0.212)	(0.189) (0.188)	(0.234) (0.228)	(0.184) (0.190)	(0.134) (0.159)	(0.126) (0.127)
79.4	(0.408) (0.401)	(0.300) (0.344)	0.298 0.296	0.241 0.237	(0.404) (0.423)	(0.387) (0.391)	(0.370) (0.346)	(0.329) (0.321)	0.343 0.340	0.300 0.284	0.261 0.250	0.219 0.224
119.2	0.478	0.408	0.380	0.319	0.497	0.470	0.443	0.415	0.389	0.371	0.313	0.276
	0.480	0.433	0.378	0.314	0.491	0.463	0.447	0.402	0.405	0.348	0.317	0.281
158.9	0.510	0.464	0.413	0.359	0.531	0.515	0.479	0.461	(0.435)	0.383	0.351	0.295
	0.520	0.456	0.415	0.360	0.533	0.505	0.484	0.465	0.421	0.386	0.344	0.308
198.6	0.562	0.496	0.448	0.391	0.567	0.534	(0.540)	0.489	0.429	0.412	0.378	0.335
	0.554	0.499	0.449	0.404	0.551	0.537	0.517	0.494	0.429	0.403	0.384	0.340
397.3	0.628	0.579	0.555	0.508	0.638	0.623	0.607	0.599	0.489	0.471	0.437	0.400
	0.636	0.586	0.544	0.507	0.631	0.625	0.621	0.592	0.485	0.463	0.435	0.398
V_{max} (1)	2.03	1.96	1.92	1.98	1.99	2.01	2.01	2.04	2.14	2.19	2.15	1.99
K_{mapp} (1)	64.28	82.73	104.26	155.01	54.82	66.16	76.88	95.28	45.17	69.32	87.72	99.26
K_i (1)		8524	7866	5199		15784	13525	10322		9534	9019	9933
V_{max} (2)	2.04	1.95	1.92	1.94	2.01	2.03	2.06	2.06	2.15	2.16	2.09	1.97
K_{mapp} (2)	65.14	82.19	104.57	149.07	57.34	69.76	83.28	97.39	46.89	65.40	81.17	97.82
K_i (2)		9345	8083	5695		15070	12030	10906		12699	11615	10946
V_{max} (3)	2.04	1.95	1.91	1.94	1.99	2.01	2.02	2.05	2.13	2.17	2.12	1.97
K_{mapp} (3)	64.49	82.19	102.6	150.01	55.41	67.03	78.62	95.77	44.86	67.04	85.18	97.95
K_i (3)		8913	8278	5533		15563	12987	10457		10308	9451.5	10049
V_{max} (4)	2.04	1.95	1.92	1.94	2.00	2.02	2.04	2.05	2.14	2.16	2.11	1.98
K_{mapp} (4)	65.01	82.06	103.35	148.47	56.09	68.14	81.08	96.55	45.17	66.16	83.17	97.96
K_i (4)		9324	8293	5714		15194	12212	10560		10967	10098	10175
Mittelwerte		K_i (1): 7196 K_i (2): 7707 K_i (3): 7574 K_i (4): 7777			K_i (1): 13210 K_i (2): 12668 K_i (3): 13002 K_i (4): 12655					K_i (1): 9495 K_i (2): 11275 K_i (3): 9936 K_i (4): 10413		
		Vorinkubation: 49 min Inkubation: 20 min			Vorinkubation: 35 min Inkubation: 20 min				Vorinkubation: 33 min Inkubation: 14 min			
		Anzahl Tests: 4			Anzahl Tests: 3				Anzahl Tests: 3			

ALA [μM]	Fumarsäure (75) [μM]	Malensäure (76) [μM]	Phthalsäure (77) [μM]
0	4868	8113	11358
	0	0	0
	(0.242)	(0.218)	(0.186)
	(0.234)	(0.175)	(0.162)
	(0.228)	(0.178)	(0.162)
	(0.205)	(0.190)	(0.136)
39.7	(0.407)	0.334	0.297
	(0.342)	0.305	0.278
	(0.351)	0.330	0.243
	(0.453)	0.330	0.266
	(0.351)	0.330	0.244
79.4	(0.518)	0.397	0.362
	(0.476)	0.388	0.336
	(0.391)	0.400	0.304
	(0.489)	0.369	0.325
119.2	(0.572)	(0.434)	0.395
	(0.537)	0.424	0.373
	(0.499)	0.424	0.363
	(0.486)	0.442	0.338
158.9	(0.567)	0.442	0.395
	(0.541)	0.424	0.363
	(0.486)	0.424	0.338
	(0.486)	0.424	0.338
198.6	(0.598)	0.572	0.411
	(0.573)	0.544	0.398
	(0.540)	0.489	0.360
	(0.540)	0.427	0.364
	(0.614)	(0.392)	0.364
397.3	(0.665)	0.614	0.459
	(0.656)	0.460	(0.469)
	(0.670)	0.468	0.428
	(0.644)	0.460	0.438
Vmax (1)	2.10	2.56	2.41
	2.42	2.09	2.48
Kmapp (1)	53.50	123.30	138.32
	123.58	45.56	106.69
	138.32	65.48	135.85
Ki (1)	3731	6194	7165
	6194	9558	5190
Vmax (2)	2.10	2.25	2.03
	2.29	2.09	2.10
	2.26	2.15	2.15
Kmapp (2)	53.25	88.84	39.02
	109.23	56.46	76.62
	129.38	99.99	99.99
Ki (2)	7282	7716	7944
	7716	9353	7228
Vmax (3)	2.10	2.34	2.07
	2.35	2.29	2.14
	2.29	2.24	2.25
Kmapp (3)	53.36	98.95	43.59
	115.65	61.49	91.01
	133.37	112.01	112.01
Ki (3)	5697	6950	7575
	6950	10176	6403
Vmax (4)	2.10	2.303	2.27
	2.31	2.06	2.15
	2.27	2.15	2.15
Kmapp (4)	53.29	93.31	80.04
	110.91	59.41	99.10
	129.97	80.04	99.10
Ki (4)	6483	7504	7894
	7504	10436	7867
Mittelwerte	Ki (1): 5682 Ki (2): 7647 Ki (3): 6740 Ki (4): 7293	Ki (1): 6555 Ki (2): 7607 Ki (3): 7597 Ki (4): 8537	Ki (1): 8872 Ki (2): 13230 Ki (3): 9844 Ki (4): 11181
	Vorinkubation: 33 min Inkubation: 20 min	Vorinkubation: 37 min Inkubation: 14 min	Vorinkubation: 30 min Inkubation: 14 min
	Anzahl Tests: 3	Anzahl Tests: 3	Anzahl Tests: 3

ALA [μM]	2-Nitrobenzoesäure (78) [μM]			2-Nitrobenzaldehyd (39) [μM]			Dinitrobenzaldehyd (79) [μM]				
	0	3644	8502	0	22	45	89	0	14	29	58
39.7	(0.231) (0.229)	(0.215) (0.216)	(0.206) (0.199)	(0.210) (0.220)	(0.198) (0.206)	(0.190) (0.187)	0.169 0.167	(0.201) (0.205)	(0.156) (0.198)	(0.198) (0.197)	(0.165) (0.180)
79.4	0.335 (0.321)	0.320 0.322	0.309 0.316	0.309 0.308	0.291 0.293	0.273 0.271	0.241 0.238	0.299 (0.265)	0.308 0.283	0.280 0.286	0.269 0.258
119.2	0.396 0.394	0.375 0.374	0.363 0.353	0.356 0.359	0.349 0.340	0.308 0.315	0.278 0.271	0.350 0.357	0.352 0.347	0.334 0.315	0.308 0.318
158.9	0.414 0.411	0.404 0.404	0.390 0.373	0.368 0.383	0.359 0.356	0.331 0.324	0.293 0.292	0.388 0.389	0.378 0.371	0.360 0.363	0.348 0.339
198.6	0.430 0.426	0.428 0.424	0.410 0.416	0.388 0.392	0.368 0.370	0.348 0.349	0.304 0.300	0.401 0.401	0.393 0.391	0.378 0.384	(0.332) 0.363
397.3	0.487 0.467	0.468 0.476	0.459 0.454	0.438 0.435	0.407 0.411	0.384 0.376	0.326 0.333	0.444 0.444	0.435 0.433	0.424 0.418	0.398 0.396
V_{max} (1)	2.11	2.14	2.01	1.93	1.80	1.68	1.51	2.05	1.97	1.93	1.86
K_{mapp} (1)	45.62	53.44	56.01	44.95	42.70	43.69	49.65	56.25	53.05	57.21	60.29
K_i (1)		21254	26671								
V_{max} (2)	2.10	2.12	2.12	1.92	1.79	1.67	1.45	1.99	1.94	1.90	1.79
K_{mapp} (2)	44.76	51.19	55.32	44.33	41.29	43.36	42.47	50.24	49.32	54.29	52.53
K_i (2)		25329	25724								
V_{max} (3)	2.10	2.13	2.09	1.92	1.79	1.67	1.49	2.03	1.96	1.92	1.84
K_{mapp} (3)	44.63	52.79	54.93	44.30	41.46	43.53	47.36	54.23	51.69	56.64	57.95
K_i (3)		19932	26320								
V_{max} (4)	2.10	2.13	2.09	1.92	1.79	1.67	1.47	2.01	1.95	1.92	1.82
K_{mapp} (4)	44.45	52.22	55.15	44.08	41.22	43.52	45.09	52.80	50.76	56.10	56.10
K_i (4)		20856	25207								
Mittelwerte	K_i (1): 24869 K_i (2): 22821 K_i (3): 22973 K_i (4): 22004			K_i (1): - K_i (2): - K_i (3): - K_i (4): -						K_i (1): - K_i (2): - K_i (3): - K_i (4): -	
	Vorinkubation: 34 min Inkubation: 14 min			Vorinkubation: 31 min Inkubation: 14 min			Vorinkubation: 32 min Inkubation: 14 min				
	Anzahl Tests: 3			Anzahl Tests: 2			Anzahl Tests: 2				

ALA [μM]	2-Nitrobenzophenon (80) [μM]		Mixed-Pyrral Analogon 81 [μM]		PBG-Analogon 82 [μM]							
	0	546	1092	2185	0	3323	5537	7752	0	1141	1901	2662
	(0.193)	(0.209)	(0.179)	(0.197)	(0.260)	(0.225)	(0.205)	(0.178)	(0.282)	(0.282)	(0.280)	(0.262)
39.7	(0.195)	(0.173)	(0.199)	(0.189)	(0.253)	(0.209)	(0.188)	(0.187)	(0.288)	(0.279)	(0.275)	(0.257)
	0.289	0.288	0.287	0.270	(0.414)	(0.360)	0.346	0.301				
79.4	0.300	0.294	0.293	0.278	(0.412)	(0.374)	0.345	0.314				
	0.356	0.356	0.349	0.342	0.478	0.458	0.413	0.403				
119.2	0.354	(0.329)	0.351	0.338	0.473	(0.417)	0.421	0.403				
	(0.371)	0.388	0.376	0.376	0.517	0.506	0.468	0.430	0.588	0.559	0.558	0.530
158.9	0.389	0.384	0.379	0.373	0.505	0.502	0.469	0.451	0.587	0.568	0.561	0.539
	0.405	0.404	0.396	0.392	0.547	0.534	0.522	0.492	0.613	0.598	0.584	0.562
198.6	0.403	0.399	0.399	0.389	0.545	0.531	0.527	0.497	0.611	0.605	0.588	0.552
	0.462	0.453	0.444	0.445	0.599	0.627	0.602	0.577	-----	0.666	0.647	0.640
397.3	0.447	0.452	0.449	0.438	0.615	0.606	0.595	0.577	0.678	0.677	0.657	0.662
Vmax (1)	2.07	2.13	2.08	2.13	1.92	2.00	2.08	2.13	2.11	2.14	2.03	2.11
K _m app (1)	56.01	64.69	62.4	73.38	54.27	68.59	92.92	115.96	48.37	57.52	49.36	68.97
K _i (1)		3522	9569	6891		12586	7775	6819	6032	?	?	6250
Vmax (2)	2.05	2.06	2.03	2.04	1.92	2.01	2.04	2.02	2.11	2.13	2.04	2.13
K _m app (2)	54.43	57.81	57.69	63.61	53.96	70.10	88.18	101.42	48.28	56.04	49.66	72.23
K _i (2)		8793	18225	12951		11103	8731	8813	7089	?	?	5363
Vmax (3)	2.06	2.09	2.06	2.09	1.92	2.00	2.07	2.07	2.11	2.14	2.04	2.12
K _m app (3)	55.43	61.53	60.42	69.1	54.22	68.97	91.612	107.4	48.35	57.04	49.43	69.54
K _i (3)		4970	12149	8862		12206	8027	7902	6351	?	?	6073
Vmax (4)	2.06	2.08	2.05	2.07	1.92	2.01	2.06	2.04	2.11	2.13	2.04	2.12
K _m app (4)	54.98	59.85	59.18	66.56	54.26	69.41	90.45	103.47	48.33	56.78	49.49	70.77
K _i (4)		6163	14304	10372		11897	8302	8546	6527	?	?	5733
Mittelwerte		K _i (1): 6660 K _i (2): 13323 K _i (3): 8660 K _i (4): 10372				K _i (1): 9060 K _i (2): 9549 K _i (3): 9378 K _i (4): 9582					K _i (1): 6141 K _i (2): 6226 K _i (3): 6212 K _i (4): 6130	
		Vorinkubation: 30 min Inkubation: 14 min		Vorinkubation: 36 min Inkubation: 20 min		Vorinkubation: 33 min Inkubation: 20 min						
		Anzahl Tests: 1		Anzahl Tests: 4		Anzahl Tests: 1						

ALA [μM]	Chlorpyrrol 83 [μM]		Thioimidazoläre 84 [μM]		Hämaminsäure (85) [μM]				
	0	3077	0	3258	0	7602			
	1846	4308	5430	7602	0	1354	2257	3160	
	(0.253)	(0.232)	(0.254)	(0.245)	(0.260)	(0.228)	(0.235)	(0.227)	
39.7	(0.246)	(0.243)	(0.250)	(0.247)	(0.257)	(0.226)	(0.246)	(0.234)	
	(0.413)	(0.380)	(0.407)	(0.351)	(0.389)	(0.351)	(0.359)	(0.349)	
79.4	(0.418)	(0.348)	(0.405)	(0.406)	(0.405)	(0.370)	(0.386)	(0.356)	
	0.527	0.511	0.479	0.478	0.491	0.464	0.454	0.427	
119.2	0.518	0.514	0.500	0.486	0.492	0.468	0.439	0.428	
	0.562	0.568	0.536	0.540	0.532	0.512	0.493	0.474	
158.9	0.560	0.554	0.539	0.532	0.518	0.510	0.494	0.454	
	0.600	0.587	0.548	0.561	0.539	0.554	0.520	0.497	
198.6	0.586	0.584	0.557	0.564	0.541	0.550	0.524	0.489	
	0.677	0.674	0.614	0.632	0.612	0.620	0.586	0.550	
397.3	0.668	0.674	0.615	0.638	0.605	0.622	0.582	0.542	
Vmax (1)	2.12	2.15	1.94	2.07	1.86	2.03	1.88	1.73	
K _{mapp} (1)	55.73	61.67	51.05	64.67	44.10	67.33	60.58	55.32	
K _i (1)	15137	28897	12203	14188	23831		3625	6932	
Vmax (2)	2.14	2.18	1.91	2.04	1.89	2.09	1.86	1.79	
K _{mapp} (2)	58.24	65.02	48.56	61.08	47.78	64.71	57.67	55.29	
K _i (2)	12121	26441	12627	13272	22852		6547	13260	
Vmax (3)	2.12	2.15	1.93	2.05	1.87	2.02	1.87	1.80	
K _{mapp} (3)	56.34	63.57	49.89	63.20	44.68	66.50	59.63	55.19	
K _i (3)	14379	28112	12205	13651	22820		4047	7737	
Vmax (4)	2.13	2.19	1.92	2.05	1.87	2.02	1.87	1.80	
K _{mapp} (4)	57.06	64.99	49.56	62.46	45.58	65.97	58.97	55.60	
K _i (4)	13286	27194	12523	13608	22966		4607	8715	
Mittelwerte	K _i (1): 22094 K _i (2): 21113 K _i (3): 21736 K _i (4): 21299	K _i (1): 16740 K _i (2): 16250 K _i (3): 16225 K _i (4): 16365	K _i (1): 16740 K _i (2): 16250 K _i (3): 16225 K _i (4): 16365	K _i (1): 16740 K _i (2): 16250 K _i (3): 16225 K _i (4): 16365	K _i (1): 16740 K _i (2): 16250 K _i (3): 16225 K _i (4): 16365	K _i (1): 16740 K _i (2): 16250 K _i (3): 16225 K _i (4): 16365	K _i (1): 16740 K _i (2): 16250 K _i (3): 16225 K _i (4): 16365	K _i (1): 16740 K _i (2): 16250 K _i (3): 16225 K _i (4): 16365	K _i (1): 16740 K _i (2): 16250 K _i (3): 16225 K _i (4): 16365
	Vorinkubation: 32 min Inkubation: 20 min		Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min		Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min		Vorinkubation: 30 min Inkubation: 20 min		
	Anzahl Tests: 3		Anzahl Tests: 3		Anzahl Tests: 3		Anzahl Tests: 3		

ALA [μM]	4-Maleinimidobutansäure (86) [μM]			
	0	1683	2805	3927
39.7	(0.224)	0.207	0.223	0.209
	(0.229)	0.222	0.198	0.205
79.4	0.340	0.342	0.335	0.320
	(0.311)	0.350	0.331	0.321
119.2	0.406	0.393	0.391	0.395
	0.395	0.402	0.391	0.385
158.9	0.426	0.424	0.423	0.405
	0.428	0.426	0.421	0.414
198.6	0.445	(0.472)	0.438	0.429
	0.455	0.442	0.435	0.433
397.3	0.506	0.484	---	0.480
	0.483	0.488	0.487	0.476
Vmax (1)	2.44			
K _{mapp} (1)	51.68			
K _i (1)				
Vmax (2)	2.21			
K _{mapp} (2)	48.24			
K _i (2)				
Vmax (3)	2.23			
K _{mapp} (3)	50.51			
K _i (3)				
Vmax (4)	2.22			
K _{mapp} (4)	49.69			
K _i (4)				
Mittelwerte			K _i (1): - K _i (2): - K _i (3): - K _i (4): -	
Vorinkubation: 31 min Inkubation: 14 min				
Anzahl Tests: 1				