

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg**

Leitung: Professor Dr. rer. nat. Kristina Lorenz

**Rolle der Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase PDXP im Vitamin B6-
Metabolismus muriner Erythrozyten und Hippocampi**



Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Linda Witzinger

aus Würzburg

Würzburg, April 2020

Referentin: Prof. Dr. Antje Gohla
Korreferent: Prof. Dr. Harald Schulze
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Überarbeitetes Exemplar

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	Abbildungsverzeichnis	
2	Abkürzungsverzeichnis	
3	Einleitung	1
3.1	Phosphatasen	1
3.2	Die Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase (PDXP)	2
3.3	Substrate von PDXP	4
3.3.1	Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP)	4
3.3.2	Phosphocofilin (Serin 3-phosphoryliertes Cofilin)	5
3.3.3	SRC-3 (Steroid Rezeptor Koaktivator-3)	6
3.4	Rolle von PDXP im Vitamin B6-Metabolismus	7
3.5	Auswirkungen eines PDXP Knockouts	11
4	Ziel der Arbeit	13
5	Material und Methoden	14
5.1	Material	14
5.1.1	Antikörper	14
5.1.2	Chemikalien	14
5.1.3	Enzyme, Proteine, und andere biologisch aktive Substanzen	16
5.1.4	Mausmodelle	16
5.1.5	Puffer und Lösungen	18
5.1.5.1	Cayman Glutathion Assay Kit	18
5.1.5.2	HPLC-Elutionslösung	19
5.1.5.3	Ripa-Puffer (4x)	19
5.1.5.4	Ringer-Lösung	20
5.1.5.5	SDS-PAGE	20
5.1.5.6	Western Blot	21
5.1.6	Software, Webseiten	22
5.1.7	Technische Geräte	23
5.1.8	Verbrauchsmaterialien	24
5.2	Methoden	25
5.2.1	Blutentnahme	25
5.2.2	Isolation muriner Erythrozyten	25
5.2.3	Aufarbeitung der Proben	27
5.2.4	Isolation von murinen Hippocampi und Lysatherstellung	29
5.2.5	Vorbereitung der Lysate zur Durchführung einer SDS-PAGE	30

5.2.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	30
5.2.7	SDS-PAGE	33
5.2.8	Western Blot	34
5.2.8.1	Proteintransfer.....	34
5.2.8.2	Immundetektion.....	35
5.2.8.3	Densitometrische Quantifizierung	36
5.2.9	Glutathion Assay.....	37
5.2.9.1	Prinzip	37
5.2.9.2	Vorbereiten der Proben	38
5.2.9.3	Durchführung des Assays	39
5.2.9.4	Ableitung der GSH-Konzentration	39
6	Ergebnisse	40
6.1	Erstellung von Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) und Pyridoxal (PL) Eichgeraden	40
6.2	Messung der PLP-Konzentrationen in murinen Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen	42
6.3	Eine Verdopplung erythrozytärer PLP-Spiegel führt nicht zu einer Erhöhung der intrazellulären Glutathion (GSH)-Konzentration	43
6.4	Bestimmung der Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase (PDXP)-Aktivität in murinen Erythrozyten.....	45
6.4.1	Inhibition der Pyridoxal Kinase (PDXK) durch Ginkgotoxin	45
6.4.2	Messung der basalen Phosphatase-Aktivität	48
6.4.3	Bestimmung der Phosphatase-Aktivität nach Substratzufuhr	50
6.4.3.1	PLP-Umsatz verschiedener B6-Vitamere	50
6.4.3.2	Gesteigerte PDXP-Aktivität nach Substraterhöhung.....	51
6.4.4	Messung der PDXP-Aktivität gegen „freies“ PLP	54
6.5	Die PDXP-abhängige Dephosphorylierung von PLP ist in Erythrozyten aus gefasteten Mäusen nicht erhöht.....	57
6.6	PDXP-vermittelte Konversion von PN zu PL.....	59
6.7	Auswirkungen des Alters auf den Vitamin B6-Metabolismus muriner Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen	62
6.7.1	Rückgang erythrozytärer PLP-Level mit zunehmendem Alter	63
6.7.2	Das physiologische Alter der Mäuse hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die erythrozytäre Phosphatase-Aktivität von PDXP	64
6.7.3	Altersbedingter Unterschied in der PNPO Enzymexpression muriner Erythrozyten.....	66

6.8	Einfluss des Mausalters auf den Vitamin B6-Metabolismus im Hippocampus	68
6.8.1	Altersabhängige Dynamik der PLP-Konzentration in isolierten Hippocampi.....	68
6.8.2	Abweichende PDXP Enzymexpression in isolierten murinen Hippocampi unterschiedlicher Altersgruppen	70
6.9	Vergleich der freien PLP-Konzentrationen in isolierten Erythrozyten und Hippocampi	72
7	Diskussion.....	74
7.1	Gemessene Phosphatase-Aktivität von PDXP in murinen Erythrozyten	74
7.2	Dynamischer Gleichgewichtszustand zwischen gebundener und freier Form von PLP	77
7.3	Die PDXP-katalysierte Dephosphorylierung spielt in Zeiten unzureichender Nahrungszufuhr keine Rolle für die Mobilisierung intrazellulärem PLPs in Form von PL.....	79
7.4	Die erythrozytäre Konversion von PN zu PL ist PDXP-abhängig	82
7.5	Altersbedingter Rückgang erythrozytärer PLP-Konzentrationen	84
7.6	Vitamin-B6 Metabolismus in Hippocampi	86
7.7	Einordnung der Ergebnisse und Ausblick	89
8	Zusammenfassung / Summary.....	90
8.1	Zusammenfassung.....	90
8.2	Summary.....	91
9	Literaturverzeichnis	93
10	Danksagung.....	
11	Eidesstattliche Erklärung / Affidavit	
11.1	Eidesstattliche Erklärung.....	
11.2	Affidavit	
12	Curriculum vitae	

1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Reaktionsmechanismus von PDXP	3
Abbildung 2:	Schema einer PLP-abhängigen Transaminierungsreaktion	4
Abbildung 3:	Struktur der verschiedenen B6-Vitamere und ihre enzymatische Umwandlung ineinander	7
Abbildung 4:	Vermuteter Vitamin B6-Metabolismus in Säugetieren	9
Abbildung 5:	Strategie zur Generierung PDXP-defizienter Mäuse	17
Abbildung 6:	Isolation von murinen Erythrozyten aus Vollblut mittels Zellulose	26
Abbildung 7:	Reaktionsmechanismus zur Ausbildung des Semicarbazonderivats	28
Abbildung 8:	Vereinfachte Darstellung des Trennprinzips in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	31
Abbildung 9:	Schematischer Aufbau einer HPLC-Maschine	32
Abbildung 10:	Schema des Aufbaus beim <i>semi-dry</i> Western Blot	34
Abbildung 11:	Prinzip des Immunoblots	35
Abbildung 12:	Glutathion-Synthese	37
Abbildung 13:	Prinzip der Quantifizierung von Glutathion (GSH) in Erythrozyten und Plasma	38
Abbildung 14:	Erstellung von Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) und Pyridoxal (PL)- Eichgeraden	40
Abbildung 15:	HPLC- basierter Vergleich der Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP)- Level zwischen Wildtyp (WT) und Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase (PDXP)-defizienten (KO) Mäusen.	42
Abbildung 16:	Vergleich der Glutathion-Konzentrationen in Erythrozyten und Plasma aus WT- und PDXP-KO Mäusen	44
Abbildung 17:	Schematische Darstellung des Vitamin B6-Metabolismus in Erythrozyten	46
Abbildung 18:	Strukturvergleich von Pyridoxin und Ginkgotoxin	47
Abbildung 19:	Vergleich des Zeitverlaufs erythrozytärer PLP-Intensitäten nach Inhibition der Pyridoxal (5'-Phosphat) Kinase (PDXK) in Wildtyp- und PDXP-defizienten Mäusen	48
Abbildung 20:	Bestimmung der PDXP-Aktivität in Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen	49

Abbildung 21:	PLP-Umsatz in Erythrozyten von Wildtyp-Mäusen nach Inkubation mit Pyridoxin, Pyridoxamin oder Pyridoxal.	50
Abbildung 22:	Bestimmung der PDXP-Aktivität nach Substraterhöhung in Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen (A-C). Messung des Anstiegs erythrozytärer Pyridoxal (PL)-Konzentrationen (D).....	52
Abbildung 23:	Bestimmung der PDXP-Aktivität gegen „freies“ PLP in Erythrozyten aus WT- und PDXP KO-Mäusen.	55
Abbildung 24:	Dephosphorylierung von freiem sowie gebundenem PLP durch Zusatz von exogenem PDXP.	56
Abbildung 25:	Vergleich der PLP- bzw. PL-Konzentrationen in Erythrozyten bzw. Plasma von gefasteten mit normal gefütterten WT- und KO-Mäusen.	58
Abbildung 26:	Vergleich der PL- bzw. PLP-Bildung in isolierten Erythrozyten aus WT- und PDXP KO-Mäusen	60
Abbildung 27:	Vergleich der PL- bzw. PLP-Bildung in Vollblut aus Wildtyp- und PDXP-defizienten Mäusen	61
Abbildung 28:	Physiologischer Rückgang erythrozytärer PLP-Konzentrationen in Wildtyp- (WT) und PDXP-defizienten (KO) Mäusen mit zunehmendem Lebensalter.	63
Abbildung 29:	Vergleich der PDXP-Aktivität in Erythrozyten aus jüngeren (<100 d) mit älteren (>100 d) WT- und KO-Mäusen	65
Abbildung 30:	Altersbedingte Unterschiede in der Expression von PNPO muriner Erythrozyten aus Wildtyp- (WT) und PDXP-defizienten (KO) Mäusen.....	67
Abbildung 31:	Veränderung der PLP-Konzentrationen isolierter Hippocampi aus WT- und KO-Mäusen mit zunehmendem Alter der Tiere	69
Abbildung 32:	Altersabhängige Unterschiede in der PDXP-Expression in Lysaten isolierter Hippocampi aus Wildtyp- (WT) und PDXP-defizienten (KO) Mäusen.....	71
Abbildung 33:	Bestimmung des Anteils an freiem PLP am gesamten PLP in isolierten Erythrozyten und Hippocampi aus WT- und KO-Mäusen	72

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
A.U.	<i>arbitrary units</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CDNB	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen
Cre	<i>causes recombination</i>
DA	Derivatisierungslösung, <i>derivatisation agent</i>
DTNB	Dithio-bis-2(-nitrobenzoesäure)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion (Dimer)
GT	Ginkgotoxin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
Hepes-Na	Hepes-Natriumsalz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KO	Knockout
loxP	<i>locus of X-over P1</i>
Mg ²⁺	Magnesiumkation
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MPA	Metaphosphat
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADPH/H ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PDXP	Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase
PDXK	Pyridoxal (5'-Phosphat) Kinase
PL	Pyridoxal
PLP	Pyridoxal 5'-Phosphat
PM	Pyridoxamin
PN	Pyridoxin
PNPO	Pyridox(am)in (5'-Phosphat) Oxidase
RT	Raumtemperatur
S.E.M.	Standardfehler, <i>standard error of the mean</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNB	Thionitrobenzoat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
V	Volt
(v/v)	Volumenprozent, <i>volume per volume</i>
WT	Wildtyp
(w/v)	Massenkonzentration, <i>weight per volume</i>
ww	<i>wet weight</i>

3 EINLEITUNG

3.1 Phosphatasen

Reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung sind die am häufigsten vorkommenden posttranslationalen Modifikationen in eukaryotischen Zellen. (1, 2) Neben der Modulation von Kohlenhydraten, Lipiden und Nucleotiden spielt vor allem die Protein(de)phosphorylierung eine wichtige Rolle für die Regulation zellulärer Funktionen wie Adhäsion, Differenzierung, Metabolismus, Proliferation, Sekretion, Transport und Zellzyklus. (3-8) Proteinphosphorylierung ist durch Schnelligkeit, Modifikation bereits vorliegender Proteine und Reversibilität gekennzeichnet und stellt dadurch einen effizienten Weg zur Regulation der Zellantwort dar. (4, 7) An den reversiblen Prozessen sind zwei Enzymklassen beteiligt. Proteinkinasen katalysieren das kovalente Anheften einer Phosphatgruppe an ihr Substrat, und Phosphatasen vermitteln die entsprechende Rückreaktion der Hydrolyse der Phosphatgruppe. (2, 6, 9) Störungen innerhalb des Regulationsmechanismus können an der Ätiologie von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes, rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus, neurologischen Krankheiten sowie Tumorerkrankungen beteiligt sein. (8, 10-12)

Das humane Genom kodiert 518 Proteinkinasen, die ca. 2% aller menschlichen Gene ausmachen. (13-15) Die Zahl der humanen Proteine mit einer Phosphatase-Domäne wurden mit 199 beschrieben. (16, 17) Der Großteil der Protein(de)phosphorylierungen findet an Serin, Threonin und Tyrosinresten statt. (18) So wurden die Phosphatasen klassischerweise anhand ihrer Substratspezifität in die Familien der Tyrosin und Serin / Threonin Phosphatasen eingeteilt. (3) Die Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPs) stellen die größte Klasse dar und sind zusammen mit den Protein Tyrosin Kinasen an der Regulation zellulärer Signalkaskaden beteiligt. (10) Die Gruppe der Protein Serin / Threonin Phosphatasen (PSTPs) lässt sich in weitere Untergruppen der Phospho Protein Phosphatasen (PPP) und metallabhängigen Phosphatasen (PPM) unterteilen. (19) Phosphatasen verschiedener Klassen können außerdem anhand struktureller Charakteristika zum Typ der Haloazid Dehalogenase (HAD) gruppiert werden. Diese dephosphorylieren sowohl nieder- als auch hochmolekulare Substrate mit teils exzellenter Spezifität. (3, 20) Neben den Protein Phosphatasen existieren Lipid Phosphatasen (LPs) und Nudix Phosphatasen (Nudix), welche Aktivität gegenüber Phospholipiden, Phosphoinositiden (LPs) sowie Nukleosiddiphosphaten (Nudix) zeigen. (21, 22)

3.2 Die Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase (PDXP)

PDXP wurde 1992 zum ersten Mal aus menschlichen Erythrozyten isoliert und liegt als Homodimer mit einer molekularen Masse von 64 kDa und einer Monomerlänge von 296 Aminosäuren vor. Murines PDXP besitzt 292 Aminosäuren und stimmt zu ca. 93% in seiner Aminosäuresequenz mit menschlichem PDXP überein. Die Phosphatase PDXP ist Mg^{2+} -abhängig und zeigt die größte Aktivität bei physiologischem pH-Wert. (23, 24) Nach molekularer Klonierung von PDXP erwiesen sich PDXP und Chronophin, welches 2004 als Cofilin Phosphatase identifiziert wurde, als identisch. (25-27) PDXP zählt zur großen Familie der *haloacid dehalogenase* (HAD) Phosphatasen, welche ubiquitär in allen Reichen der Lebewesen vorkommen. Ursprünglich wurden sie nach den in Prokaryoten entdeckten 2-Haloacid Dehalogenasen benannt. Die HAD Superfamilie wird zum Großteil von Phosphatmonoester-Hydrolasen (= Phosphatasen, ~79%) und Phosphoanhydrid-Hydrolasen (= ATPasen, ~20%) bestimmt, aber auch Phosphonoacetaldehyd-Hydrolasen (= Phosphonatasen) und Zucker-Phosphomutasen (= Phosphotransferasen) sind vertreten. (26, 28, 29) Bei PDXP handelt es sich wie bei allen HAD Phosphatasen um eine Mg^{2+} -abhängige Phosphoaspartat Transferase, die eine hoch konservierte katalytische Einheit besitzt. (26, 30) Die Kern-domäne ihres katalytischen Zentrums weist dabei eine, ähnlich der sogenannten Rossmannfaltung, charakteristische Anordnung von α -Helices und β -Faltblattstrukturen auf. Zudem enthalten alle HAD Phosphatasen hoch konservierte Sequenzmotive mit einer bestimmten Aminosäureabfolge. (29, 31-33)

Im Gegensatz zu den meisten anderen Phosphatasen, die die Nucleophile Serin oder Cystein für den Phosphattransfer benutzen, besitzt PDXP einen Aspartat-Rest für den nucleophilen Angriff. (6, 20) Der Reaktionsmechanismus besteht dabei aus zwei Teilschritten. Zunächst wird die Phosphatgruppe des Substrats durch den Aspartatrest nucleophil attackiert und es kommt zur Ausbildung eines Phosphoaspartat-Intermediats. Anschließend wird dieses durch H_2O hydrolysiert. (28, 34) Das katalytische Aspartat wird dabei regeneriert. (20) Ein zweiter Aspartatrest (in Abbildung 1 als Asp+2 bezeichnet, wegen seiner Entfernung von zwei Resten zum Aspartat-Nucleophil) dient gleichzeitig als Säure bzw. Base, die im ersten Schritt den Substratrest protoniert, und im zweiten Schritt das Wassermolekül deprotoniert (siehe Abbildung 1). Als Kofaktor wird Mg^{2+} benötigt, das für die richtige Positionierung von Substrat und Phosphatgruppe sorgt und den Übergangszustand durch Ladungsausgleich stabilisieren kann. (20, 28)

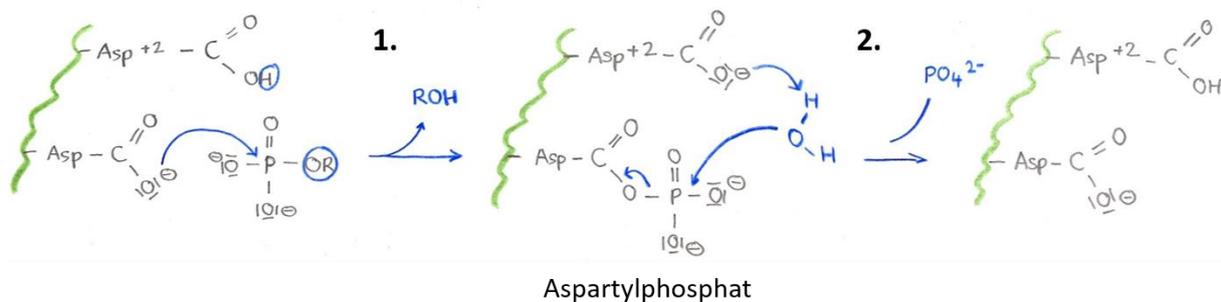


Abbildung 1: Reaktionsmechanismus von PDXP

Die zwei Teilschritte sind mit Nummern gekennzeichnet. Während der Reaktion kommt es zur Bildung eines Aspartylphosphat-Übergangszustandes. Für Details, siehe Kapitel 3.2. Abbildung angelehnt an (28).

Der beschriebene Reaktionsmechanismus erfordert zunächst Wasserausschluss, um den nucleophilen Angriff des Aspartats zu begünstigen. Für den Schritt der Phosphat-ablösung durch H₂O wird hingegen Kontakt zur Lösung benötigt. (26) Dafür besitzen HAD Phosphatasen bewegliche Elemente für eine umfangreiche Abschirmung ihres katalytischen Zentrums. Die sogenannten Cap-Domänen ermöglichen den reversiblen Aus- und Einschluss von Wasser. (29, 35) Die Phosphatase PDXP besitzt eine relativ große aus α/β -Strukturen bestehende Cap-Domäne, welche die Umsetzung kleinerer Moleküle durch Verschluss des katalytischen Zentrums erleichtert. (20, 26) Die Cap-Domäne trägt zusätzlich zur Substratspezifität bei. (36-38) Phosphatasen mit derartigen Domänen zielen typischerweise auf niedermolekulare Substrate ab, die sie gewissermaßen im katalytischen Zentrum einschließen können. PDXP scheint eine Ausnahme darzustellen, da es neben Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP, siehe folgendes Kapitel 3.3.1), einem kleinen elektrophilen Molekül, auch Phosphoproteine wie Phosphocofilin und SRC-3 (*steroid receptor coactivator*) dephosphorylieren kann. (20)

3.3 Substrate von PDXP

3.3.1 Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP)

Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) ist die aktivierte Form von Vitamin B6 und stellt einen der wohl vielseitigsten organischen Kofaktoren in der Natur dar. PLP-abhängige Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Aminosäurestoffwechsel und katalysieren mehr als 140 verschiedene biochemische Reaktionen wie Transaminierungen, Decarboxylierungen, Eliminierungen, Racemisierungen und Substitutionsreaktionen. (26, 39, 40) Während der Katalyse kommt PLP eine wichtige Funktion zur Stabilisierung des Übergangszustandes zu. Abbildung 2 stellt den Ablauf einer PLP-abhängigen Transaminierungsreaktion schematisch dar.

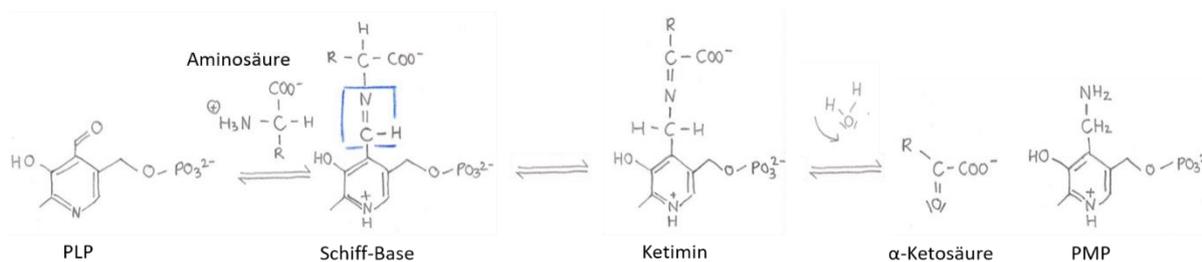


Abbildung 2: Schema einer PLP-abhängigen Transaminierungsreaktion

PLP formt mit der Aminosäure des Substrats eine Schiff-Base. Durch Verschieben der Doppelbindung entsteht ein Ketimin. Schließlich lagert sich ein Wassermolekül an die Doppelbindung an und anstelle der Aminosäure löst sich eine α -Ketosäure ab und PMP bleibt zurück. Abbildung modifiziert nach (41).

Durch Bindung der C4-Aldehydgruppe von PLP an einen Lysinrest im aktiven Zentrum eines Apoenzyms liegt zunächst ein internes Aldimin vor. Bei Substratbindung wird die primäre Aminogruppe des Lysins durch eine Aminogruppe des Substrates getauscht und PLP bildet eine sogenannte Schiff-Base mit dem Substrat. Eine Schiff-Base entsteht als Produkt durch Reaktion einer Aldehydgruppe mit einem primären Amin. Das freie Elektronenpaar des α -C-Atoms der Aminosäure wird verschoben und aus dem Aldimin entsteht so ein Ketimin. PLP kann diesen Übergangszustand stabilisieren. Schließlich lagert sich Wasser an die Doppelbindung, und die entstandene α -Ketosäure kann abdissoziieren. Durch Reaktion in Gegenrichtung kann der Kofaktor die Aminogruppe wiederum auf eine α -Ketosäure übertragen und wird dadurch regeneriert. (41)

Als essenzieller Kofaktor wird PLP sowohl im Aminosäurestoffwechsel, bei der Synthese von Neurotransmittern (Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin, GABA), der Hämbiosynthese und der Glykogenolyse benötigt. (42-46) PDXP kommt durch Dephosphorylierung von PLP eine wichtige Rolle im Vitamin B6-Stoffwechsel zu, auf die an anderer Stelle ausführlich eingegangen wird (siehe Kapitel 3.4 Rolle von PDXP im Vitamin B6-Metabolismus). (47)

3.3.2 Phosphocofilin (Serin 3-phosphoryliertes Cofilin)

(Phospho) Cofilin ist ein ~20 kDa großes Aktin-bindendes Protein, das an der Dynamik und Reorganisation der Aktinfilamente eukaryotischer Zellen beteiligt ist. (48-50) Die Aktinfilamente sind Teil des Zytoskeletts und bestehen aus Aktin, das in monomerer (G-Aktin) oder filamentöser (F-Aktin) Form vorkommt. Die monomere Form lagert sich unter Ausbildung helikaler Strukturen zu einem Polymer aus F-Aktin zusammen, welches ein Plus- und ein Minus-Ende besitzt. Die Polymerisation überwiegt am Plus- und die Depolymerisation am Minus-Ende. Der ständige Auf- und Abbau der Aktinfilamente ermöglicht der Zelle einen schnellen Umbau. (51)

Hauptverantwortlich für den Umbau der Aktinfilamente *in vivo* sind die Proteine der ADF (*actin-depolymerizing factor*)-/ Cofilin-Familie, bestehend aus Cofilin-1, Cofilin-2 und ADF. Sie binden an beide Aktinformen und katalysieren sowohl Polymerisation als auch Depolymerisation durch Trennen der Aktinfilamente. Die Wirkung hängt unter anderem von der Konzentration an aktivem Cofilin ab. (49, 50, 52) So begünstigen niedrige Konzentrationen die Depolymerisation durch Trennen der Aktinfilamente, wohingegen höhere Konzentrationen die Aktinnukleation und Polymerisation fördern sollen. (50, 52)

Da die Aktivität von ADF / Cofilin die Aktinfilament-Dynamik enorm beeinflusst, unterliegt sie einer strikten zellulären Kontrolle. (53) Cofilin wird durch Phosphorylierung eines Serinrestes vermittelt durch LIM-Kinasen (LIMK) und testikuläre Proteinkinasen (TESKs) inhibiert. Daneben bewirken eine Erhöhung des pH-Wertes sowie die Bindung an Phosphatidylinositole ebenfalls die Inhibierung der Proteine. (25, 27) Mehrere Enzyme katalysieren die Dephosphorylierung, und somit die Aktivierung von Cofilin. Neben Serin / Threonin Phosphatasen wie PP1 und PP2 wurde die Familie der Slingshot Phosphatasen (SSH) beschrieben, die Cofilin-abhängige Aktinfilament-Dynamiken *in vivo* vermittelt. (25, 26, 54-56) Da die Aktinreorganisation in einigen

Eukaryotensystemen auch ohne SSH funktioniert, scheint eine weitere Cofilin Phosphatase beteiligt zu sein. (27) 2004 gelangen GOHLA ET AL. die biochemische Isolation von Chronophin, einer Cofilin aktivierenden Phosphatase. (25) Sie konnten aufzeigen, dass Chronophin ein wichtiger Regulator von Cofilin-abhängigen Aktin-filamentprozessen wie Zellteilung, Motilität und Membrandynamiken darstellt. (25, 26) Zudem scheint ein Zusammenhang zwischen fehlregulierter Chronophin-Aktivität und der Entstehung maligner Tumoren zu bestehen. So führte eine veränderte Chronophin-Aktivität zu fehlerhafter Zellteilung und resultierte in aneuploiden Zellen. (25)

3.3.3 SRC-3 (Steroid Rezeptor Koaktivator-3)

Der ~160 kDa Steroid Rezeptor Koaktivator (SRC-3) ist ein Mitglied der p160 Steroid Rezeptor Koaktivator-Familie. Durch sein ursprünglich nachgewiesenes verstärktes Auftreten bei Brustkrebs 1 wird er auch AIB1 (*amplified in breast cancer 1*) genannt. Koaktivatoren werden von Kernrezeptoren benötigt, um die Brücke zwischen den Rezeptoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie zu bilden. (57, 58)

SRC-3 wird durch Phosphorylierung zum aktivierten Koaktivator und bindet im Zellkern an ligandenaktivierte nukleäre Rezeptoren. (59) Durch die Interaktion mit den Rezeptoren und weiteren Mediatoren wird schlussendlich die Gentranskription erheblich aktiviert. (58) Chronophin und die Serin / Threonin Phosphatasen PP1 und PP2 inhibieren SRC-3 durch Dephosphorylierung. Ihnen kommt daher eine wichtige Schlüsselrolle in der Regulation SRC-3-vermittelter Rezeptorsignalwege zu. (59)

SRC-3 steht auf verschiedenen Wegen in Zusammenhang mit der Entstehung vieler Tumorerkrankungen, auch unabhängig von seiner Wirkung als Kernrezeptor-Koaktivator. (57) Beispielsweise führt die Aktivierung von NF- κ B, einem weiteren Transkriptionsfaktor, zu verminderter Apoptose. Dies geschieht unter anderem durch vermehrte Expression von Apoptose-Inhibitoren sowie Überexpression pro-apoptotischer Proteine. (60, 61) COSTE ET AL. konnten zeigen, dass die Abwesenheit von SRC-3 im Mausmodell zur Entstehung maligner B-Zell-Lymphome führt. (62)

3.4 Rolle von PDXP im Vitamin B6-Metabolismus

PDXP ist durch Dephosphorylierung seines Substrates PLP, die aktivierte Form von Vitamin B6, am Vitamin B6-Metabolismus beteiligt. Der Begriff Vitamin B6 umfasst eine Gruppe von sechs Pyridin-Derivaten (B6-Vitamere) mit ähnlicher Struktur: Pyridoxin (PN), Pyridoxamin (PM), Pyridoxal (PL), sowie Pyridoxin 5'-Phosphat (PNP), Pyridoxamin 5'-Phosphat (PMP) und Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP). Die B6-Vitamere unterscheiden sich in ihren funktionellen Gruppen am C4- und C5-Atom. PN besitzt am C4-Atom eine Hydroxymethylgruppe (-CH₂-OH), PL eine Aldehydgruppe (-CHO), und PM eine Aminomethylgruppe (-CH₂-NH₂). Alle drei Formen können am C5-Atom zu ihren entsprechenden 5'-Phosphatestern (PNP, PLP und PMP) phosphoryliert werden (siehe Abbildung 3). (47, 63-65)

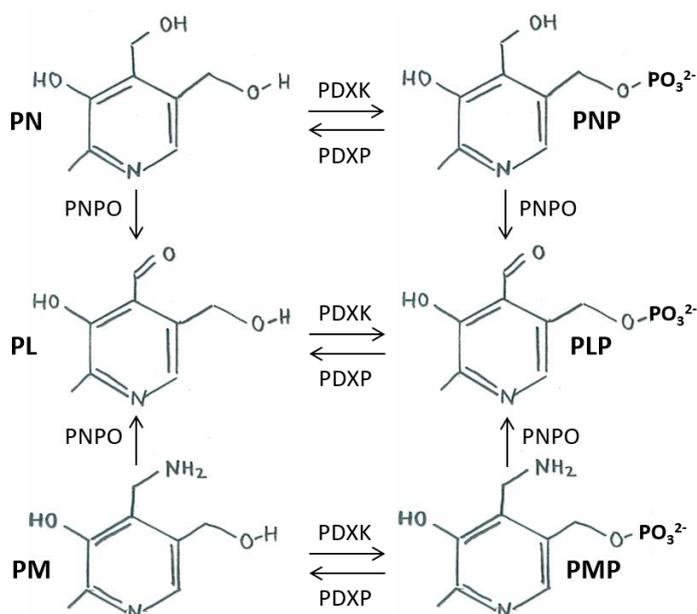


Abbildung 3: Struktur der verschiedenen B6-Vitamere und ihre enzymatische Umwandlung ineinander

PN(P), Pyridoxin (5'-Phosphat); PL(P), Pyridoxal (5'-Phosphat); PM(P), Pyridoxamin (5'-Phosphat). PDXP, Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase; PDXK, Pyridoxal Kinase; PNPO, Pyridox(am)in Oxidase. Für Details, siehe Kapitel 3.4.

Als essenzieller Kofaktor wird PLP von allen Lebewesen benötigt. Jedoch sind lediglich Mikroorganismen und Pflanzen zur *de-novo*-Synthese von PLP befähigt. Lange Zeit galt der in *Escherichia coli* entdeckte Weg als einziger, der letztlich mittels einer Pyridoxin-Synthase ausgehend von Deoxyxylose 5'-Phosphat (DXP) und 4-Phospho-hydroxy-L-Threonin zur Synthese von PNP führt. Dieses wiederum kann durch eine Oxidase in PLP überführt werden. (46, 66) Daneben existiert ein später entdeckter

DXP-unabhängiger Syntheseweg, der aus Glycerinaldehyd 3-Phosphat oder Dihydroxyaceton, Ribose oder Ribulose 5'-Phosphat und Glutamin direkt PLP formt. (67, 68) Im Gegensatz dazu sind Säugetiere auf die externe Zufuhr von B6-Vitaminen über die Nahrung angewiesen. Ein *salvage pathway* erlaubt deren Umwandlung ineinander, und die Phosphorylierung die Bildung der entsprechenden aktivierten B6-Formen. Die Enzyme Pyridoxal Kinase (PDXK), Pyridox(am)in Oxidase (PNPO) und die Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase (PDXP) sind an diesen Prozessen beteiligt. Die ATP-abhängige PDXK katalysiert dabei die Phosphorylierung der Vitamere PN, PM und PL zu ihren entsprechenden 5-Phosphateestern PNP, PMP und PLP. PNP und PMP können anschließend durch die PNPO zu PLP oxidiert werden. Intrazelluläres PDXP kann PLP wiederum zu PL hydrolysieren (siehe Abbildung 3). (63)

In tierischer Nahrung stellen PLP und PMP die vorherrschende Form dar, wohingegen PN(P) sowie PN-Glucoside in Pflanzen überwiegen. Abbildung 4 stellt den vermuteten Vitamin B6-Metabolismus in Säugetieren schematisch dar. Die phosphorylierten B6-Vitamere werden zunächst durch eine intestinale alkalische Phosphatase, und die PN-Glucoside durch eine Glucosidase hydrolysiert, bevor sie von den Darmepithelzellen aufgenommen werden. (63, 64, 69) Mehrere Studien deuten auf passive Diffusion als Art der intestinalen Aufnahme hin. (70, 71) SAID ET AL. beschrieben zudem einen Carrier-vermittelten Mechanismus zur Aufnahme von PN in Caco-2 (*colorectal adenocarcinoma*)-Epithelzellen. (72, 73) Die Leber scheint eine zentrale Rolle im Vitamin B6-Metabolismus zu spielen. Nach Aufnahme von B6-Vitaminen in die Hepatozyten findet zunächst eine PDXK-abhängige Phosphorylierung zu PNP und PMP statt, wodurch es für die weitere Verstoffwechslung in der Zelle gehalten wird. Anschließend werden diese zu PLP oxidiert. Ausgehend von PL kann eine direkte Phosphorylierung zu PLP stattfinden. Zudem besitzen Hepatozyten die Fähigkeit, PLP zu 4-Pyridoxinsäure abzubauen, welche dann mit dem Urin ausgeschieden werden kann. (63, 64, 74) *In vivo* Studien lassen vermuten, dass es im Dünndarmepithel ebenso zu einer Verstoffwechslung der aufgenommenen B6-Vitamere zu PLP kommt. (69) Im Plasma kommt Vitamin B6 hauptsächlich als an Albumin gebundenes PL vor. (23, 75, 76) Der Großteil des erythrozytären PLPs liegt hingegen gebunden an Hämoglobin vor. (23) Der Vitamin B6-Metabolismus in Erythrozyten wird an anderer Stelle thematisiert (siehe Kapitel 6.4.1).

Im Gehirn wird PLP als Kofaktor zur Synthese von Neurotransmittern wie Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, GABA, Histamin und Serotonin benötigt. (65, 77) *In vitro* Studien zeigten, dass phosphorylierte B6-Vitamer die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können. (78, 79) So wird vermutet, dass auch die Hirnzellen PLP ausgehend von unphosphorylierten B6-Vitaminen mit Hilfe der PDXK und PNPO herstellen. (77) Vitamin B6 liegt im Gehirn überwiegend als PLP und PMP vor, welche durch enzymatische Transaminierung ineinander überführt werden können. (80, 81)

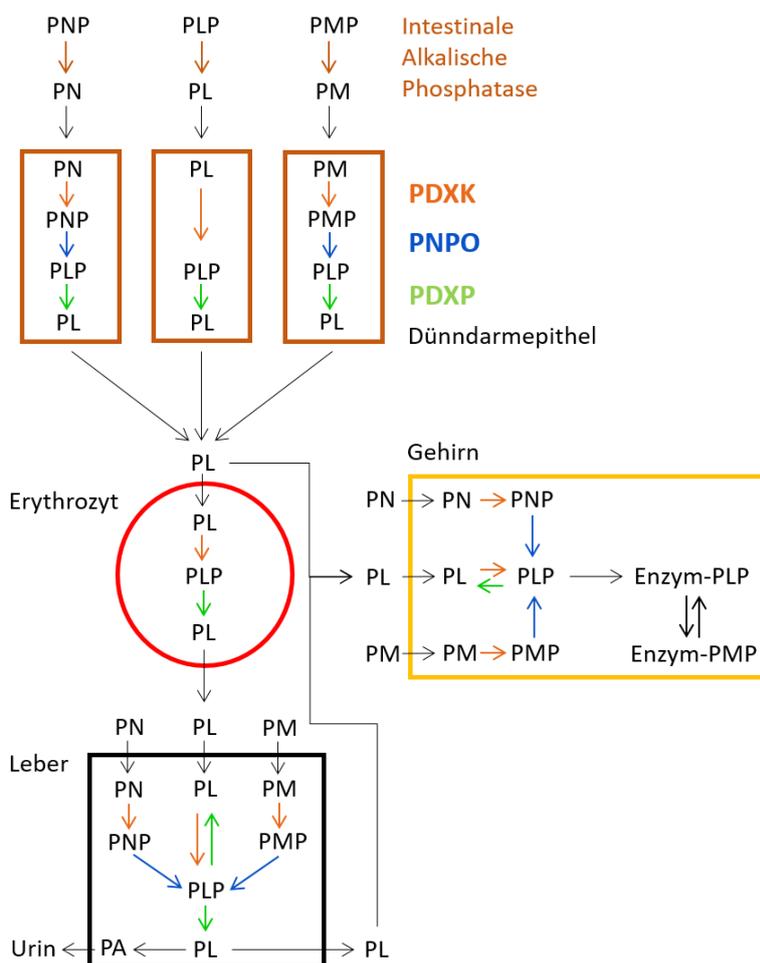


Abbildung 4: Vermuteter Vitamin B6-Metabolismus in Säugetieren

Nach Nahrungsaufnahme werden die phosphorylierten B6-Vitamer zunächst durch die intestinale alkalische Phosphatase hydrolysiert. Die unphosphorylierten B6-Vitamervorstufen Pyridoxin (PN), Pyridoxal (PL) und Pyridoxamin (PM) werden anschließend vom Dünndarmepithel resorbiert. PN und PM werden zunächst mittels der Pyridoxal Kinase (PDXK) zu PNP und PMP phosphoryliert und anschließend durch die Pyridox(am)in Oxidase (PNPO) zu PLP oxidiert. PL kann direkt zu PLP phosphoryliert werden. Die Pyridoxal Phosphatase dephosphoryliert PLP zu PL, welches ins Plasma abgegeben werden kann. Erythrozyten können PL aufnehmen und erneut mittels der PDXK zu PLP metabolisieren. Es wird angenommen, dass PL durch eine PDXP-abhängige Dephosphorylierung wiederum ins Plasma abgegeben werden kann. (82) Auch die Leber besitzt die nötige Enzymausstattung, um PLP ausgehend von den B6-Vitamervorstufen zu synthetisieren. Außerdem kann diese PL zu 4-Pyridoxinsäure (PA) abbauen, welches mit dem Urin ausgeschieden wird. Die unphosphorylierten B6-Vitamer können die Blut-Hirn-Schranke passieren und anschließend ebenso PLP mittels PDXK sowie PNPO synthetisieren. Die farblich markierten Reaktionspfeile entsprechen den Enzymen PDXK (orange), PNPO (blau) und PDXP (grün). Abbildung modifiziert nach (32).

Der Transport des Kofaktors zu den unterschiedlichen Geweben und Organen schließt eine Dephosphorylierung von PLP ein. Das Ektoenzym *tissue non-specific alkaline phosphatase* (TNSALP) ist eine an die Plasmamembran gebundene unspezifische Phosphatase, welche an der extrazellulären Hydrolyse von PLP im Vitamin B6-Metabolismus beteiligt ist. (83, 84) So konnten in Patienten mit Hypophosphatasie, einer Krankheit mit fehlender Aktivität der TNSALP, erhöhte Plasma PLP-Konzentrationen bei unveränderten PLP-Spiegeln im Gewebe nachgewiesen werden. (83, 85) Neben der TNSALP existieren weitere unspezifische Phosphatasen, die die Hydrolyse von PLP ermöglichen. So wurde in Leber und Niere eine unspezifische saure Phosphatase nachgewiesen, die eine breite Spanne an Phosphateestern, wie auch PLP, dephosphoryliert. (86-88) Zudem konnte aus dem Gehirn eine alkalische Phosphatase, die PLP von allen getesteten Substraten präferierte, isoliert werden. Die Identität dieses Enzymes konnte allerdings nicht geklärt werden. (89) 1992 wurde die für PLP spezifische Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase (PDXP) erstmals aus humanen Erythrozyten isoliert. Im Gegensatz zur TNSALP ist sie intrazellulär lokalisiert und somit an der Hydrolyse zellulärem PLPs beteiligt. (23, 84)

Ein gestörter Vitamin B6-Metabolismus mit erniedrigten PLP-Konzentrationen steht im Fokus der Entstehung einer Reihe von Krankheiten. Zusätzlich zu der bereits oben erwähnten Hypophosphatasie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mutationen des PNPO-Gens, welche die PLP-Synthese beeinträchtigen, zu neonatalen epileptischen Enzephalopathien führen. Die Verabreichung von PN und PLP linderte die Anfälle. (65, 90, 91) Zudem können angeborene Gendefekte zu einer Anhäufung von Metaboliten führen, die PLP inaktivieren. Bei der Hyperprolinämie II, eine Krankheit die zu schweren Krampfanfällen führt, akkumuliert P5C (Pyrrolin-5-Carboxylat) im Organismus und inaktiviert PLP durch Reaktion mit diesem. (92) Aber auch erhöhte PLP-Spiegel scheinen mit negativen Konsequenzen für den Organismus einherzugehen. So führten intrazisternale Injektionen von PLP in Mäusen sowie Hunden zu epileptischen Anfällen. (93, 94) SALAZAR, P. beschrieb ebenfalls transiente epileptische Ereignisse bei Ratten nach intrazerebroventrikulärer Injektion von PLP. (95) Daher kommt der Regulation zellulärer PLP-Level sowie einem adäquat kontrolliertem Vitamin B6-Metabolismus eine bedeutende Rolle im Organismus zu.

3.5 Auswirkungen eines PDXP Knockouts

Der Forschungsgruppe AG Gohla ist es gelungen, ein PDXP-defizientes Mausmodell zu generieren, in welchem die PLP-Konzentrationen in Gehirn, Skelettmuskulatur und Erythrozyten bis zu dreifach erhöht sind. (47) Im Gehirn wird PLP als Kofaktor für Decarboxylierungen bei der Synthese von Neurotransmittern benötigt. Der PDXP-Knockout führte im Gehirn zu signifikant erhöhten GABA-Leveln (~20%). Die Konzentrationen an Dopamin, Serotonin, Epinephrin und Glutamat waren hingegen unverändert. (47) GABA wird eine wichtige Rolle für die Regulation adulter hippocampaler Neurogenese zugesprochen, welche das Gedächtnis beeinflussen könnte. (96) Der Hippocampus besteht aus mehreren anatomischen Strukturen im medialen Temporalappen (Gyrus dentatus, Cornu ammonis und Subiculum) und ist am räumlichen Denken sowie Erinnerungsvermögen beteiligt. (97, 98) JEANCLOS ET AL. führten *barnes maze* Versuche durch, die zur Bewertung des räumlichen Lernens der Mäuse herangezogen werden können. (47) Der Aufbau besteht aus einer kreisförmigen beleuchteten Plattform, in der ringsherum Löcher eingebracht sind. Es führt jedoch nur ein Ausgang zu einer *escape box*. Angetrieben durch ihren Instinkt, Schutz in dunklen geschlossenen Räumen zu suchen, erlernen die Tiere mithilfe von visuellen Hinweisen die Position des Tunnels, der zur *escape box* führt. (47, 99) Tatsächlich zeigten die PDXP-defizienten Mäuse ein verbessertes räumliches Lernvermögen und Gedächtnis. So benötigten die KO-Mäuse signifikant geringere Zeiten und Wege bis zum Auffinden des Tunnels. (47) GABA ist neben Gedächtnisfunktionen zudem an der Regulation von Angst sowie Muskelspannung beteiligt. (100) JEANCLOS ET AL. konnten zeigen, dass der PDXP-Knockout zu einem leicht ängstlichen Verhalten vor allem in älteren KO-Mäusen führt. Zusätzlich zeigten ältere PDXP-defiziente Mäuse geringere motorische Funktionen. (47) KIM ET AL. beschrieben erhöhte hippocampale Phosphocofilin-Level in deren PDXP KO-Mausmodellen (als PLPP / CIN bezeichnet) sowie erniedrigte Phosphocofilin-Level in transgenen PDXP-überexprimierten Mäusen. Eine modulierende Rolle der PDXP für synaptische Plastizität im Hippocampus wird angenommen. (101)

Eine Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktionen scheint auch physiologisch mit dem Alter der Tiere einzutreten. So waren ältere Tiere im Morris Wasserlabyrinth, eine Versuchsanordnung zur Bewertung hippocampalen Denkvermögens, deutlich eingeschränkt. (102-104) Quantitative Analysen zur absoluten Neuronenzahl ergaben jedoch keinen Verlust hippocampaler Nervenzellen in älteren gedächtnisbeeinträch-

tigten Tieren. (105, 106) So scheinen Veränderungen des GABA Signalwegs an der Verschlechterung neuronaler Kommunikation im Alter beteiligt. (102, 107) Immunhistochemische Studien ergaben in Hippocampi älterer gedächtnisbeeinträchtigter Tiere verringerte Expressionen der GAD 67 (Glutamatdecarboxylase), welche die GABA-Synthese katalysiert. (108) Ein Zusammenhang der alterskorrelierten Verminderung von GAD 67-positiven Neuronen und der Abnahme hippocampaler Gedächtnisfunktionen wird angenommen. (109) *In vivo* Studien zeigten zudem eine Hyperreaktivität hippocampaler gealterter CA3-Neuronen, die in Zusammenhang mit der altersabhängigen Verminderung des hippocampalen räumlichen Denkvermögens gebracht werden können. (110)

Mögliche positive Effekte von Vitamin B6 auf die Erhaltung kognitiver Leistungen sowie Gehirnstrukturen werden derzeit kontrovers diskutiert. In kognitiv eingeschränkten Patienten ließen sich geringere Plasma Vitamin B6-Level nachweisen. (111) Vitamin B6-Supplementierung wirkte sich in derartigen Patientengruppen positiv auf deren kognitive Funktionen aus. (112) MACPHERSON ET AL. konnten Verbesserungen des räumlichen Gedächtnisses älterer Frauen, die prädisponiert für kognitive Einschränkungen waren, durch Vitaminsupplementierung aufzeigen. (113) Positive Effekte auf das Erinnerungsvermögen durch Multivitaminnahrungsergänzung wurden bei älteren Männern (Alter zwischen 50 und 74 Jahren) mit einem erhöhten Risiko zu kognitiven Funktionalitätsverlusten festgestellt. (114) Im Gegensatz dazu konnten HARRIS ET AL. und JANNUSCH ET AL. nach Vitaminsupplementierung zwar erhöhte Blut Vitamin B6-Level in ihren Probanden feststellen, jedoch ließen sich keine Verbesserung kognitiver Fähigkeiten nachweisen. (115, 116) Die Untersuchungen beschränkten sich dabei auf gesunde Probanden. Der Autor zog den Schluss, dass die Supplementierung von Vitamin B6 eine Art *ceiling effect* darstelle, welche in Individuen mit neurodegenerativen Krankheiten einen positiven Effekt erbringt, wohingegen kognitiv gesunde Individuen keine Verbesserungen aufzeigen. (116)

4 ZIEL DER ARBEIT

Die Pyridoxal Phosphatase PDXP (Chronophin) spielt durch Dephosphorylierung ihres Substrates Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) eine zentrale Rolle im Vitamin B6-Metabolismus. PLP stellt als aktivierte Form von Vitamin B6 einen essenziellen Kofaktor für eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen im Organismus dar. Die zelluläre PLP-Konzentration wird insbesondere durch die Aktivität der Pyridoxal Kinase (PDXK), der Pyridox(am)in Oxidase (PNPO) und der Pyridoxal Phosphatase (PDXP) kontrolliert.

In PDXP-defizienten Mäusen wurden bis zu zweifach erhöhte erythrozytäre PLP-Konzentrationen gefunden. (47) Allerdings ist die Funktion der PDXP in Erythrozyten nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Regulation der PLP-Konzentrationen in isolierten Erythrozyten aus Wildtyp- und PDXP-defizienten Mäusen analysiert, und der Vitamin B6-Metabolismus in Erythrozyten charakterisiert werden. Dazu wurden HPLC-basierte Untersuchungen der B6-Vitamere in Erythrozyten sowie immunchemische Expressionsanalysen Vitamin B6-regulierender intrazellulärer Enzyme durchgeführt.

Zudem sollte die bereits beschriebene Beeinträchtigung hippocampaler Gedächtnisfunktionen mit dem Alter näher untersucht werden. Altersbedingte Veränderungen des GABA-Signalwegs werden dabei als mögliche Ursache diskutiert. Auch in PDXP-defizienten Mäusen ließen sich, neben dreifach erhöhten PLP-Konzentrationen im Gehirn, Veränderungen ihrer GABA-Level nachweisen (~20% erhöht). Ein Zusammenhang zwischen PLP-Leveln und GABA-Konzentrationen liegt nahe. Aus diesem Grund sollte der Vitamin B6-Metabolismus in isolierten Hippocampi aus Wildtyp- und Knockout-Mäusen unterschiedlichen Alters charakterisiert werden. Hierzu wurden isolierte Hippocampi aus WT- und KO-Mäusen auf ihre B6-Vitamere hin chromatographisch untersucht, sowie die Expression ihrer Vitamin B6 regulierender Enzyme mittels Western Blot analysiert.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

5.1.1 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Anbieter</u>
Anti- α -Aktin, monoklonal, C4	1:7.500	Maus	EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA
Anti- α -Chronophin/ PDXP (C85E3), monoklonal	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
Anti- α -GAPDH, monoklonal (14C10)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
Anti- α -PDXX, polyklonal	1:1000	Kaninchen	Abcam, UK
Anti- α -PNPO, polyklonal	1:1000	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific, Rockford; USA
Anti-Kaninchen IgG, polyklonal HRP-konjugiert	1:10.000	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Anti-Maus IgG, polyklonal, HRP- konjugiert	1:10.000	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

5.1.2 Chemikalien

α -Zellulose	Sigma, St. Louis, USA
Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Promega, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, Steinheim
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Flüssiger Stickstoff	TIG, Tyczka Industrie-Gase, Würzburg
Glukose	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mikrozellulose Sigmacell	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
PBS	Gibco, Paisley, UK
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat (Tween-20)	Sigma-Aldrich, München
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Semicarbazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
SuperSignal West Pico Luminol / Enhancer Solution	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich,
Tris HCl	Sigma-Aldrich,
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trockenmilchpulver, fettfrei	Roth, Karlsruhe

5.1.3 Enzyme, Proteine, und andere biologisch aktive Substanzen

4-(2-Aminoethyl)benzonsulfonylfluorid (AEBSF)	Roche Pharma AG, Grenzach-Whylen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
Ginkgotoxin	Sigma Aldrich, St. Loui, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt
Precision Plus Protein Standards Dual Core	Bio-Rad, München
Pyridoxal	Sigma-Aldrich, Italien
Pyridoxal 5'-Phosphat	Fluka Bio Chemika
Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase (PDXP) (rekombinantes, murines PDXP, überexprimiert in <i>E. coli</i> , säulenchromatographische Aufreinigung mit ÄKTApurifier über <i>His6-tag</i> , Entfernung des <i>His6-tags</i> mittels <i>Tobacco Etch Virus</i> (TEV)-Protease, Aufreinigung von PDXP ohne <i>His6-tag</i> durch Größenausschlusschromatographie; für Details siehe <i>experimental procedures</i> aus (36))	AG Gohla, Würzburg
Pyridoxamin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Pyridoxin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

5.1.4 Mausmodelle

- Wildtyp Mäuse (C57Bl/6J-Hintergrund, homozygot gefloxt)
- Pyridoxal Phosphatase (PDXP) Knockout-Mäuse (C57Bl/6J Hintergrund)

Gefloxt Mäuse (PDXP^{tm1^{Goh}}) mit dem genetischen Hintergrund C57Bl/6J wurden durch die Firma OZGENE generiert. (47) Durch Kreuzen mit der *FLPe deleter strain* Maus B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor < tm1(FLP1)Dym >/RainJ wurde die Neomycin Resistenzkassette entfernt. Bei den gefloxt Mäusen wurde das 1. Exon mit zwei *loxP sites* gleicher Orientierung flankiert. Eine *loxP site* stellt eine spezifische Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase dar, die die anschließende Deletion des Allels ermöglicht (siehe Abbildung 5). (47)

Durch Verpaaren mit einer B6.FVB-Tg(Ella-cre)C5379Lmgd/J (Ella-Cre) Linie wurde in der AG Gohla eine PDXP Ganzkörperknockout Linie geschaffen. Aus den Ella-Cre Mäusen (bezogen von *Jackson laboratory*) gehen so in der F1-Generation ausschließlich heterozygote Tiere hervor. Durch weitere Verpaarung mit Tieren aus der F1-Generation ergeben sich nach dem klassischen Mendel'schen Prinzip jeweils

25% Mäuse, die homozygot für den Wildtyp-Lokus sind, („homozygot Wildtyp“), 50% Mäuse, die heterozygot für den *Pdxdp*-Lokus sind („heterozygot“), und 25% Mäuse, in denen das Exon 1 von *Pdxdp* auf beiden Allelen deletiert wurde (homozygot PDXP-defiziente Mäuse; „PDXP-KO“). Die PDXP-defizienten Mäuse sind lebensfähig, fertil und äußerlich nicht von Wildtypen zu unterscheiden. (47)

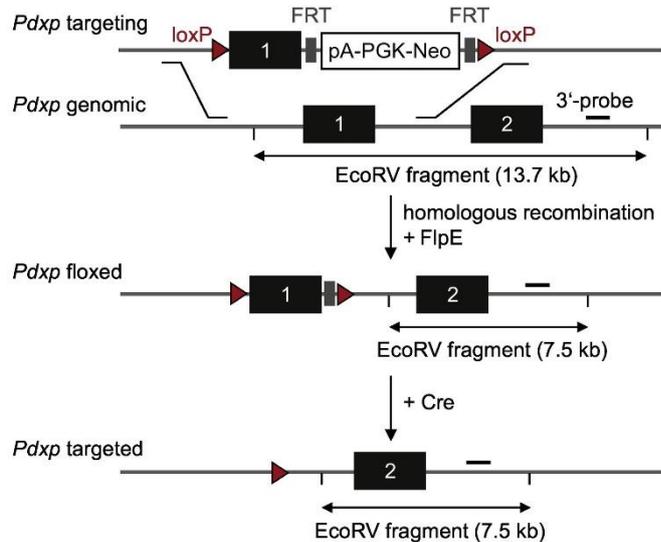


Abbildung 5: Strategie zur Generierung PDXP-defizienter Mäuse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden durch Verpaarung mit Ella-Cre transgenen Tieren global PDXP-defiziente Mäuse verwendet. Abbildung aus (47).

Die Tiere waren im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin der Universität Würzburg untergebracht. Sie unterlagen einem regelmäßigen Tag- / Nachtrhythmus mit 14/10 Stunden. Die Temperatur betrug konstant 21°C ($\pm 0,5$ °C) und die Tiere hatten nach Belieben Zugang zu Futter und Wasser. Alle untersuchten Mäuse waren männlich und waren in Käfigen zu Gruppen von 2-5 Tieren untergebracht. Die Haltung der Tiere wurde von der Regierung Unterfrankens genehmigt und gemäß den deutschen und europäisch geltenden Gesetzen zur Haltung und Nutzung durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem mit gefasteten Tieren experimentiert. Dabei wurde den Tieren 12 Stunden lang der Zugang zu Futter verwehrt. Die Tiere wurden um ca. 20 Uhr in neue Käfige gesetzt, die ausschließlich über Zugang zu Wasser verfügten. Die Blutentnahme erfolgte wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben am darauffolgenden Tag um ca. 8 Uhr morgens.

5.1.5 Puffer und Lösungen

5.1.5.1 Cayman Glutathion Assay Kit

Waschlösung

EDTA	0,1 mM
Hepes-Na	10 mM
KCl	80 mM
MgCl ₂	0,15 mM
NaCl	70 mM
pH	7,55

Inkubationslösung

DTT	2 mM
Glukose	10 mM
Hepes-Na	10 mM
KCl	80 mM
MgCl ₂	0,15 mM
NaCl	70 mM
pH	7,55

GSH MES Puffer (1x)

EDTA	2 mM
MES	0,4 mM
Kaliumphosphat	0,1 M

Im später beschriebenen Assay wird dieser Puffer ausschließlich zweifach verdünnt verwendet. Dafür wurde HPLC Reinstwasser herangezogen.

GSSG Standard

GSSG	25 µM
MES	2 ml

GSH Kofaktormischung

NADP+	
Glukose-6-Phosphat	
HPLC Reinstwasser	0,5 ml

GSH Enzymmischung

GSH-Reduktase	
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	in 0,2 ml Puffer
MES-Puffer (2x)	2 ml

GSH DTNB

DTNB	
HPLC Reinstwasser	0,5 ml

TEAM-Reagenz

Triethanolamin	4 M
----------------	-----

5.1.5.2 HPLC-Elutionslösung

HPLC Reinstwasser	
EDTA	1,07 mM
Na ₂ HPO ₄	60 mM
Methanol	9,5% (v/v)
pH	6,5

5.1.5.3 Ripa-Puffer (4x)

NaCl	150 mM
Natriumdesoxychololat	0,5% (v/v)
SDS	0,1% (x/v)
Tris	50 mM
Triton X-100	1% (v/v)
pH	7,5

Die folgenden Protease-Inhibitoren wurden jeweils frisch hinzugefügt:

AEBSF	1 mM
Aprotinin	5 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
Pepstatin	1 µg/ml

5.1.5.4 Ringer-Lösung

CaCl ₂	1 mM
Glukose	5 mM
Hepes	32 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	1 mM
NaCl	125 mM

5.1.5.5 SDS-PAGE

Lämmli-Puffer(4x)

Destilliertes Wasser	
β-Mercaptoethanol	4% (v/v)
Bromphenolblau	0,005% (w/v)
Glycerol	40% (v/v)
SDS	8% (w/v)
Tris-HCl	250 mM

Laufpuffer (10x)

Destilliertes Wasser	
Tris	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1% (w/v)

Sammelgel

Destilliertes Wasser	
Acrylamid	4% (v/v)
Bisacrylamid	1,04 % (v/v)
APS	0,75% (v/v)
SDS	0,1% (w/v)
TEMED	0,2% (v/v)
Tris-HCl	125 mM

Trenngel

Destilliertes Wasser	
Acrylamid	12% (v/v)
Bisacrylamid	3,2 % (v/v)
APS	0,75% (v/v)
SDS	0,1% (w/v)
TEMED	0,075% (v/v)
Tris-HCl	375 mM

5.1.5.6 Western Blot

Antikörperverdünnungsmedium

Destilliertes Wasser	
BSA	1% (w/v)
Hepes	10 mM
NaCl	0,5 M
NaN ₃	0,02% (w/v)
Tween-40	0,2% (w/v)

Anodenpuffer 1

Destilliertes Wasser	
Methanol	40% (v/v)
Tris	0,3 M

Anodenpuffer 2

Destilliertes Wasser	
Methanol	40% (v/v)
Tris	25 mM

Kathodenpuffer

Destilliertes Wasser	
Glycin	40 mM
Methanol	10% (v/v)
Tris	25 mM

Blottopuffer

Milchpulver	5% (w/v)
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
NaCl	80 mM
CaCl ₂	2 mM
Triton X-100	2% (v/v)

5.1.6 Software, Webseiten

Chromeleon 7.2	Thermo Fisher Scientific
Excel 2016	Microsoft
GraphPad Prism 6	GraphPad Software
ImageJ 1.45i	freeware, https://imagej.nih.gov/ij/download.html
ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, USA
Pubmed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

5.1.7 Technische Geräte

CLARIOstar	BMG Labtech, Ortenberg
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Insernhagen
HPLC Ultimate 3000 Dionex (Autosampler, Fluoreszenzdetektor, Pumpe, Säulenkompartiment)	Thermo Scientific, Deutschland
Heidolph MR Hei-Mix L Mixer Magnet	Heidolph Instruments, Schwabach
Heidolph Unimax 1010 Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach
Luminescent Image Analyzer (Image Quant LAS 4000)	GE healthcare, München
Mikrohämatokrit Zentrifuge	Hettich
Mini-PROTEAN TetraCell Elektrophoresesystem	Bio-Rad, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter Schott Instruments	Roth, Karlsruhe
Power Pac HC Spannungsquelle	Bio-Rad, München
Tissue Lyser II	Retsch GmbH, Haan
Trans-Blot SD Semi-Dry Elektrophorese Kammer	Bio-Rad, München
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe	ABM Greifenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz
VORTEX-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage (Grammbereich)	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Waage (Milligrammbereich)	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Western Blotting System (semi-dry)	Peqlab
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich

5.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einmal Plastikspritzen 2 ml	Becton, Dickinson, NJ, USA
Einmalskalpell	B. Braun
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Filterreaktionsgefäße (1,5 ml)	Amicon Ultra, Merck Millipore, Tullagreen
Falcon Conical Tube (15ml und 50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
HPLC- <i>vials</i>	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Membranfilter aus Nylon	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Nitrozellulosemembran	GE HealthcareLife Sciences, Uppsala, SE
Pipettenspitzen	SurPhob, Biozym, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Watte	Drogeriemarkt Müller
<i>Whatman</i> Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
<i>Whatman</i> 3MM Blottingpapier	GE HealthcareLife Sciences, Uppsala, SE

5.2 Methoden

5.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch Frau A. Keller ausschließlich an männlichen Mäusen im Rahmen einer Organentnahme. Das Blut wurde nach zervikaler Dislokation durch eine Herzpunktion gewonnen und in EDTA beschichtete Röhrchen überführt. Das Blutvolumen belief sich im Durchschnitt auf 250 µl pro Maus. Sämtliche Entnahmen erfolgten vormittags, zwischen acht – elf Uhr.

5.2.2 Isolation muriner Erythrozyten

Damit die Forschungsarbeit an roten Blutkörperchen nicht von weiteren zellulären Blutbestandteilen beeinflusst wird, wird die Isolierung der Erythrozyten aus dem enthaltenen Vollblut als notwendige Voraussetzung erachtet. Hauptprobleme, die sich aus einer Verunreinigung mit Leukozyten - wie z.B. polymorph kernigen Granulozyten - ergeben können, sind sowohl falsche Rückschlüsse durch Überlagerung mit Eigenschaften der Leukozyten als auch erythrozytäre Schädigung aufgrund entlassener leukozytärer Enzyme. (117)

Das entnommene Vollblut wurde nach der von ACHILLI ET AL. beschriebenen Methode filtriert, um ausschließlich die Erythrozyten zu gewinnen. (118) Hierbei dient eine Mischung aus jeweils 180 mg mikrokristalliner Zellulose und gleicher Menge an α -Zellulose als Filtereinheit für 1 ml Blut. Da das in den Versuchen maximal verwendete Blutvolumen 250 µl nicht überstieg, wurden dementsprechend nur 45 mg beider Zellulosen verwendet. Letztere wurden mit 2 ml PBS vermengt und auf mittlerer Stufe gevortext, bis eine homogene Suspension entstand. Eine Plastikspritze (2 ml) wurde als Filtervorrichtung verwendet und wie folgt präpariert (siehe Abbildung 6). Gemäß dem Durchmesser des Spritzenkolbens wurde *Whatman* Filterpapier zugeschnitten und auf den Boden des Zylinders eingepasst. Zusätzlich wurden 3,2 mg Watte abgewogen und in der Spitze verdichtet. Für den kompletten Isolationsvorgang wurde die Spritze in einer Haltevorrichtung befestigt. Anschließend wurde die homogene Suspension von Zellulose in PBS in den Zylinder pipettiert. Nach einigen Minuten konnte sich das Gemisch aus Zellulose über dem Filterpapier absetzen, lediglich das Medium durchlief die Filtereinheit und wurde verworfen. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Blut vorsichtig auf das entstandene Zellulosebett pipettiert. Nach vollständiger Durchdringung der Zellulose mit Blut wurden die Erythrozyten durch Zugabe von

1,5 ml PBS eluiert und in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. Da die Erythrozyten verglichen mit den Leukozyten eine weitaus bessere Fähigkeit zur Verformung besitzen, ist es ihnen möglich, das Zellulosenetz zu durchqueren, während die Leukozyten in der Filtereinheit verbleiben. (117)

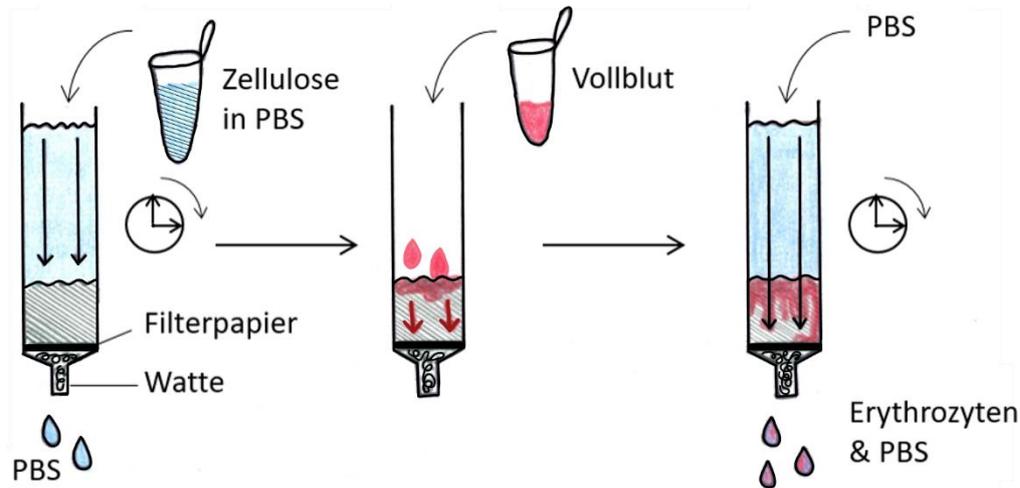


Abbildung 6: Isolation von murinen Erythrozyten aus Vollblut mittels Zellulose

Die einzelnen Schritte zur Isolation von murinen Erythrozyten aus Vollblut sind skizziert. Ein Gemisch aus Zellulose und PBS wurde in die Filtereinheit (Spritzenkolben mit Filterpapier und Watte) pipettiert, die Zellulose wurde mit Vollblut überschichtet und anschließend wurden die Erythrozyten mit PBS eluiert. Für Details, siehe Volltext.

Durch diesen Aspekt erweist sich die Methode als zuverlässig gegenüber anderen Methoden, deren Trennprinzip auf reinen Zentrifugations- und Waschvorgängen beruht. Dabei können gerade polymorphkernige neutrophile Granulozyten mit ähnlicher Dichte nicht in demselben Ausmaß von roten Blutkörperchen separiert werden. (117) Im Anschluss wurde die Suspension von Erythrozyten in PBS bei 100 x g und Raumtemperatur (RT) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abpipettiert und verworfen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml einer auf 37°C temperierten Ringerlösung vermischt und erneut zentrifugiert (100 x g, RT, 5 min). Nach Entfernen des Überstandes wurden diese mit Ringerlösung auf einen angestrebten Hämatokritwert von ca. 10% resuspendiert. Um den exakten Hämatokritwert zu ermitteln, wurden ca. 60 µl der Blutmischung in eine Kapillare aufgezogen und in einer Mikrohämatokrit-Zentrifuge (13.000 rpm, RT, 5 min) zentrifugiert. Die Werte wurden jeweils notiert und später in die Berechnung der PLP-Konzentration miteinbezogen. Nach 30-minütiger Inkubationsphase in einem Thermomixer (37°C, 700 rpm) konnten die Messungen entsprechend verschiedener Versuchsbedingungen erfolgen. Dafür wurde Probenvolumen im Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser lysiert,

anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C verwahrt. Für die Messungen des freien PLPs wurden die Blutproben nach dem Lysieren in Filtern mit einem Molekulargewichtsausschluss (MWCO) von 3 kDa zentrifugiert ($14.000 \times g$, 4°C , 40 min). Der Überstand wurde anschließend transferiert und ebenfalls schockgefroren.

5.2.3 Aufarbeitung der Proben

Pyridoxal 5'-Phosphat liegt in Zellen weitgehend als Schiff-Base vor, d.h. es geht mit seiner Aldehyd-Carbonylgruppe und den Aminogruppen umgebender Proteine eine kovalente Bindung ein. (119) Um PLP zugänglich für anschließende Messungen zu machen, sind im Allgemeinen Fällungsreagenzien wie Perchlorsäure nötig, die eine Präzipitation der Proteine hervorrufen. Somit wird durch anschließendes Zentrifugieren die Trennung von den Proteinen möglich, die im Pellet verweilen. Die Proben im Rahmen der hier durchgeführten Versuche wurden nach der von TALWAR ET AL. beschriebenen Methode aufgearbeitet, bei der die Proteinausfällung durch Perchlorsäure um eine Derivatisierung mittels Semicarbazid komplementiert wird. (120) Dabei wird den Proben eine Mischung aus Semicarbazid, Glycin und Wasser zugefügt. Semicarbazid bindet über seine freie Aminogruppe an die Carbonylgruppe von PLP und ersetzt damit das vorher gebundene Protein. So entsteht das säurestabile Semicarbazonderivat von PLP, das charakteristische fluoreszierende Eigenschaften besitzt (siehe Abbildung 7).

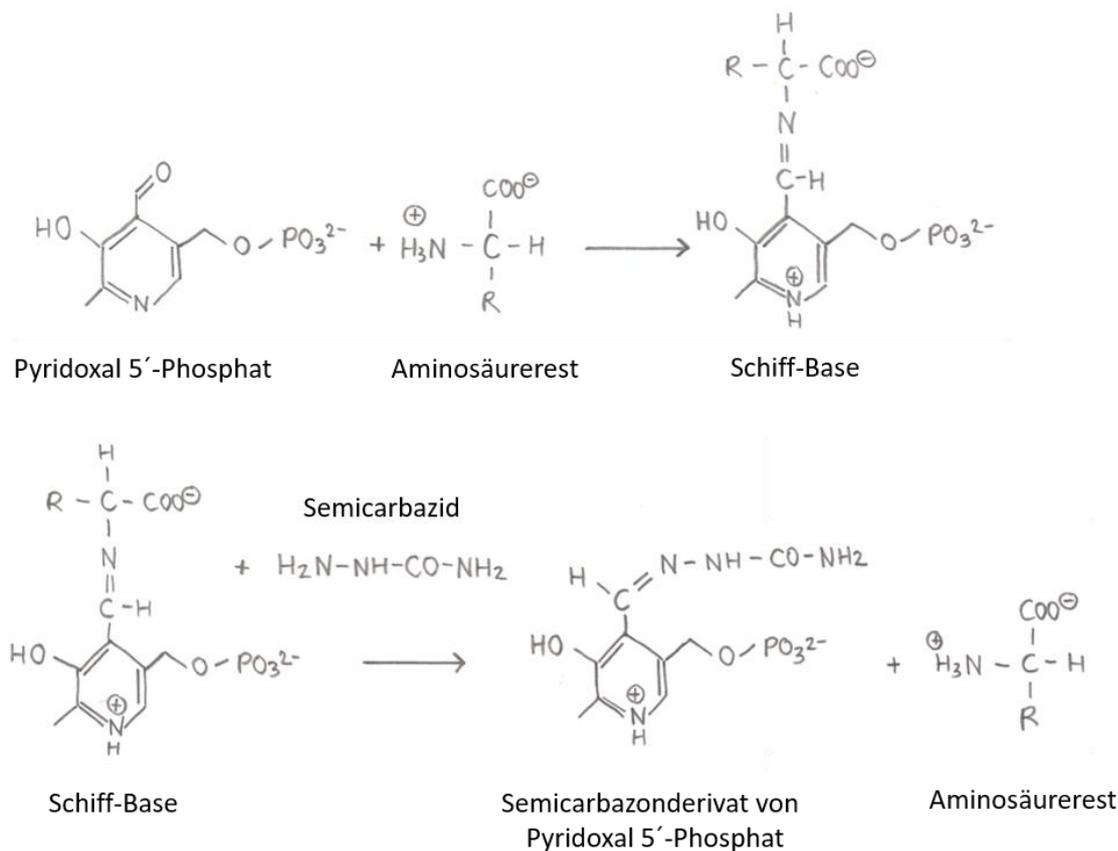


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus zur Ausbildung des Semicarbazonderivats

PLP geht unter Ausbildung einer Schiff-Base eine Bindung zu umliegenden Proteinen ein. Semicarbazid spaltet die Schiff-Base, indem es selbst an PLP bindet, und es entsteht das säurestabile Semicarbazonderivat von PLP. R, Rest (Proteinrest). Abbildung in Anlehnung an (119).

Der Schritt der Derivatisierung bietet entscheidende Vorteile im Bezug auf die quantitative Bestimmung des PLP-Gehalts. SRIVASTAVA ET AL. untersuchten die Rückgewinnungsraten an PLP von Proben bekannter Konzentration, welche im Vorfeld mit Semicarbazid behandelt wurden. Sie ergaben annähernd 100%, was einem Vielfachen bisheriger Methoden entspricht. Bei alleiniger Präzipitation durch Säure kann die PLP-Extraktion von Proteinen nicht immer vollständig stattfinden, was quantitative Analysen erschwert. (119) Gerade in Erythrozyten, die Gegenstand dieser Arbeit sind, ist dies jedoch von Wichtigkeit, da PLP eine weitaus stärkere Bindung zu Hämoglobin als zu Plasmaproteinen aufweist. (76) Zusätzlich wirkt sich die Derivatisierung positiv auf die Probenstabilität aus. So ließ sich über 48 Stunden hinweg kein nennenswerter Verlust an PLP verzeichnen. Somit können auch ganze Probensätze mittels Autosampler problemlos über Nacht analysiert werden. (120)

Zur Herstellung der hier verwendeten Derivatisierungslösung (*derivatization agent*, DA) wurden jeweils 750 mg Semicarbazid sowie 750 mg Glycin in 2 ml Wasser gelöst. Daraus resultiert eine Endkonzentration beider Stoffe von 250 mg/ml. Es empfiehlt sich, das Gemisch auf 37°C zu erwärmen und mehrmals auf hoher Stufe zu vortexen, um eine homogene Lösung zu erhalten. Währenddessen wurden die noch gefrorenen Proben bei Raumtemperatur dunkel gestellt, bis sie aufgetaut waren. Anschließend wurden jeweils 24 µl DA zu dem Probenvolumen von 300 µl hinzugefügt und bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Davon abweichenden Volumina wurde die dem vorher genannten Verhältnis entsprechende Menge an DA zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde jeder Messprobe 24 µl Perchlorsäure (70%) zugesetzt, auf höchster Stufe gevortext und im Anschluss zentrifugiert (21000 x g, 4°C, 15 min). Indessen wurden entsprechend der Anzahl der Versuchsexemplare HPLC-Probengläschen mit 20 µl einer 25%igen Natronlauge versehen. Vom entstandenen Zentrifugat wurden jeweils 200 µl abpipettiert und mit der in den Gläsern vorgelegten NaOH-Lösung vermischt. Es ist zu beachten, dabei keine überflüssigen Bläschen zu provozieren. Nach diesem Schritt waren die Proben bereit für die Messung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

5.2.4 Isolation von murinen Hippocampi und Lysatherstellung

Die Isolation der murinen Hippocampi sowie deren Lysatherstellung erfolgte durch Frau A. Keller. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und deren Hippocampi isoliert. Nach Übertragung in Eppendorf Reagenzgefäße wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gewogen. Die Dissektionen der Hippocampi erfolgten jeweils vormittags in einem Zeitraum von acht - elf Uhr. Als nächstes wurden die Proben mit PBS (100µl PBS/5mg Gewebe) versetzt und zum mechanischen Probenaufschluss eine Minute lang in einer Kugelmühle (*tissue lyser*) bei 20 Hz rotiert. Die so entstandenen Lysate wurden schließlich im Verhältnis 1:1 mit PBS vermengt. Anschließend Schritte der Probenaufbereitung erfolgten analog den in Kapitel 5.2.3 beschriebenen, die Volumina wichen jedoch ab. So wurden Lysate von 100 µl jeweils mit 8 µl DA sowie 8 µl Perchlorsäure versetzt, und schließlich zur chromatographischen Analyse ein Volumen von 100 µl in die mit 10 µl vorgelegter Natronlauge (25%) vorbereiteten HPLC-Probengläschen transferiert.

5.2.5 Vorbereitung der Lysate zur Durchführung einer SDS-PAGE

Das Verfahren der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wird in Kapitel 5.2.7 genauer ausgeführt. Dieses Kapitel dient der Erläuterung vorbereitender Schritte zur Durchführung einer SDS-PAGE. Die aus isolierten Hippocampi hergestellten Lysate (siehe Kapitel 5.2.4) wurden mit vierfach-konzentriertem RIPA-Puffer unter Rotation bei 4°C für 15 Minuten inkubiert und zentrifugiert (20.000 x g, 15 min, 4°C). Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Überstand mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (*Thermo Scientific*) bestimmt. Danach wurden die Lysate in vierfach-konzentriertem Lämmli-Puffer denaturiert und bei 94°C aufgekocht. Die weiteren Schritte erfolgten analog zu den in Kapitel 5.2.7 f. beschriebenen.

5.2.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein physikalisch-chemisches Verfahren zur Auftrennung flüssiger Substanzgemische in ihre einzelnen Komponenten. Dabei ist sowohl eine qualitative als auch quantitative Bestimmung dieser Komponenten möglich. Das System besteht aus einer mobilen flüssigen Phase, die mit hohem Druck durch eine stationäre Phase gepumpt wird. Bei der stationären Phase handelt es sich meist um Mikropartikel fester, poröser oder mit oberflächenaktiver Beschaffenheit, die eine Säule dicht auskleiden. Der Separiereffekt beruht auf unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen Substanzkomponenten gegenüber der festen bzw. flüssigen Phase, die unterschiedliche Polaritäten aufweisen. Substanzen, die Wechselwirkungen mit der mobilen Phase bevorzugen, wandern schneller als solche, die eher mit der stationären Phase interagieren. Somit ergeben sich verschiedene Elutionszeiten der Stoffe von der Säule (siehe Abbildung 8). (121, 122)

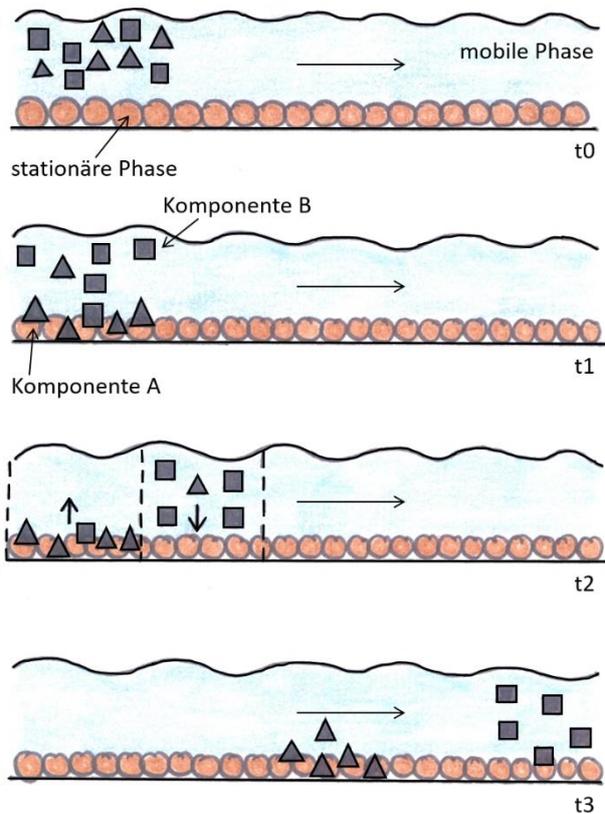


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des Trennprinzips in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zwei Komponenten A und B werden durch ungleiche Wechselwirkungen mit der stationären bzw. mobilen Phase unterschiedlich schnell transportiert und somit aufgetrennt. Komponente A tritt stärker mit der stationären Phase in Wechselwirkung, während Komponente B eher mit der mobilen Phase interagiert. t_0 - t_3 , verschiedene Zeiten. Abbildung modifiziert nach (121).

Verschiedene Separationsmodi wie Adsorptionschromatographie (Normalphase), Umkehrphasenchromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie und einige weitere finden in der Flüssigkeitschromatographie Anwendung. (123) Alle hier beschriebenen Versuche wurden mit dem Umkehrphasensystem der HPLC durchgeführt. Das bedeutet, dass die stationäre Phase - im Gegensatz zur Normalphase - aus hydrophobem Material besteht. Die hier Anwendung findende Phase besteht aus Octadecylsilan, ein mit Alkylketten modifiziertes Silica-Gel. Somit beruht die Wechselwirkung mit den Substanzkomponenten fast ausschließlich auf van-der-Waals Kräften. (121) Je unpolarer eine Substanz ist, desto stärker tritt sie in Wechselwirkung mit der hydrophoben stationären Phase und wird daher im Vergleich zu hydrophilen Komponenten erst später von dem Eluent abgelöst. (124) Neben der Auswahl verschiedener Trennmodi wird das Separationsverhalten auch von der Säulenlänge, der Partikelgröße der stationären Phase, sowie der Zusammensetzung der Elutionslösung beeinflusst. (125) Die mobile Phase besitzt polaren Charakter und

wird auf Wasserbasis hergestellt. Pro Liter Wasser wurden jeweils 314 mg EDTA (1 mM) und 10,68 g Dinatriumhydrogenphosphat (60 mM) gelöst, sowie 95 ml Methanol (9,5% v/v) zugefügt. Mit 85%iger Phosphorsäure wurde der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,2 µm Membranfilter aus Nylon gefiltert und ca. eine Stunde lang mit Hilfe einer Vakuumpumpe entgast. Mit einer Fließrate von 0,5 ml/min wird die mobile Phase bei rund 190 bar durch die hier verwendete RP (*reverse phase*) Säule (C18, 3 mm x 150 mm) gepumpt. Um die Lebensdauer der Trennsäule zu verlängern, ist ihr eine kürzere Schutzsäule vorgeschaltet. Diese enthält die gleiche stationäre Phase und kann grobe Verunreinigungen der Hauptsäule verhindern. Die Trennleistung des Systems wird dadurch nicht beeinflusst. (126) Von jeder der zu analysierenden Probe wurden 10 µl vollautomatisch durch einen Autosampler, der nach dem Split-Loop Prinzip verfährt, in das System injiziert. Nach analytischer Auftrennung der Substanzen erfolgte die Detektion mittels Fluoreszenzdetektor. In diesem wird die Probensubstanz gemäß dem Fluoreszenzspektrum des PLP-Semicarbazonderivats mit Licht der Wellenlänge 380 nm angeregt und anschließend das emittierte Lichtsignal von 450 nm Wellenlänge erfasst. Durch Umwandlung in elektrische Signale können die aufgetrennten Komponenten schlussendlich als Peaks dargestellt und identifiziert werden (siehe Abbildung 9). (127)

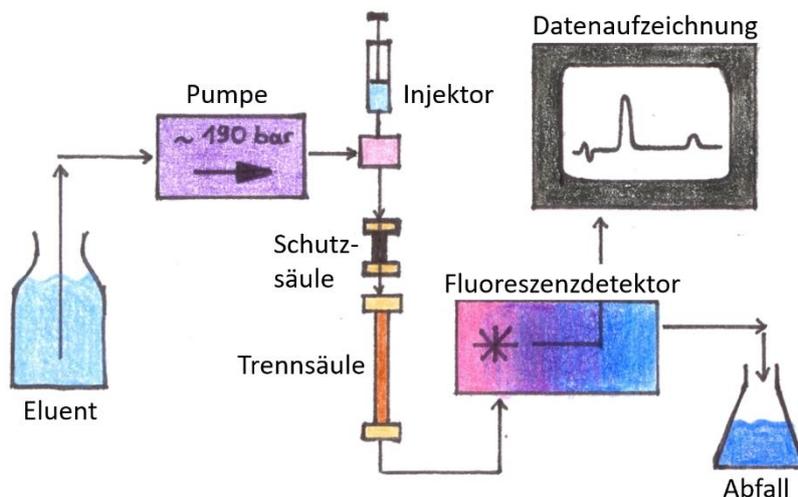


Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer HPLC-Maschine

Das Eluent wird bei ~190 bar durch die Trennsäule gepumpt. Mittels Autosampler werden die zu analysierenden Proben vollautomatisch ins System injiziert, und durch unterschiedliche Wechselwirkungen zu den verschiedenen Phasen innerhalb der Trennsäule aufgetrennt. Deren vorgeschaltete Schutzsäule verlängert ihre Lebensdauer. Nach der Auftrennung erfolgen die fluoreszenzbasierte Detektion und die Umwandlung in elektrische Signale zur Erfassung der einzelnen Komponenten als Peaks. Abbildung in Anlehnung an (127).

5.2.7 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist eine häufig angewandte analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse. Die zu untersuchenden Proteine werden denaturiert und wandern anschließend durch Anlegen eines elektrischen Feldes unterschiedlich weit in einer Polyacrylamidmatrix. (128) Die hier verwendete diskontinuierliche Gelelektrophorese mit SDS wurde erstmals 1970 von LÄMMLI beschrieben. (129) Die Erythrozytenproben wurden in zweifachem Lämmli-Puffer (siehe Material und Methoden) bei 94°C für fünf Minuten aufgekocht. Das im Puffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Tensid, das sich unter Ausbildung nicht kovalenter Bindungen an Proteine anlagert. Dadurch zerstört es deren Sekundär- und Tertiärstruktur. Das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol trägt durch Spaltung von Disulfidbrückenbindungen der Proteine ebenfalls zur Auflösung ihrer Tertiärstruktur bei. (130) SDS besitzt eine hydrophile Sulfatgruppe, welche den Proteinen eine negative Gesamtladung verleiht und deren Eigenladungen überdeckt. Dabei bindet SDS in einem konstanten Ladungszu Masse- Verhältnis, sodass die Ladung der SDS-Protein Komplexe proportional zur Molekülmasse ist. Die mit SDS ummantelten Polypeptidketten können somit – unabhängig von ursprünglicher Eigenladung und Struktur- nach ihrer molekularen Masse separiert werden. (131) Dieser Effekt beruht auf der siebartigen Struktur des auspolymerisierten Polyacrylamidgels, das größere Proteinketten länger zurückhält und kleinere Proteinketten schneller durch die Zwischenräume wandern lässt. (32, 130) Die Proben wurden jeweils in Gelen mit einem Polyacrylamidanteil von 12% aufgetragen. Dabei wird das eigentliche Trenngel von einem Sammelgel überschichtet. Es weist eine geringere Konzentration an Acrylamid (4%) auf und sorgt für einen einheitlichen Start der Proben im Trenngel. Die Elektrophorese wurde mittels konventioneller Kammern in einem Laufpuffer auf Tris-Glycin Basis durchgeführt. Bei einer konstanten Spannung von 80 V wurden die Proben im Sammelgel konzentriert und anschließend mit einer kontinuierlichen Stromstärke von 30 mA im Trenngel separiert. Der Vorgang wurde gestoppt, als die Front der Bromphenolblau markierten Banden das Gel durchlaufen hatte. Um später die molekulare Masse der Proteinbanden mittels Western Blot ableiten zu können, wurde Precision Plus Protein, eine Standardleiter aus gereinigten Proteinen bekannter Molekülmasse, mitaufgetragen.

5.2.8 Western Blot

5.2.8.1 Proteintransfer

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgt die Übertragung der Proteinbanden auf ein geeignetes Medium, das die anschließende Visualisierung mittels Antikörper möglich macht. Hierzu werden häufig Membranen aus Nitrozellulose herangezogen. Der Transfer erfolgte nach der *semi-dry* Methode, bei der mit Laufpuffer durchtränkte Filterpapiere, Gel und Membran übereinandergeschichtet werden. Ähnlich dem Prinzip der Gelelektrophorese wandern die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und bleiben an der Membran aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. (132) Zuerst wurde die Membran zur künftigen Orientierung an der oberen, rechten Ecke markiert, in destilliertem Wasser gewaschen und in Anodenpuffer 2 eingelegt. Den Boden des Stapels bildeten zwei von Anodenflüssigkeit 1 durchnässte Filterpapiere. Darüber folgten ein mit Anodenpuffer 2 eingeweichtes *Whatman* Papier, die eingelegte Membran und das in Kathodenpuffer geschwenkte Gel. Den Abschluss machten drei in Kathodenpuffer getauchte *Whatman* Filterpapiere (siehe Abbildung 10).

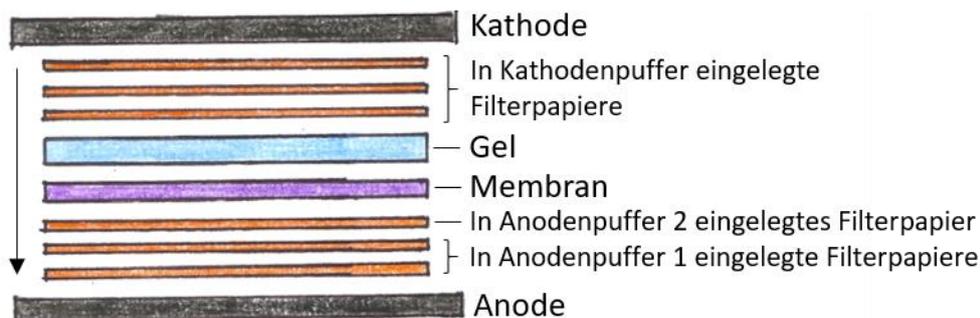


Abbildung 10: Schema des Aufbaus beim *semi-dry* Western Blot

Die Abbildung zeigt die Reihenfolge der Schichtung von Filterpapieren, Membran und Gel. Die Nitrozellulosemembran wurde nach Schwenken in Wasser in Anodenpuffer 2, das Gel in Kathodenpuffer eingelegt.

Die Zusammensetzung der verschiedenen Pufferlösungen wurde bereits in Kapitel 5.1.5.6 beschrieben. Beim Übereinanderlegen der einzelnen Schichten ist sowohl auf eine optimale Passung sowie auf die Vermeidung von Bläschenbildung zu achten. Diese würde einen ordnungsgemäßen Transfer behindern, was einen Informationsverlust bedeuten kann. Mit Hilfe eines *semi-dry* Transfersystems konnte der Blotvorgang bei einer maximalen Spannung von 25 V und einer konstanten Stromstärke von 70 mA für 30 Minuten erfolgen. Um den Erfolg des stattgefundenen Transfers zu

überprüfen, wurde die Membran anschließend in Ponceau S inkubiert. Dabei handelt es sich um einen roten Azofarbstoff, der über seine negativen Sulfatgruppen reversibel an die Aminogruppen der Proteine bindet. (133) Die gefärbten Membranen wurden gescannt, die Scans archiviert, und die Membranen anschließend mehrmals mit Wasser entfärbt.

5.2.8.2 Immundetektion

Die Identifizierung des Zielproteins erfolgte über indirekte Immundetektion, die auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper Bindung besteht. (134) Dabei bindet zunächst ein spezifischer Primärantikörper am Epitop des zu identifizierenden Proteins (Antigen). Der Primärantikörper wird im nächsten Schritt von einem an *horseradish peroxidase* (HRP) -gekoppelten, sekundären Antikörper gebunden. (135) HRP katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol. Dabei entsteht die energiereichere oxidierte Form des Luminols, die beim Übergang in den Grundzustand Lichtquanten emittiert (siehe Abbildung 11). (132)

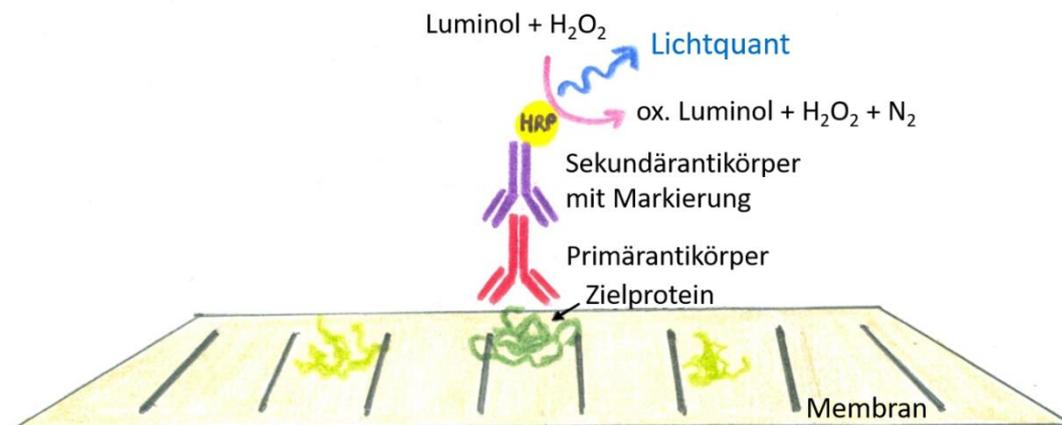


Abbildung 11: Prinzip des Immunoblots

Schematische Darstellung der Antigen-Antikörper Bindungen und Chemilumineszenzreaktion zum Nachweis spezifischer Proteine. Abbildung in Anlehnung an (136).

So wurde die Membran nach erfolgtem Proteintransfer zunächst für 30 Minuten in Blottopuffer inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, und so eine spezifische Antikörperbindung möglich zu machen. (137) Es schlossen sich fünf Waschschriffe mit Wasser bei RT an, bevor die Membran bei 4°C über Nacht und unter permanenter Rotation mit dem Primärantikörper inkubiert wurde. Die Primärantikörper, die sich gegen GAPDH, PNPO, PDXK und PDXP richten, waren im Rahmen dieser Arbeit jeweils 1:1000 in Antikörperverdünnungsmedium verdünnt. Der Primär-

antikörper, der sich gegen Aktin richtet, wurde in einer Verdünnung von 1:7.500 verwendet (siehe Material, Kapitel 5.1.1). Bei Raumtemperatur folgten weitere fünf Waschschriffe mit Wasser, die der Entfernung nur schwach oder unspezifisch gebundener Antikörper dienen. Unter Zugabe des mit Peroxidase markierten Sekundärantikörpers wurde die Membran bei RT für 2-3 Stunden in Blottopuffer kontinuierlich geschwenkt. Die Konzentration des hierfür verwendeten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers bzw. Anti-Maus-IgG Antikörpers (für Aktin) betrug 1:10.000. Um die Chemilumineszenzreaktion zu starten, wurden jeweils 900 µl von der *Super Signal West Pico Stable Peroxidase Solution* sowie der *Luminol / Enhancer Solution* gut durchmischt und die Membran damit im Anschluss 4,5 Minuten benetzt. Nach Beseitigung überschüssiger Lösung konnte die Detektion und Digitalisierung mit Hilfe des ImageQuant LAS 4000 erfolgen. Der Vorgang der Immundetektion lässt sich entsprechend verschiedener zu identifizierender Proteine mehrfach wiederholen. Demzufolge variieren die verwendeten Primärantikörper. Die hier eingesetzten Primärantikörper richteten sich gegen Aktin, GAPDH, PDXP, PDXK sowie PNPO.

5.2.8.3 Densitometrische Quantifizierung

Um die einzelnen Schwärzungsgrade der Proteinbanden sowohl innerhalb einer Membran als auch zwischen unterschiedlichen Membranen vergleichen zu können, wurden diese zunächst mittels *ImageJ* densitometrisch quantifiziert, und anhand von Ladekontrollen mit Aktin (im Hippocampus) bzw. GAPDH (in Erythrozyten) normalisiert. Nachfolgend fand eine interne Normalisierung der Banden (pro nachgewiesenem Protein) statt, indem die Intensität jeder einzelnen Bande durch den errechneten Mittelwert aller Banden einer Membran geteilt wurde. Schließlich wurden die intern normalisierten Werte der nachgewiesenen Proteine durch die ebenfalls intern normalisierten Werte der Ladekontrollen Aktin bzw. GAPDH geteilt. So ergeben sich Werte um 1 (ohne Einheit).

5.2.9 Glutathion Assay

5.2.9.1 Prinzip

Glutathion ist ein Tripeptid bestehend aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin. Es ist Teil des antioxidativen Schutzsystems, das Zellen vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schützt. Durch Oxidation der Cystein-Thiolgruppe (SH) kann es Elektronen auf die ROS übertragen und diese so inaktivieren. Zwei reduzierte Glutathionmoleküle (GSH) reagieren dabei unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zum oxidierten Glutathiondimer (GSSG). Die Regenerierung des GSH erfolgt durch die Glutathion-Reduktase, wobei NADPH/H⁺ als Reduktionsmittel benötigt wird. (138) An der *de-novo* Synthese des GSH sind die Glutamat-Cystein Ligase sowie die Glutathion Synthetase beteiligt, die die einzelnen Aminosäuren unter Verbrauch von ATP verknüpfen. Da die Zellmembran der Erythrozyten impermeabel für die Aminosäure Glutamat ist, müssen sie diese selbst herstellen.(139) Dafür stehen ihnen die Alanin-Aminotransferase (ALT), die Aspartat-Aminotransferase (AST) sowie die Glutamin-Aminohydrolase (GA) zur Verfügung. (140) Die Aminotransferasen benötigen dabei den Kofaktor PLP (siehe Abbildung 12).

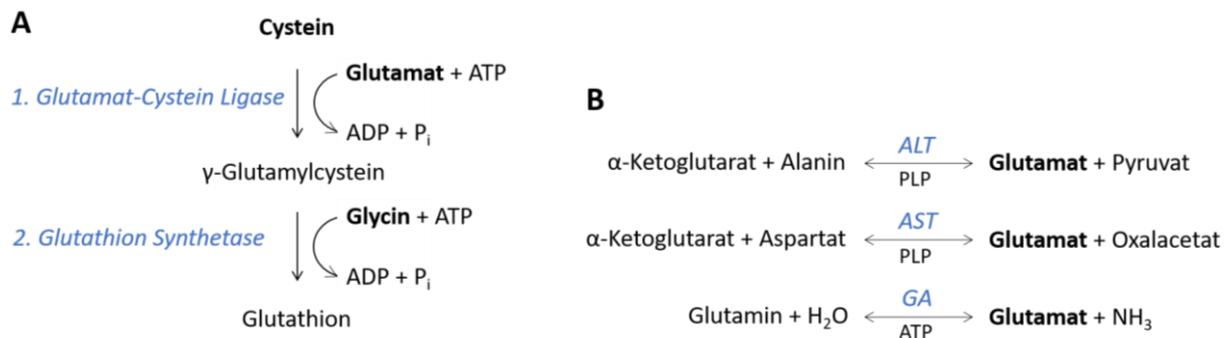


Abbildung 12: Glutathion-Synthese

(A) Darstellung der Glutathion-Synthese aus den Aminosäuren Cystein, Glutamat und Glycin. Die Synthese beinhaltet zwei ATP-abhängige enzymatisch katalysierte Reaktionen. (B) Mögliche Reaktionen zur Biosynthese von Glutamat. ALT, Alanin-Aminotransferase; AST, Aspartat-Aminotransferase; GA, Glutamin-Aminohydrolase.

Um Aufschluss über die Glutathion-Gesamtkonzentration in Erythrozyten zu erlangen, wurde ein *glutathione assay kit* verwendet. Die Quantifizierung von GSH wird unter Zuhilfenahme von Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) ermöglicht. Letzteres bindet über die Thiolgruppe an GSH, wobei Thionitrobenzoat (TNB-Anion) entsteht. Durch Einsatz der Glutathion Reduktase wird GSH regeneriert, wobei ein zweites Molekül TNB entsteht (siehe Abbildung 13). Da die TNB-Produktionsrate direkt proportional zur

GSH-Konzentration ist, kann diese über die absorptionsspektroskopische Bestimmung des Thionitrobenzoat-Anions bei 405-414 nm ermittelt werden. Durch die zur Verwendung kommende GSH Reduktase gibt der Assay Auskunft über das totale Glutathion (oxidierte sowie reduzierte Form). (141-143)

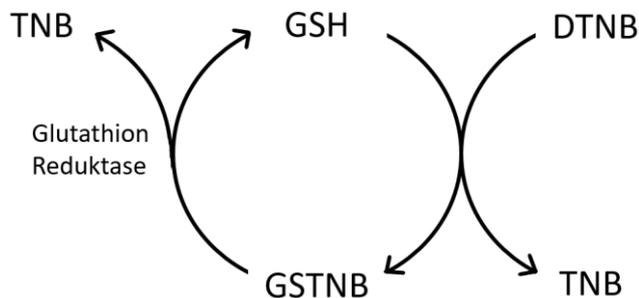


Abbildung 13: Prinzip der Quantifizierung von Glutathion (GSH) in Erythrozyten und Plasma

Aus einem GSH-Molekül entstehen zwei Moleküle TNB, das absorptionsspektroskopisch bestimmt werden kann. Der Assay gibt die totale GSH-Konzentration wieder (oxidiert und reduziert). GSTNB, an GSH gebundenes TNB. Abbildung in Anlehnung an (141).

5.2.9.2 Vorbereiten der Proben

Die Proben wurden in Anlehnung an, die von RAFTOS ET AL. beschriebene, Methode vorbereitet. (144) Das erhaltene Vollblut wurde zunächst für 20 Minuten bei 4°C mit 3850 x g zentrifugiert und anschließend das Plasma von den roten Blutzellen getrennt. Davon wurde eine Probe von 50 µl für die Bestimmung der Plasmakonzentration an GSH einbehalten. Die Erythrozyten wurden mit 1 ml der Waschlösung vermischt und für 5 Minuten bei RT mit 100 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Nach zwei Wiederholungen dieses Waschvorgangs wurden die Erythrozyten auf einen angestrebten Hämatokritwert von 10% mit Inkubationslösung resuspendiert, und eine Probe von 50 µl zur Bestimmung der GSH-Konzentration genommen. Es ist wichtig, den Proben das enthaltene Protein zu entziehen, um unerwünschte Interaktionen mit den Assay Reagenzien zu vermeiden. Es wurde nach folgendem, vom Hersteller empfohlenen, Prinzip vorgegangen. Zunächst wurde ein äquivalentes Volumen an MPA Reagenz (5 g Metaphosphat gelöst in 50 ml Wasser) zur Probe hinzugefügt, auf geringer Stufe gevortext und 5 Minuten bei RT belassen, um im Anschluss für 10 Minuten ebenfalls bei RT mit 12.000 x g zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde in ein Eppendorf Gefäß transferiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -20°C bis zum Durchführen des Assays verwahrt. (144)

5.2.9.3 Durchführung des Assays

Der Assay wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Jeanclos durchgeführt, die es freundlich genehmigt hat, diesen hier anzuführen und jeweilige Ergebnisse darzustellen. Dabei wurde entsprechend den Vorgaben und Empfehlungen des Herstellers vorgegangen. (144) Zu Beginn wurden Standards ausgehend von der mitgelieferten Lösung von 25 µM GSSG in MES-Puffer vorbereitet. Die GSSG-Endkonzentrationen sollten jeweils 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 8 µM betragen. Da schlussendlich durch die verwendete GSH Reduktase aus einem Mol GSSG zwei Mol GSH entstehen, ergibt sich aus den vorher genannten Konzentrationen jeweils der doppelte Wert für das totale GSH. Die vorübergehend verwahrten Blutproben von Wildtyp und PDXP-defizienten Mäusen wurden aufgetaut und mit 5 µl TEAM-Reagenz pro 100 µl Probenvolumen versetzt. Nun wurden jeweils 25 µl der Proben- und GSSG-Standards in die Kavitäten einer 96-Well Platte vorgelegt. Mit Hilfe einer Multipipette wurden jedem Well 75 µl des vorbereiteten Assay-Cocktails zugefügt. Dieser enthielt unter anderem DTNB, die Enzym- sowie die Kofaktormischung und setzte die Reaktionen zur GSH-Quantifizierung in Gang. Nach 25 Minuten erfolgte die spektroskopische Auswertung bei 405 nm durch einen Multiplatten Reader.

5.2.9.4 Ableitung der GSH-Konzentration

Zunächst wurden die Mittelwerte von den Absorptionswerten berechnet, von denen der Leerwert der Hintergrundmessung subtrahiert wurde. Daraus wurde eine Normkurve erstellt, indem die bekannten GSH-Konzentrationen der Standardlösungen gegen ihre Absorptionswerte aufgetragen wurden. Die GSH-Konzentration konnte daraus nach folgendem Zusammenhang ermittelt werden.

$$\text{GSH (Konzentration)} = \frac{\text{Y-Wert}}{\text{Steigung der Normgeraden}} * \text{Verdünnungsfaktor der Proben}$$

6 ERGEBNISSE

6.1 Erstellung von Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) und Pyridoxal (PL) Eichgeraden

Zunächst wurden PLP- und PL-Standards mit den Konzentrationen 50, 100, 200 und 400 nmol/L hergestellt, mit oben beschriebener Vorgehensweise aufgearbeitet (siehe Kapitel 5.2.3) und mittels HPLC analysiert. Die Messung von PLP und PL erfolgte über deren Semicarbazonderivat, das bei einer Anregung mit 380 nm Wellenlänge Strahlung im Bereich von 450 nm emittiert. Durch die Erfassung der Emissionsintensität mittels Fluoreszenzdetektor konnte ein Peak nach einer für den Analyten charakteristischen Retentionszeit abgelesen werden. Abbildung 14, (A) zeigt das zugehörige Chromatogramm der Standardproben.

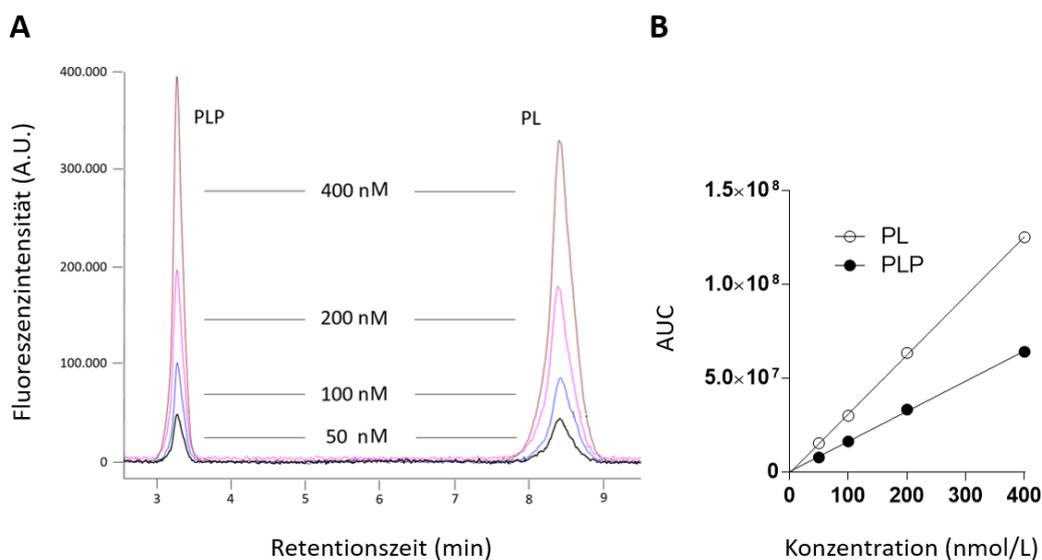


Abbildung 14: Erstellung von Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) und Pyridoxal (PL)-Eichgeraden

(A) Repräsentative Chromatogramme von PLP und PL. Die jeweils verwendeten molaren Konzentrationen sind angegeben. PLP und PL wurden nach Derivatisierung mit Semicarbazid mittels HPLC chromatographisch aufgetrennt. Für Details, siehe Material und Methoden. A.U., *arbitrary units*. Die PLP-Peaks erscheinen nach einer Retentionszeit von ca. 3,3 Minuten, die PL-Peaks jeweils nach ca. 8,4 Minuten. (B) Zugehörige Eichgeraden. Die errechnete Fläche unter den Peaks (AUC, *area under the curve*) aus (A) wurde in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt. Die Daten aus (A) und (B) zeigen die Werte aus einem Versuchsdurchlauf.

Die Retentionszeiten für PLP bzw. PL betragen jeweils 3,3 und 8,4 Minuten und beschreiben die Zeit, die der Analyt benötigt, um die Säule zu durchwandern. PL hat im Vergleich zu PLP eine längere Retentionszeit, die sich auf dessen geringere Polarität und somit stärkere Wechselwirkung mit der stationären Phase zurückführen lässt. Die einzelnen Peaks resultieren aus den verschiedenen Konzentrationen an PL(P) und unterscheiden sich in ihrer Fluoreszenzintensität. Die hier aus den vorbereiteten Standards gewonnenen Retentionszeiten von PLP und PL gewährleisten eine qualitative Analyse. So können detektierte Peaks untersuchter Proben anhand ihrer Retentionszeiten verglichen, und bei Übereinstimmung als PLP bzw. PL identifiziert werden. (122)

Neben der qualitativen Analyse dient die Bestimmung von PLP- und PL-Standardkonzentrationen vor allem quantitativen Zwecken. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Konzentration der gemessenen Substanzen. Zur Quantifizierung des Signals wurde jeweils die Fläche unter den Peaks (AUC) herangezogen und in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt (siehe Abbildung 14, B). Durch die gewonnenen Punkte wurde eine Regressionsgerade gelegt, die den Nullpunkt schneidet und sich mit einer linearen Funktion beschreiben lässt. Durch Umformen der Funktion gelingt die Transformation in eine Konzentrationseinheit. Für jeden Versuchslauf wurde entsprechend eine separate Standardkurve erstellt.

6.2 Messung der PLP-Konzentrationen in murinen Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen

Erstes Ziel der Arbeit war es, die physiologischen Konzentrationen von PLP in murinen Erythrozyten aus Wildtyp und Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase (PDXP)-defizienten Mäusen zu ermitteln und sie mit massenspektrometrischen Daten aus (47) zu vergleichen. Aus dem Vollblut der Mäuse wurden nach oben beschriebener Methode Erythrozyten isoliert, lysiert und PLP nach Derivatisierung und Deproteinisierung chromatographisch analysiert. Abbildung 15, (A) zeigt die daraus resultierenden Chromatogramme einer WT- und KO-Maus.

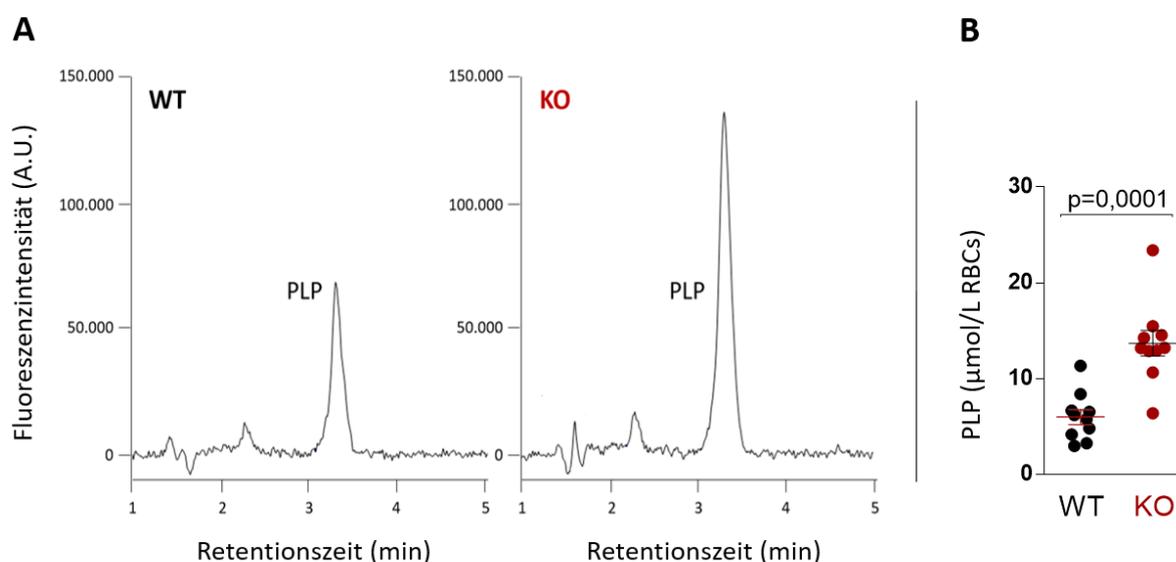


Abbildung 15: HPLC-basierter Vergleich der Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP)-Level zwischen Wildtyp (WT) und Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase (PDXP)-defizienten (KO) Mäusen.

(A) Chromatographische Analyse von PLP in isolierten Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen. Die Erythrozyten wurden lysiert, mit Semicarbazid derivatisiert und nach Deproteinisierung durch Perchlorsäure chromatographisch aufgetrennt. Der für PLP charakteristische Peak erscheint nach einer Retentionszeit von ca. 3,3 Minuten. Das Peakmuster nach einer Retentionszeit von ~1,5 Minuten geht auf die Injektion der Proben via Autosampler zurück, die nach ~2 Minuten auftretenden Peaks sind unbekannter Herkunft. A.U., *arbitrary units*. (B) Aus (A) errechnete PLP-Konzentrationen in Erythrozyten von WT und KO-Mäusen. Jeder Punkt entspricht der PLP-Konzentration in einem Tier, zusätzlich sind Mittelwerte \pm S.E.M. abgebildet. Es wurden $n=10$ männliche Mäuse pro Genotyp analysiert. Die statistische Signifikanzanalyse erfolgte mittels t-Test (*two-tailed, unpaired*). WT, *wildtype*; KO, *PDXP^{flx/flx}; Ella-Cre mice*.

Identisch zu den Standardproben (siehe Abbildung 14) zeichnete sich PLP nach einer Retentionszeit von rund 3,3 Minuten in Form eines symmetrischen einzelnen Peaks ab. Die Peakabfolge nach ~1,5 Minuten lässt sich durch Injektion der Proben mittels Autosampler erklären und findet sich in jeder Probenanalyse wieder. Das auftretende Signal nach ~2 Minuten ist unbekannter Herkunft. Bei der Gegenüberstellung der Chromatogramme fällt auf, dass das Signal für PLP im PDXP-Knockout deutlich

stärker ausfällt als im Wildtyp. Abbildung 15, (B) vergleicht die aus den Fluoreszenzsignalen ermittelten PLP-Konzentrationen in Erythrozyten aus zehn WT- mit zehn KO-Mäusen. Jeder Datenpunkt entspricht dabei der PLP-Konzentration in einem Tier, zudem sind die Mittelwerte angegeben. Im KO ergeben sich mit einem Mittel von $\sim 13,7 \mu\text{mol PLP/L RBCs}$ (*red blood cells*) deutlich höhere PLP-Konzentrationen als im Wildtyp mit $\sim 6,0 \mu\text{mol PLP/L RBCs}$. Dieser Unterschied weist statistische Signifikanz auf ($p=0,0001$). JEANCLOS ET AL. analysierten PLP-Konzentrationen in isolierten Erythrozyten aus Wildtyp und PDXP-defizienten Mäusen mittels UPLC-MS / MS (*ultra performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry*). Auch mit dieser Methode wurden mehr als doppelt so hohe PLP-Konzentrationen in RBCs aus KO-Tieren verglichen mit Wildtypen gefunden. Die PLP-Absolutwerte basierend auf der HPLC-Methodik sind allerdings rund 30% erhöht verglichen mit den UPLC-MS / MS-Analysen (WT $\sim 3,8 \mu\text{mol/L RBCs}$, KO $\sim 10,3 \mu\text{mol/L RBCs}$). (47) Hierbei sollten zusätzliche Einflussfaktoren wie das Alter der analysierten Tiere berücksichtigt werden. Das Alter der hier untersuchten Tiere betrug 2-14 Monate, wohingegen sich die UPLC-MS / MS-Analysen auf 7-8 Monate alte Mäuse bezogen. Zudem lässt die hier angewandte Derivatisierung mittels Semicarbazid eine bessere Rückgewinnungsrate von PLP vermuten (siehe Kapitel 5.2.3). Letztlich kann aus dem Vergleich der mittels HPLC und UPLC-MS / MS ermittelten PLP-Konzentrationen geschlussfolgert werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte HPLC-Analytik zuverlässige Ergebnisse liefert.

6.3 Eine Verdopplung erythrozytärer PLP-Spiegel führt nicht zu einer Erhöhung der intrazellulären Glutathion (GSH)-Konzentration

Dem Schutz vor oxidativem Stress kommt in Erythrozyten eine besondere Bedeutung zu, da Hämoglobin sehr leicht zu Methämoglobin oxidiert. Auch physiologisch findet eine ständige Oxidation des Eisenatoms im Hämoglobin zu Methämoglobin statt. Da sich daraus erhebliche funktionelle Einbußen im Hinblick auf die Sauerstoffbindung ergeben, ist es von Notwendigkeit das Hämoglobin in seinem funktionsfähigen reduzierten Zustand zu halten. Dafür stehen den Erythrozyten zum einen die Methämoglobin Reduktase, und zum anderen Glutathion (GSH) zur Verfügung. (145) Im Vergleich zu anderen Geweben besitzen die RBCs dabei eine äußerst hohe GSH-Konzentration, was den besonderen Stellenwert dieses Schutzsystems verdeutlicht.

(146) Wie bereits in Kapitel 5.2.9.1 erläutert wurde, wird zur Synthese von GSH Glutamat benötigt, welches die Zellmembran jedoch nicht passieren kann. (139) So sind die Erythrozyten darauf angewiesen, Glutamat ausgehend von α -Ketoglutarat bzw. Glutamin mit Hilfe von Aminotransferasen bzw. Aminohydrolasen selbst herzustellen. (140) Da PLP als Kofaktor für Aminotransferasen benötigt wird, ist es interessant zu beleuchten, ob die GSH-Konzentration in Erythrozyten von deren PLP-Leveln beeinflusst wird. Dazu wurde der Vergleich zwischen 12 Wildtyp- und 9 PDXP-defizienten Mäusen durchgeführt. Mit Hilfe eines *glutathione assay kits* (siehe Kapitel 5.2.9) konnte die GSH-Gesamtkonzentration in RBCs sowie im Plasma bestimmt werden. In Abbildung 16 sind die ermittelten GSH-Konzentrationen dargestellt.

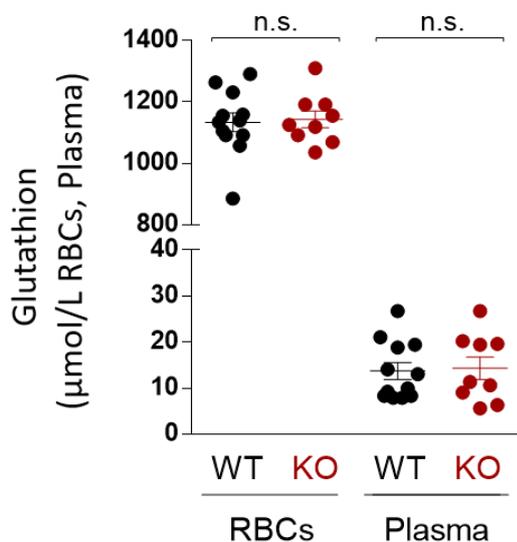


Abbildung 16: Vergleich der Glutathion-Konzentrationen in Erythrozyten und Plasma aus WT- und PDXP-KO Mäusen

Plasma und RBCs wurden durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnen. Bei der biochemischen Quantifizierung von Glutathion wird sowohl reduziertes (GSH) als auch oxidiertes (GSSG) Glutathion detektiert (siehe Material und Methoden). Die Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M.; es wurden $n=12$ männliche WT und $n=9$ männliche KO-Mäuse untersucht. Jeder Datenpunkt entspricht der GSH-Konzentration in einem Tier. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (*two-tailed, unpaired*). n.s., nicht signifikant. WT, *wildtype*; KO, *PDXP^{flx/flx}; Ella-Cre mice*, RBCs, *red blood cells*.

Diese wiesen weder in den Erythrozyten mit jeweils $\sim 1,1$ mmol GSH/L RBCs für den WT und KO, noch im Plasma Unterschiede zwischen den Genotypen auf. Der t-Test zeigte keine statistische Signifikanz. Im Plasma lagen die ermittelten GSH-Konzentrationen für den WT bei ca. $13,7$ μmol GSH/L und für den KO bei etwa $14,3$ μmol GSH/L. Die erarbeiteten Ergebnisse rechtfertigen die Aussage, dass erhöhte PLP-Level, resultierend aus einem PDXP-Knockout, keinen Einfluss auf die Glutathion-Konzentrationen in Erythrozyten oder im Plasma besitzen.

Um die hier erzielten Werte zu evaluieren, wurden einige Studien, die sich mit der Bestimmung der GSH-Konzentration in murinem Blut bzw. Plasma auseinandersetzen, zum Vergleich herangezogen. ROSSI ET AL. ermittelten chromatographisch in der Mauslinie C57BL/6J eine totale Glutathion-Konzentration von rund 11,2 μmol GSH/g Hb. (147) Mit 280 g Hb pro Liter gepackten RBCs ergibt sich daraus eine Konzentration von $\sim 3,1$ mmol GSH/L RBCs. (148) GOC ET AL. erzielten mit einer ähnlich der hier verwendeten Methode eine Glutathion-Konzentration von $\sim 1,35$ mmol GSH/L Vollblut der Mauslinie Swiss. (146) Mit einem durchschnittlichen Hämatokritwert von 45% folgen daraus ebenfalls rund 3,1 mmol GSH/L RBCs. (149) Weshalb die in der Literatur beschriebenen GSH-Werte in Erythrozyten nahezu um den Faktor 3 von denen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Werte abweichen, konnte nicht eruiert werden. Allerdings konnten HAGEN ET AL. die GSH-Plasmakonzentration in Ratten chromatographisch erfassen, die mit 13 μmol GSH/L Plasma mit der hier bestimmten Konzentration übereinstimmt.

6.4 Bestimmung der Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase (PDXP)-Aktivität in murinen Erythrozyten

Die intrazellulären PLP-Level werden sowohl von der Verfügbarkeit seiner B6-Vitamervorstufen, sowie dem Zusammenspiel aus den verschiedenen Enzymen Pyridoxal Kinase (PDXK), Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase (PDXP) und Pyridox(am)in Oxidase (PNPO) beeinflusst. Es wird angenommen, dass PDXP eine wichtige Rolle für die Regulation intrazellulärer PLP-Level spielt. (24) Nächstes Ziel der Arbeit bestand darin, die Phosphatase-Aktivität von PDXP in murinen Erythrozyten zu messen. Diese sollte anhand der Dephosphorylierung ihres Substrates PLP pro Zeiteinheit beurteilt werden.

6.4.1 Inhibition der Pyridoxal Kinase (PDXK) durch Ginkgotoxin

Da die PLP-Level aus einem Zusammenspiel der Enzyme PNPO, PDXK und PDXP resultieren (siehe Abbildung 17, A), ist es notwendig, inhibierend in das System einzugreifen, um die PDXP-abhängige Dephosphorylierung von PLP gewissermaßen isoliert beurteilen zu können. Abbildung 17, (B) illustriert den vermuteten Vitamin B6-Metabolismus muriner Erythrozyten.

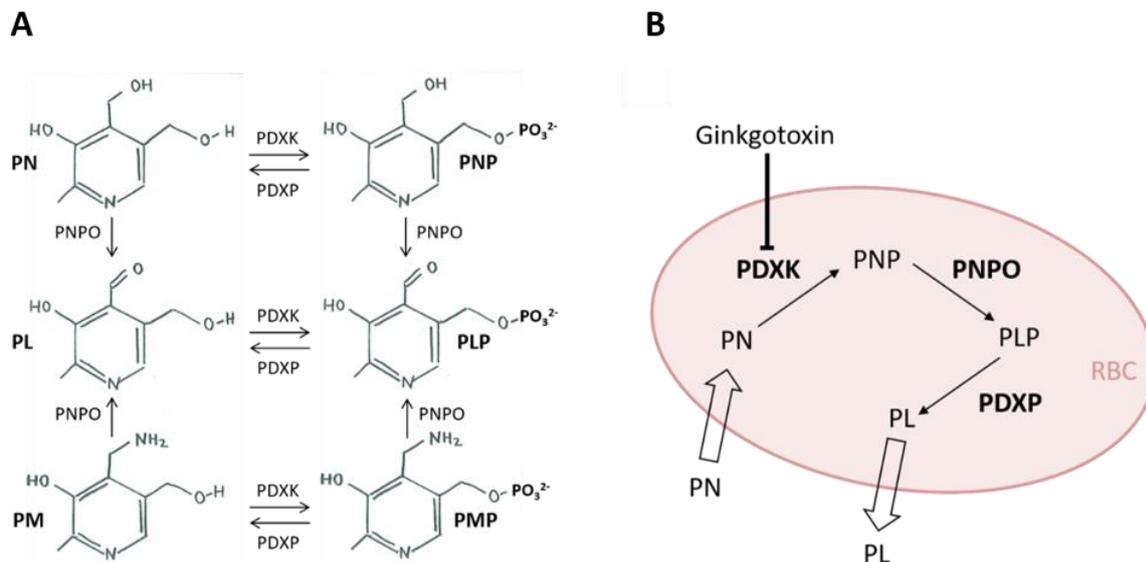


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Vitamin B6-Metabolismus in Erythrozyten

(A) Struktur der verschiedenen Vitamin B6-Formen (Vitamere) und Darstellung ihrer enzymatischen Umwandlung ineinander. PN(P), Pyridoxin (5'-Phosphat); PL(P), Pyridoxal (5'-Phosphat); PM(P), Pyridoxamin (5'-Phosphat). PDXP, Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase; PDXK, Pyridoxal Kinase; PNPO, Pyridox(am)in Oxidase. PDXK katalysiert die Phosphorylierung von PN, PL und PM in ihre entsprechenden 5'-Phosphatester PNP, PLP bzw. PMP. Diese können wiederum PDXP-abhängig dephosphoryliert werden. PNPO katalysiert die Oxidation von PN(P) und PM(P) zu PL(P). (B) Schema des angenommenen Vitamin B6-Metabolismus in Erythrozyten (RBCs). Die unphosphorylierten Vitamere werden in die Zelle aufgenommen und dort zum ko-enzymatisch aktiven PLP metabolisiert. Es wird angenommen, dass PLP PDXP-abhängig zu PL dephosphoryliert wird und in dieser Form die Zelle verlassen kann. (82)

Aufgrund der Ladung und Hydrophilie gilt PLP als impermeabel für die Zellmembran. (150) Nach der Aufnahme über die Nahrung und weiterer Verstoffwechslung (siehe Kapitel 3.4) werden die unphosphorylierten B6-Vitamere in die Zelle aufgenommen (hier am Beispiel von Pyridoxin veranschaulicht). (150, 151) Es folgt eine PDXK katalysierte Phosphorylierung zu ihren entsprechenden 5'-Phosphatestern PNP, PMP bzw. PLP. Dieser Schritt stellt einen einfachen Weg dar, die Metaboliten in der Zelle zu halten. (150, 152) Anschließend katalysiert PNPO die Oxidation von PNP und PMP zu PLP, welches in Erythrozyten PDXP-abhängig zu PL hydrolysiert werden kann. (47, 64) *In vitro* Studien zeigten, dass PL wiederum die Zelle ins Blutplasma verlassen kann. (82) Durch eine Inhibition der PDXK würde das System bereits zu Beginn unterbrochen und die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität von PDXP möglich. Als Hemmstoff der Kinase wurde Ginkgotoxin (GT) verwendet. Es ist den B6-Vitaminen strukturell sehr ähnlich und unterscheidet sich lediglich in seiner Methylgruppe von Pyridoxin (siehe Abbildung 18). Es konnte gezeigt werden, dass GT an der Pyridoxal Bindungsstelle von PDXK bindet und somit als dessen Substrat agiert. (63)

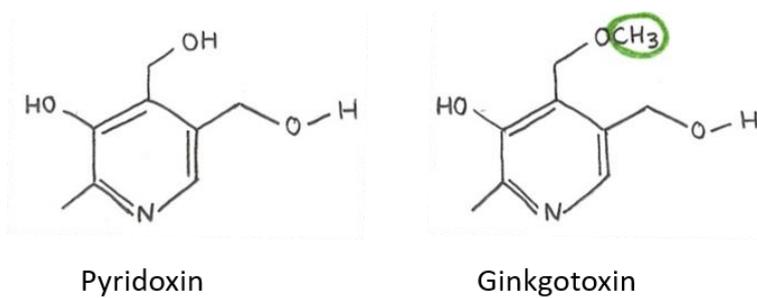


Abbildung 18: Strukturvergleich von Pyridoxin und Ginkgotoxin

Ginkgotoxin unterscheidet sich von Pyridoxin lediglich in seiner zusätzlichen Methylgruppe (grün markiert).

In kinetischen *in vitro* Studien zeigte GT gegenüber menschlicher PDXK die höchste Affinität verglichen mit den B6-Vitameren PN, PM und PL. (153) Die Auswahl einer geeigneten Konzentration für die durchgeführten Versuche orientierte sich am K_i -Wert von humaner PDXK bezogen auf GT. Mit 10 μM wurde eine rund zehnfach höhere Konzentration gewählt, um eine möglichst komplette Inhibition aus kinetischer Sicht zu erzielen. KÄSTNER ET AL. verwiesen auf unveröffentlichte Daten ihres Labors, welche keinen inhibitorischen Effekt von GT auf die Enzyme PNPO und PDXP zeigten. (153, 154)

6.4.2 Messung der basalen Phosphatase-Aktivität

Wie bereits in Kapitel 6.4.1 erwähnt soll die Phosphatase-Aktivität von PDXP anhand der Hydrolyse von PLP bei gleichzeitiger Inhibition der PDXK beurteilt werden. Isolierte Erythrozyten wurden zum Zeitpunkt $t=1$ h mit $10 \mu\text{M}$ GT inkubiert, und jeweils nach 0; 1; 1,5; 2 und 3 Stunden in den entsprechenden Messvolumina lysiert. Der Zeitpunkt der Inhibierung mittels GT bei $t=1$ h wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit darauffolgenden Versuchen gewählt, bei denen die Inkubation ebenfalls nach einer Stunde erfolgte (siehe Kapitel 6.4.3). Anschließend wurde PLP mittels Semicarbazid derivatisiert und nach Deproteinisierung durch Perchlorsäure chromatographisch analysiert. Es wurden insgesamt jeweils fünf WT- sowie fünf KO-Mäuse mit einem Alter zwischen 61-270 Tagen untersucht. Abbildung 19 zeigt repräsentative Chromatogramme einer WT- und einer KO-Maus aus dieser Versuchsreihe.

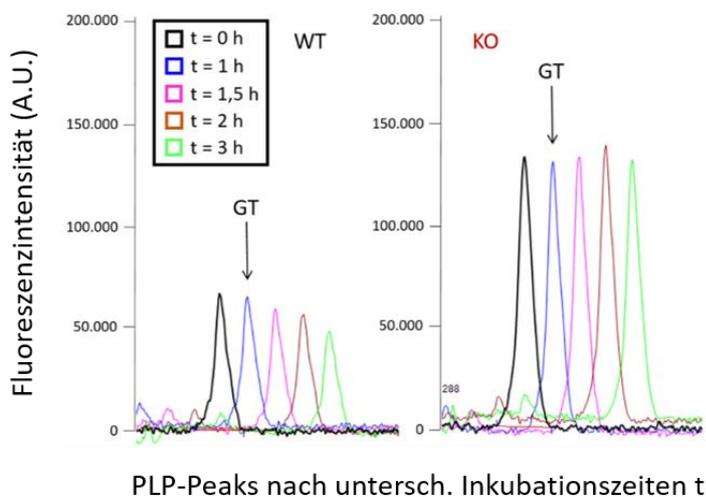


Abbildung 19: Vergleich des Zeitverlaufs erythrozytärer PLP-Intensitäten nach Inhibition der Pyridoxal (5'-Phosphat) Kinase (PDXK) in Wildtyp- und PDXP-defizienten Mäusen.

Zur Inhibition der PDXK wurden isolierte Erythrozyten zum Zeitpunkt $t=1$ h mit $10 \mu\text{M}$ Ginkgotoxin (GT) inkubiert (siehe Pfeilmarkierung). Erythrozyten wurden nach den angegebenen Inkubationszeiten lysiert, PLP wurde mit Semicarbazid derivatisiert und mittels HPLC chromatographiert. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die PLP-Peaks hier versetzt dargestellt. A.U., *arbitrary units*.

Die einzelnen Peaks traten alle nach einer für PLP charakteristischen Retentionszeit (ca. 3,3 Minuten) auf, wurden jedoch zur besseren Beurteilung der Signalintensität versetzt dargestellt. Sie beziehen sich je nach Farbcodierung auf die unterschiedlichen Inkubationszeiten der Erythrozyten (siehe Legende). Wie bereits in Kapitel 6.2 beschrieben, weist die PDXP-defiziente Maus hier ebenfalls zum Zeitpunkt $t=0$ h ein mehr als doppelt so großes Signal für PLP auf. Mit Inhibition der PDXK ab dem Zeitpunkt $t=1$ h lässt sich im WT eine Abnahme der PLP-Peaks erkennen, die über die Zeit

zunimmt. Die PLP-Peaks im KO hingegen persistieren. Abbildung 20 gibt die Ergebnisse des gesamten Versuchsaufbaus nach Umrechnung der Fluoreszenzsignale in die jeweiligen PLP-Konzentrationen der RBCs wieder. (Die Umrechnung in die Konzentration erfolgte mittels Eichgeraden, siehe Kapitel 6.1)

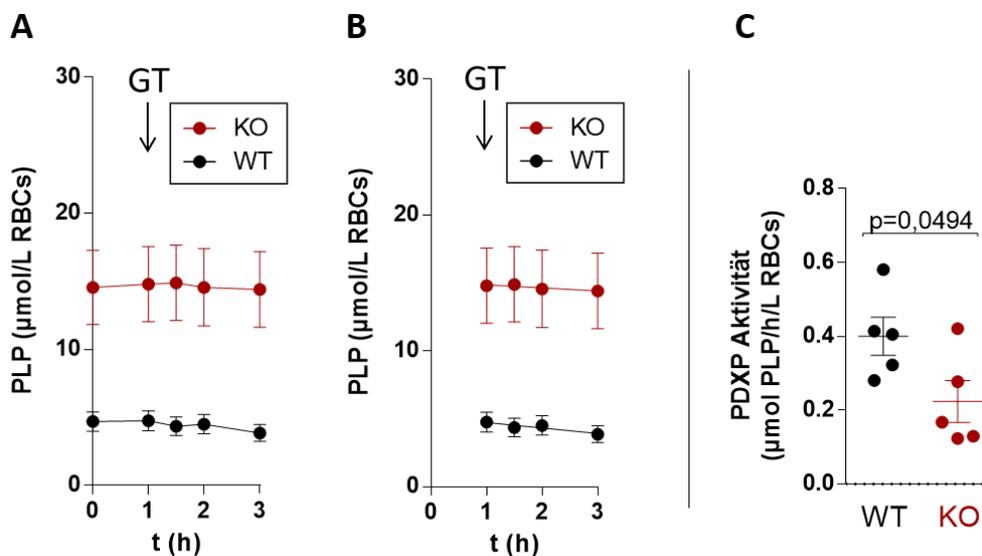


Abbildung 20: Bestimmung der PDXP-Aktivität in Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen.

(A) Darstellung der erythrozytären PLP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit nach Inhibition der PDXK mit Ginkgotoxin (GT). Der Versuch wurde wie in Abbildung 19 beschrieben durchgeführt. Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M., es wurden $n=5$ männliche Mäuse pro Genotyp analysiert. Die Pfeile markieren die Zugabe von GT ($10\mu\text{M}$) nach $t=1$ h. (B) Aus (A) ermittelte Regressionsgeraden ab $t=1$ h. (C) Darstellung der aus (B) abgeleiteten Steigungen. Die negative Steigung der Geraden entspricht unter den Versuchsbedingungen der Phosphatase-Aktivität von PDXP. Jeder Datenpunkt entspricht der PLP-Konzentration in einem Tier, zusätzlich sind die Mittelwerte \pm S.E.M. davon abgebildet. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test (two-tailed, unpaired) ermittelt.

In (A) und (B) sind die PLP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. Die Pfeile markieren den Start der Inhibition von PDXK nach einer Stunde durch Zugabe von GT ($10\mu\text{M}$). In (B) wurden mit *GraphPadPrism* lineare Regressionsgeraden durch die Datenpunkte ab $t=1$ h ermittelt. Ab dem Zeitpunkt der Inhibition lassen sich Rückschlüsse auf die Phosphatase-Aktivität von PDXP ziehen, die unter den Versuchsbedingungen der negativen Steigung der Geraden entspricht. Die so für beide Genotypen abgeleitete Phosphatase-Aktivität wurde in (C) vergleichend dargestellt. Dabei entspricht jeder Datenpunkt der PDXP-Aktivität eines Tieres. Es ergibt sich knapp ein signifikanter Unterschied ($p= 0,0494$) zwischen WT und KO. Mit einem Durchschnitt von $0,4\mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$ besitzt der WT zwar eine höhere Aktivität als der KO ($0,2\mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$), insgesamt fällt diese jedoch sehr gering aus, zumal sie sich statistisch nicht signifikant von null unterscheidet. Auf mögliche Ursachen des verzeichneten PLP-Rückgangs im Knockout, der nicht aus einer PDXP-abhängigen

Dephosphorylierung resultieren kann, wird in der Diskussion (siehe Kapitel 7.1) eingegangen.

6.4.3 Bestimmung der Phosphatase-Aktivität nach Substratzufuhr

Die oben gemessene nur marginale PDXP-Aktivität wirft die Frage auf, ob sich die Phosphatase-Aktivität von PDXP in Erythrozyten steigern lässt. Laut den Gesetzen der Michaelis-Menten-Kinetik kann dies durch Erhöhung des Substratangebots erreicht werden. (155) Eine Erhöhung der PLP-Ausgangskonzentration lässt sich über verschiedene Vorläufermoleküle erreichen.

6.4.3.1 PLP-Umsatz verschiedener B6-Vitamere

Um das geeignetste B6-Vitamer für die Aktivitätsmessung zu identifizieren, wurde in folgendem Versuchsaufbau die zeitabhängige PLP-Bildung aus den drei physiologischen Vorstufen Pyridoxin (PN), Pyridoxamin (PM) und Pyridoxal (PL) untersucht. Dazu wurden isolierte Erythrozyten aus Wildtypen in drei Aliquots aufgeteilt und zum Zeitpunkt $t=0$ h mit jeweils $2 \mu\text{mol}$ PN, PM oder PL versetzt. Sie wurden nach den angegebenen Inkubationszeiten lysiert und PLP nach Derivatisierung sowie Deproteinisierung mittels HPLC analysiert. Abbildung 21 zeigt die PLP-Konzentrationen in Erythrozyten aus drei männlichen Wildtypen resultierend aus der Inkubation mit den verschiedenen B6-Vitaminen.

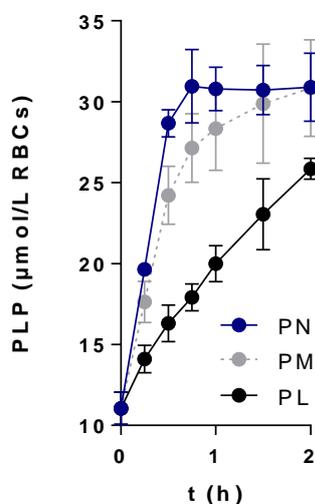


Abbildung 21: PLP-Umsatz in Erythrozyten von Wildtyp-Mäusen nach Inkubation mit Pyridoxin, Pyridoxamin oder Pyridoxal.

Erythrozyten von $n=3$ männlichen Wildtyp-Mäusen wurden isoliert, in drei Aliquots aufgeteilt und zum Zeitpunkt $t=0$ h mit jeweils $2 \mu\text{M}$ PN, PM oder PL versetzt. Nach Lyse, Derivatisierung und Deproteinisierung wurde das PLP chromatographisch analysiert und die Konzentrationen errechnet. Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. Die verschiedenen Vitamere zeigen deutliche Unterschiede in der Kinetik der PLP-Bildung. PN, Pyridoxin; PM, Pyridoxamin; PL, Pyridoxal.

Nach Inkubation der Erythrozyten mit allen drei Vitameren lässt sich ein deutlicher PLP-Anstieg erkennen, sie unterscheiden sich jedoch in der Kinetik der PLP-Bildung. Innerhalb der ersten 30 Minuten verlaufen die Kurven annähernd linear, ehe bei Pyridoxin bereits ein Plateau erreicht wird. Nach zwei Stunden haben Pyridoxin und Pyridoxamin nahezu die gleichen PLP-Konzentrationen erreicht und auch Pyridoxal lässt mit einem kontinuierlichen PLP-Anstieg einen gemeinsamen Endpunkt (außerhalb der hier gewählten Messzeiten) erahnen. Vergleicht man die Steigungen ermittelter linearer Regressionsgeraden während den ersten 30 Minuten, so lässt sich der PLP-Umsatz bewerten. PN zeigt dabei mit $35,2 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$ die schnellste PLP-Bildung, gefolgt von PM mit $26,3 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$. Erstaunlicherweise besitzt PL mit $10,5 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$ die geringste Umsetzungsrate, obwohl es im Vergleich zu PN bzw. PM zur Umwandlung in PLP einer enzymatischen Reaktion weniger bedarf. Dies lässt Unterschiede in der zellulären Aufnahme der Vitamere vermuten. Angesichts seiner effizienten Umsetzung zu PLP wurde Pyridoxin als B6-Vitamer für die folgenden Versuche ausgewählt.

6.4.3.2 Gesteigerte PDXP-Aktivität nach Substraterhöhung

Als nächstes sollte die Phosphatase-Aktivität von PDXP in Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen mit dem Prinzip der PLP-Substraterhöhung durch Pyridoxin bestimmt werden. Dazu wurden isolierte Erythrozyten zum Zeitpunkt $t=0 \text{ h}$ mit $2 \mu\text{M PN}$ inkubiert. Wie aus Kapitel 6.4.3.1 (PLP-Umsatz verschiedener B6-Vitamere) hervorgeht, ist die PLP-Bildung unter gegebenen Versuchsbedingungen durch Inkubation der Erythrozyten mit PN nach ca. einer Stunde maximal. Daher wurde der Zeitpunkt $t=1 \text{ h}$ als Inhibitionsstart der PDXK durch Zusatz von $10 \mu\text{M GT}$ gewählt. Messungen wurden über drei Stunden vorgenommen. Die RBCs wurden lysiert, und nach Derivatisierung und Deproteinisierung auf ihren PLP-Gehalt mittels HPLC fluorometrisch analysiert. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse nach Umrechnung in die entsprechenden erythrozytären PLP-Konzentrationen.

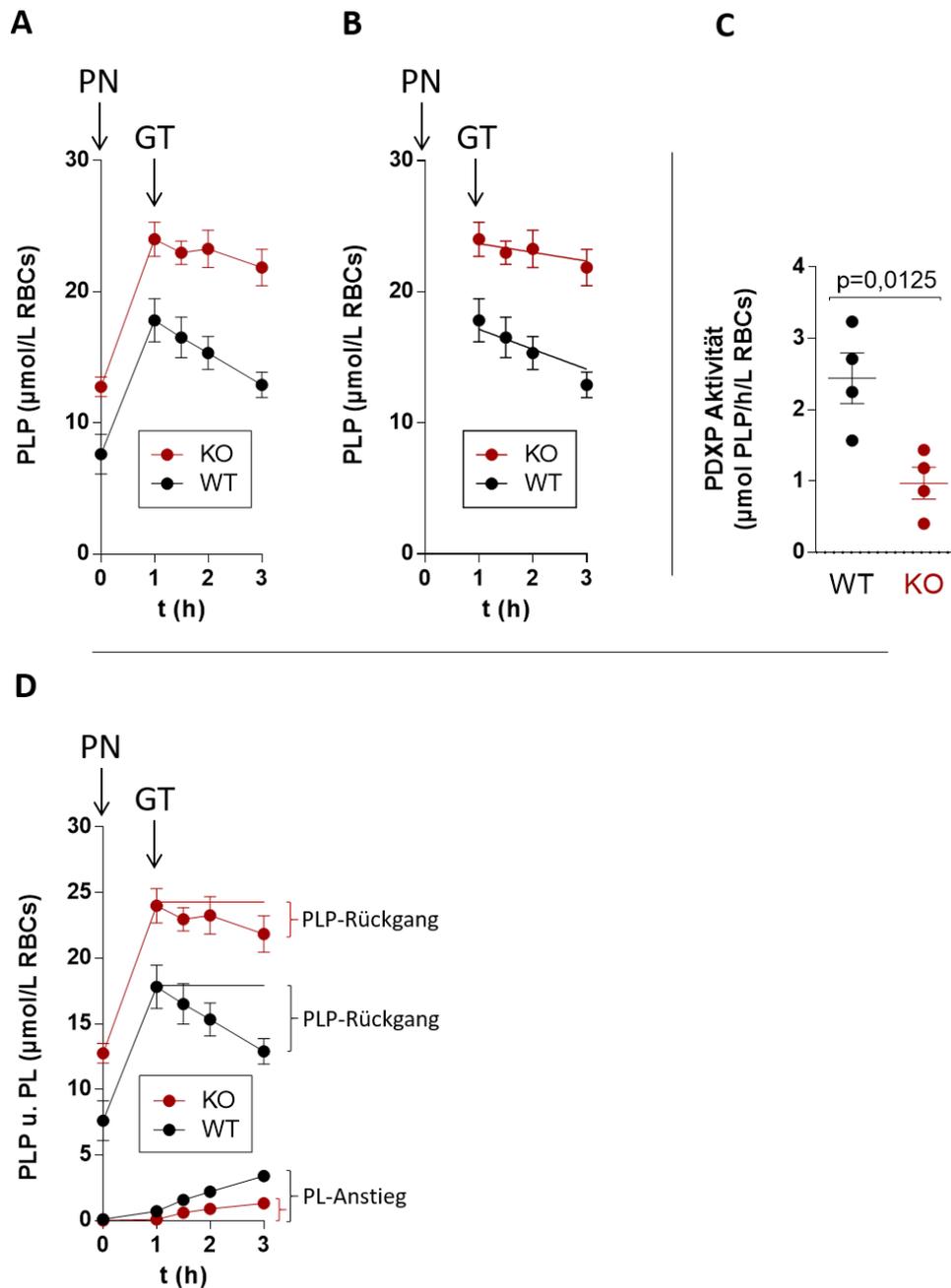


Abbildung 22: Bestimmung der PDXP-Aktivität nach Substraterhöhung in Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen (A-C). Messung des Anstiegs erythrozytärer Pyridoxal (PL)-Konzentrationen (D).

Isolierte Erythrozyten wurden zum Zeitpunkt $t=0$ h mit $2 \mu\text{M}$ Pyridoxin (PN), und zum Zeitpunkt $t=1$ h mit $10 \mu\text{M}$ Ginkgotoxin (GT) inkubiert (siehe Pfeilmarkierungen) und nach den angegebenen Inkubationszeiten lysiert. PL und PLP wurden mit Semicarbazid derivatisiert und nach Deproteinisierung chromatographisch aufgetrennt. Es wurden $n=4$ männliche Mäuse pro Genotyp analysiert. (A) Darstellung der erythrozytären PLP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit nach Inkubation mit PN sowie GT. (B) Aus (A) ermittelte Regressionsgeraden ab dem Zeitpunkt $t=1$ h. Daten aus (A) und (B) sind Mittelwerte \pm S.E.M. (C) Ableitung der negativen Steigungen der Regressionsgeraden aus (B). Die Phosphatase-Aktivität von PDXP wird unter den Versuchsbedingungen als negative Steigung definiert. Jeder Datenpunkt entspricht der PDXP-Aktivität in einem Tier, davon sind die Mittelwerte \pm S.E.M. inklusive Fehlerbalken dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (two-tailed, unpaired). (D) Zugehörige erythrozytäre PL-Konzentrationen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde das Schaubild mit den PLP-Konzentrationen aus (A) ergänzt. Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M., die Fehlerbalken der PL-Konzentrationen sind durch die Symbole verdeckt.

Es wurden jeweils vier Mäuse beider Genotypen analysiert, die sich in einer Altersspanne zwischen 223-435 Tagen befanden. (A) und (B) stellen die erythrozytären PLP-Konzentrationen zu den angegebenen Inkubationszeiten dar. Nach Zugabe von PN fand eine rasche Umsetzung in PLP innerhalb der ersten Stunde statt. Die PLP-Konzentration hat sich grob verdoppelt. Ab $t=1$ h lässt sich eine deutliche PLP-Abnahme erkennen. Mit *GraphPadPrism* wurden lineare Regressionsgeraden ermittelt (B), deren negative Steigung unter den Versuchsbedingungen der Phosphatase-Aktivität von PDXP entspricht. Die so abgeleitete Aktivität wurde in (C) für beide Genotypen graphisch dargestellt. Jeder Punkt entspricht dabei der Aktivität eines Tieres. Mit einem Durchschnitt von $2,4 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$ konnte im WT eine sechsfach gesteigerte Aktivität verglichen zur Basisaktivität (siehe Kapitel 6.4.2) gemessen werden, die sich statistisch signifikant von null unterscheidet. Zudem unterscheidet sie sich signifikant vom KO mit nur $1 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$ ($p=0,0125$). Im KO lässt sich erneut eine gewisse Tendenz der PLP-Verringerung erkennen. Diese wird unter Kapitel 7.1 näher diskutiert. Gleichzeitig wurde der zugehörige PL-Anstieg in Erythrozyten über die Zeit bestimmt, der auf den enzymatischen Abbau von PLP zurückzuführen ist (siehe Abbildung 22, D). So weist der Wildtyp nach drei Stunden eine mittlere PL-Zunahme von $3,3 \mu\text{mol PL/L RBCs}$ auf, während im KO lediglich ein Anstieg auf rund $1,3 \mu\text{mol PL/L RBCs}$ zu verzeichnen ist. Die PDXP-abhängige PL-Zunahme und der PLP-Abbau lassen sich als Differenz der Messpunkte $t=1$ h und $t=3$ h ermitteln. Der PLP-Abbau nach $t=3$ h scheint dabei in beiden Genotypen (WT $\sim 4,9$; KO $\sim 2,2$ in $\mu\text{mol PLP/L RBCs}$) geringfügig höher zu sein als die entsprechende PL-Produktion (WT $\sim 3,3$; KO $\sim 1,3$ in $\mu\text{mol PLP/L RBCs}$). Diese Diskrepanz an Pyridoxal könnte durch den Transport von PL in das Plasma zustande kommen. (82)

Die gemessene Phosphatase-Aktivität von PDXP in Erythrozyten ließ sich also durch PLP-Substraterhöhung auf ein Vielfaches steigern. Aus den Ergebnissen dieser und vorheriger Versuchsreihe (zur Messung der basalen PDXP-Aktivität, siehe Kapitel 6.4.2) lässt sich schlussfolgern, dass PDXP nur in Anwesenheit von B6-Vitaminen aktiv ist, was physiologisch dem Zustand nach Nahrungsaufnahme entspräche.

6.4.4 Messung der PDXP-Aktivität gegen „freies“ PLP

PLP ist ein sehr reaktionsfreudiger Aldehyd, der über die Ausbildung einer Schiff-Base an umliegende Nucleophile binden kann. (65) In Erythrozyten liegt es weitgehend gebunden an Hämoglobin vor. (23, 76) Der Anteil an freiem reaktivem PLP ist möglicherweise gering, da so unspezifische Reaktionen mit zellulären Nucleophilen vermieden werden. (47) Aus sterischen Gründen (Zugang zum katalytischen Zentrum, siehe Kapitel 3.2) ist die PLP-Hydrolyse durch PDXP jedoch nur möglich, wenn PLP „frei“, d.h. nicht an Proteine oder andere Nucleophile gebunden vorliegt. Es liegt nahe, dass in Zellen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der gebundenen und der freien Form von PLP herrscht. Um die PDXP-Aktivität gegen „freies“ PLP zu messen, wurden analog den vorherigen Versuchen isolierte Erythrozyten nach bestimmten Inkubationszeiten mit PN (2 μM) und GT (10 μM) lysiert, freies PLP mit Semicarbazid derivatisiert und chromatographisch mittels HPLC analysiert. Zur Differenzierung zwischen freiem und gebundenem PLP wurden die Erythrozytenlysate durch Filter mit einem Molekulargewichtsausschluss von 3 kDa zentrifugiert (MWCO, 3000) und lediglich das freie PLP im Überstand wurde für die Messungen herangezogen. „Freies“ PLP meint dabei nicht zwingend ungebundenes, sondern jegliches PLP, das (bedingt durch den Filtrationsvorgang) in Komplexen von weniger als 3 kDa vorliegt, also z.B. an die Aminosäure Lysin gebundenes PLP. Abbildung 23 stellt die aus diesem Versuch erlangten Daten graphisch dar. Es wurden jeweils 4 WT- und KO-Mäuse untersucht. Zum Zeitpunkt $t=0$ h wurden 2 μM PN und zum Zeitpunkt $t=1$ h 10 μM GT zugesetzt, die Messungen starteten nach einer Stunde.

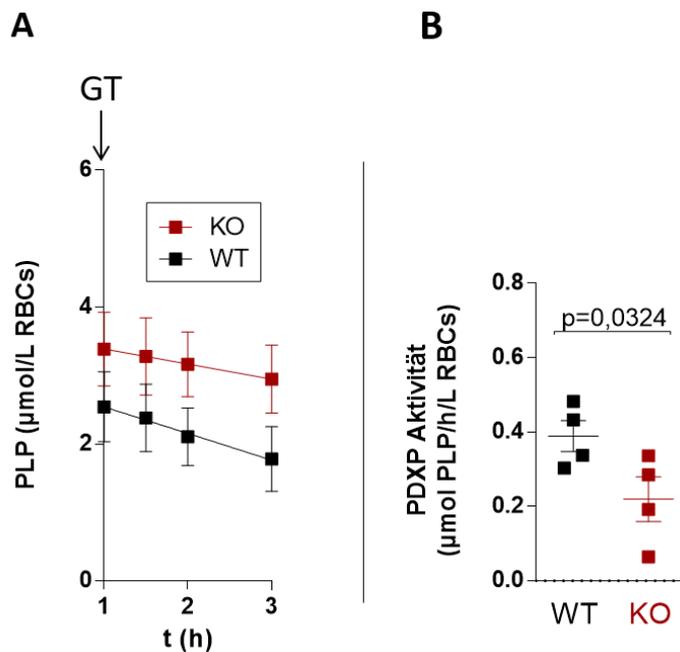


Abbildung 23: Bestimmung der PDXP-Aktivität gegen „freies“ PLP in Erythrozyten aus WT- und PDXP KO-Mäusen.

(A) Darstellung erythrozytärer Konzentrationen an freiem PLP in Abhängigkeit von der Zeit nach Inkubation mit Pyridoxin (PN) sowie Ginkgotoxin (GT). Freies PLP ist hier definiert als PLP, das frei oder gebunden in Komplexen < 3 kDa vorliegt. Isolierte Erythrozyten wurden zum Zeitpunkt $t=0$ h mit $2 \mu\text{M}$ PN (hier nicht dargestellt) sowie zum Zeitpunkt $t=1$ h mit $10 \mu\text{M}$ GT versetzt, nach den angegebenen Inkubationszeiten lysiert und durch Filter mit einem MWCO von 3 kDa zentrifugiert. PLP im Filtrat wurde mittels Semicarbazid derivatisiert und nach Deproteinisierung chromatographiert. Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M., es wurden $n=4$ männliche Mäuse pro Genotyp analysiert. Abgebildet sind die ermittelten Regressionsgeraden ab dem Zeitpunkt $t=1$ h. (B) Darstellung der aus (A) abgeleiteten jeweiligen negativen Steigung. Diese wird unter den Versuchsbedingungen als Phosphatase-Aktivität definiert. Jeder Datenpunkt entspricht der Aktivität in einem Tier, davon sind die Mittelwerte \pm S.E.M. inklusive Fehlerbalken dargestellt. Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test ermittelt (two-tailed, unpaired).

Abbildung 23, (A) stellt die erythrozytären PLP-Konzentrationen im Filtrat in Abhängigkeit von der Zeit dar. Der KO weist dabei mit $\sim 3,4 \mu\text{M/L RBCs}$ einen höheren Anteil an freiem PLP auf als der Wildtyp mit nur $\sim 2,5 \mu\text{M/L RBCs}$. In beiden Genotypen lässt sich eine Verringerung des freien PLPs erkennen, ohne gänzlich auf null zu sinken. Abbildung 23, (B) veranschaulicht die aus (A) abgeleitete Phosphatase-Aktivität, die als negative Steigung ermittelter Regressionsgeraden definiert wurde. Die PDXP-Aktivität im WT unterscheidet sich mit etwa $0,4 \mu\text{mol freies PLP/h/L RBCs}$ signifikant vom KO mit ca. $0,2 \mu\text{mol freies PLP/h/L RBCs}$. Insgesamt fällt die Phosphatase-Aktivität in beiden Genotypen geringer aus als jene abgeleitet vom totalen PLP (siehe Kapitel 6.4.3). Auch die ermittelten Steigungen unterscheiden sich statistisch nicht signifikant von null.

Um zu klären, ob es unter den Versuchsbedingungen prinzipiell möglich ist, PLP über den bisher gemessenen Anteil hinaus zu dephosphorylieren, wurde den Erythrozytenlysaten für den nachfolgenden Versuch aufgereinigtes PDXP zugesetzt. Murine Erythrozyten wurden isoliert, mit PN und GT inkubiert, nach $t=1$ h lysiert und anschließend durch Filter mit einem MWCO von 3 kDa zentrifugiert. Das Volumen des Filterrückstandes wurde auf das ursprüngliche Ausgangsvolumen vor der Zentrifugation aufgefüllt. Nun wurde dem Filtrat sowie dem Filtrerrückstand aufgereinigtes PDXP ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugesetzt. Proben ohne Zusatz von exogenem PDXP dienten als Kontrollen. Im Anschluss wurde das PLP der Proben derivatisiert und nach Deproteinisierung mittels HPLC chromatographisch aufgetrennt. Filtriertes PLP wurde als „Freies“ PLP, das im Filtrerrückstand befindliche PLP als „Gebundenes“ PLP definiert.

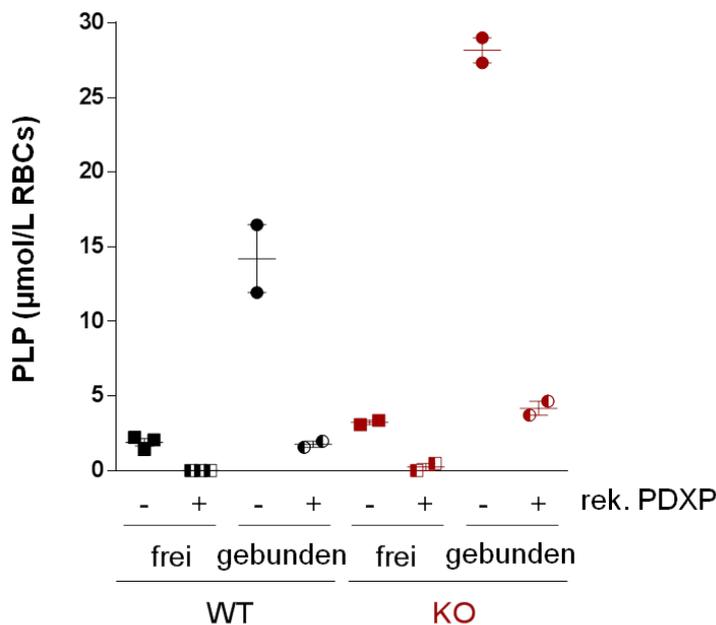


Abbildung 24: Dephosphorylierung von freiem sowie gebundenem PLP durch Zusatz von exogenem PDXP.

Isolierte Erythrozyten wurden zum Zeitpunkt $t=0$ h mit $2 \mu\text{M}$ Pyridoxin (PN) und zum Zeitpunkt $t=1$ h mit $10 \mu\text{M}$ Ginkgotoxin (GT) inkubiert. Die Lysate wurden durch Filter mit einem MWCO von 3 kDa zentrifugiert. Nach Auffüllen des Filtrerrückstandes auf das entsprechende Ausgangsvolumen (vor der Filtration) wurde einem Aliquot des Überstands bzw. des Filtrats aufgereinigtes, rekombinantes PDXP in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ zugefügt (-/+ rek. PDXP). Anschließend wurde das enthaltene PLP mittels Semicarbazid derivatisiert und nach Deproteinisierung chromatographiert. Es wurden $n=2$ männliche Mäuse pro Genotyp analysiert, ausgenommen freies PLP im WT mit $n=3$. Jeder Datenpunkt entspricht der PLP-Konzentration in einem Tier. Zusätzlich sind die Mittelwerte \pm S.E.M inklusive Fehlerbalken angegeben. +, mit; -, ohne Zusatz von rekombinantem (rek.) PDXP. Frei, PLP im Filtrat; gebunden, PLP im Filtrerrückstand.

Abbildung 24 zeigt die Konzentrationen des freien sowie gebundenen PLPs in Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen unter Zusatz von exogenem PDXP. Jeweils zwei Mäuse beider Genotypen wurden analysiert. Der Zusatz von aufgereinigtem, rekombi-

nantem PDXP konnte sowohl die Konzentrationen des freien als auch des gebundenen PLPs zu einem deutlich höheren Ausmaß reduzieren, als es aus den Messungen zur Phosphatase-Aktivität in den nicht-fraktionierten Lysaten hervorging. Das freie PLP wurde annähernd komplett umgesetzt. Dies liegt sicherlich begründet in der weitaus höheren Konzentration des exogen zugesetzten PDXPs im Vergleich zur physiologischen PDXP-Konzentration in den Erythrozyten. Die Tatsache, dass exogenes PDXP auch das PLP im Filtrationsrückstand dephosphorylieren konnte (welches also in Komplexen >3 kDa vorliegt), spricht für die Existenz eines dynamischen Gleichgewichts, das intrazellulär zwischen der freien und der gebundenen Form von PLP herrscht.

6.5 Die PDXP-abhängige Dephosphorylierung von PLP ist in Erythrozyten aus gefasteten Mäusen nicht erhöht

Die Erhöhung der PLP-Konzentration in Gehirn, Skelettmuskel und Erythrozyten von PDXP KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen deutet auf eine Funktion der PDXP für die Kontrolle intrazellulärer PLP-Spiegel hin. (47) Mit der Nahrung zugeführtes PN und PL werden von Erythrozyten aufgenommen und, wie bereits in Abbildung 17 dargestellt, durch Zusammenwirken der PDXK und PNPO in PLP transformiert. Es wird angenommen, dass PLP durch PDXP-abhängige Dephosphorylierung z.B. in Erythrozyten als PL ans Plasma abgegeben wird. So könnten Erythrozyten eine Art Liefersystem für PL an umliegende Gewebe darstellen, die mit Hilfe der Kinase daraus wiederum PLP gewinnen können. (82) In der Tat ist PDXK in vielen unterschiedlichen Geweben lokalisiert. (156) Es ist allerdings unbekannt, ob die PDXP-vermittelte Dephosphorylierung zu PL tatsächlich mit der Freisetzung von PL aus Erythrozyten korreliert, und ob PDXP in Zeiten mangelnden Vitamin B6-Angebots (wie zum Beispiel beim Fasten) eine Rolle für die Bereitstellung von intrazellulärem PL an umliegende Gewebe spielt. Diese Hypothese steht zudem im Widerspruch zu vorangegangenen Ergebnissen, die eine substanzielle PDXP-Aktivität nur bei Vitamin B6-Zufuhr zeigten, was physiologisch der Nahrungsaufnahme entspräche.

Um die Frage zu klären, wurde folgendes Versuchsmodell generiert. In WT- und KO-Mäusen wurde zunächst ein B6-Vitamer Mangel geschaffen, indem die Tiere vor Versuchsbeginn gefastet wurden. Die gefasteten Mäuse sollten auf ihre PLP- bzw. PL-Konzentrationen in RBCs sowie Plasma hin analysiert, und mit normal gefütterten Kontrollen verglichen werden. Plasma und Erythrozyten wurden jeweils durch Zentri-

fugation (4°C, 500 x g, 10 min) aus Vollblut gewonnen. PLP und PL wurden mit Semicarbazid derivatisiert und nach Deproteinisierung mittels HPLC fluorometrisch analysiert. Es wurden jeweils die PLP-Konzentrationen in RBCs, im Plasma sowie die PL-Konzentrationen im Plasma bestimmt (siehe Abbildung 25).

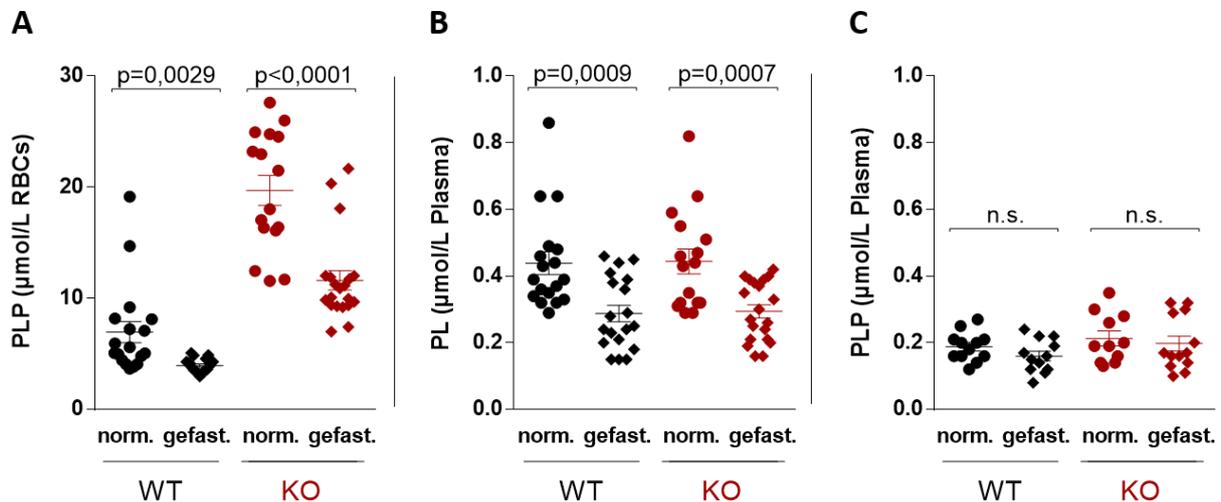


Abbildung 25: Vergleich der PLP- bzw. PL-Konzentrationen in Erythrozyten bzw. Plasma von gefasteten mit normal gefütterten WT- und KO-Mäusen.

Erythrozyten und Plasma wurde durch Zentrifugation aus Vollblut von WT- und KO-Mäusen gewonnen. Jeder Datenpunkt entspricht jeweils einem Tier, zusätzlich sind die Mittelwerte \pm S.E.M. und Fehlerbalken abgebildet. Es wurden $n=37$ männliche WT- und $n=36$ männliche KO-Mäuse untersucht, davon Aufteilung in die Gruppen „normal gefüttert“ und „gefastet“. WT zu $n=18$ normal gefütterten und $n=19$ gefasteten Tieren; KO zu $n=16$ normal gefütterten und $n=20$ gefasteten Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (*two-tailed, unpaired*). n.s., nicht signifikant. (A) Darstellung erythrozytärer PLP-Konzentrationen aus gefasteten WT- und KO-Tieren verglichen mit normal gefütterten Kontrollen. (B) und (C) Vergleich der ermittelten PL- bzw. PLP-Konzentrationen im Plasma gefasteter WT- und KO-Mäuse mit normal gefütterten Kontrollen. norm., normal gefüttert; gefast., gefastete Mäuse.

Abbildung 25, (A) stellt den Vergleich erythrozytärer PLP-Konzentrationen gefasteter Mäuse mit ihren normal gefütterten Kontrollen dar. Dabei zeigten die gefasteten Mausmodelle beider Genotypen jeweils signifikant geringere PLP-Konzentrationen verglichen mit deren Kontrollen. So verringerten sich die erythrozytären PLP-Konzentrationen im WT von rund 7 $\mu\text{mol/L}$ RBCs auf etwa 4 $\mu\text{mol/L}$ RBCs unter Fastenbedingungen, und im KO von rund 19,7 $\mu\text{mol/L}$ RBCs auf etwa 11,6 $\mu\text{mol/L}$ RBCs. Dies entspricht einer PLP-Reduktion von $>40\%$. Die ermittelten absoluten PLP-Konzentrationen der Kontrollmäuse mit unbeschränktem Zugang zu Futter fielen in beiden Genotypen im Schnitt etwas höher aus verglichen mit den Messungen aus vorherigen Versuchen, in denen die Erythrozyten durch Filtration mit Zellulose gewonnen wurden (siehe entsprechende Werte aus Kapitel 6.2, $\sim 6,0$ $\mu\text{mol/L}$ RBCs im WT und $\sim 13,7$ $\mu\text{mol/L}$ RBCs im KO). Die Abweichungen erscheinen jedoch akzeptabel. In Abbildung 25, (B) ist der entsprechende Vergleich der PL-Plasmakonzentrationen von

gefasteten Mäusen mit ihren Kontrollen gezeigt. Dabei wiesen die gefasteten Mäuse beider Genotypen mit rund 0,3 $\mu\text{mol PL/L}$ Plasma signifikant geringere PL-Konzentrationen auf als deren Kontrollen mit rund 0,4 $\mu\text{mol PL/L}$ Plasma. Im Gegensatz dazu zeigten die PLP-Konzentrationen im Plasma (C) keine signifikanten Unterschiede zwischen den gefasteten Mäusen und ihren Kontrollen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die PLP-Level sowohl im WT als auch im KO während Fastenzeiten deutlich verringert sind verglichen mit ihren normal gefütterten Kontrollen. Die PLP-Level sind auch in PDXP-defizienten gefasteten Mäusen deutlich reduziert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die PDXP-katalysierte PLP-Dephosphorylierung in Zeiten unzureichender Nahrungszufuhr (wie zum Beispiel beim Fasten) keine Rolle für die Mobilisierung intrazellulärem PLPs in Form von PL spielt. Die PDXP-unabhängige Verringerung der PLP-Konzentrationen (~40%) wirft die Frage auf, auf welchem Weg PLP die Zelle verlässt.

6.6 PDXP-vermittelte Konversion von PN zu PL

Zur Transformation der B6-Vitamervorstufen in den aktiven Kofaktor PLP bedarf es mehreren enzymatischen Schritten (siehe Abbildung 17). Ausgehend von einer vegetarischen Ernährung, die in erster Linie Pyridoxin (5'-Phosphat) enthält, wird PN zunächst PDXK-abhängig phosphoryliert und anschließend PNPO-vermittelt zu PLP oxidiert. (63, 82) Doch nicht jede Zelle ist in gleichem Maße mit den dafür relevanten Enzymen ausgestattet. Während für die Pyridoxal (5'-Phosphat) Kinase eine nahezu ubiquitäre Expression beschrieben wird, variiert die Expression der Pyridoxal (5'-Phosphat) Oxidase in unterschiedlichen Geweben stark. (74, 156, 157) KANG ET AL. untersuchten die PNPO-Expression verschiedener Organe / Zellen und stellten diese in Relation zueinander. Dabei zeigten unter anderem die Leukozyten des peripheren Blutes die geringste bis nahezu keine Expression der PNPO. (158) Da diese Zellen kaum oder kein PNPO exprimieren, sind sie nicht in der Lage PLP ausgehend von PN herzustellen. Somit wären sie auf die Versorgung mit PL durch andere Zellen / Organe angewiesen, um den aktiven Kofaktor PLP zu bilden. Da die Erythrozyten über alle drei relevanten Enzyme PDXK, PNPO sowie PDXP verfügen, stellt sich die Frage, ob die Phosphatase PDXP für die erythrozytäre Konversion von PN in PL notwendig ist.

Um dies zu überprüfen, wurden isolierte Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen mit PN (2 μM) versetzt und ohne in das System inhibierend einzugreifen nach verschie-

denen Inkubationszeiten lysiert. Nach Derivatisierung und Deproteinisierung wurden die Erythrozytenlysate anschließend auf ihre PLP- sowie PL-Bildung hin analysiert. Abbildung 26 stellt die Ergebnisse dar.

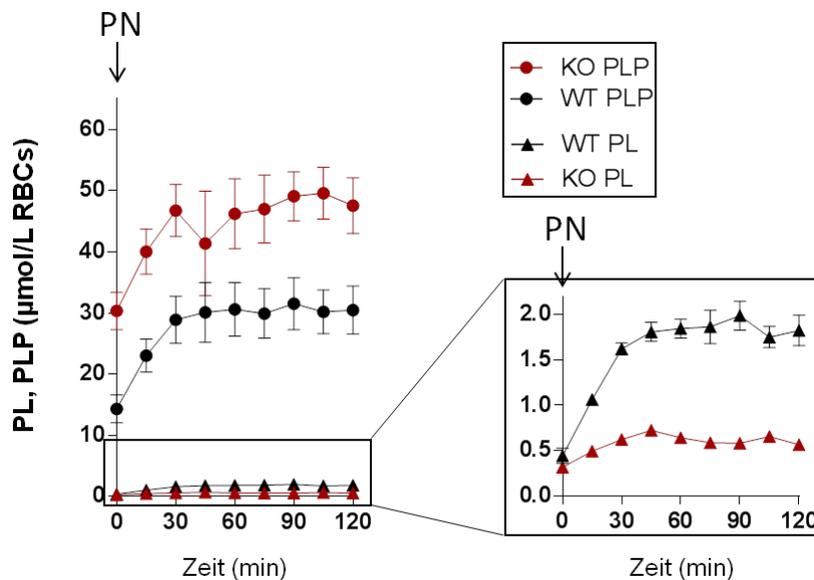


Abbildung 26: Vergleich der PL- bzw. PLP-Bildung in isolierten Erythrozyten aus WT- und PDXP KO-Mäusen

Darstellung erythrozytärer PL- und PLP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit nach Inkubation mit Pyridoxin. Isolierte Erythrozyten wurden zum Zeitpunkt $t=0$ h mit $2 \mu\text{M}$ PN inkubiert und nach den angegebenen Inkubationszeiten lysiert. PL und PLP aus den Erythrozytenlysaten wurden derivatisiert, deproteinisiert und anschließend mittels HPLC analysiert. Die Skalierung der Y-Achse wurde in einem zusätzlichen Bild (rechts) entsprechend den Werten der PL-Konzentrationen angepasst. Es wurden $n=3$ männliche Mäuse pro Genotyp untersucht. Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. Trotz angepasster Skalierung im rechten Bild werden die Fehlerbalken der PL-Konzentrationen aus den KO-Mäusen aufgrund ihrer geringen Streuung nicht angezeigt.

Die erythrozytären PLP- und PL-Konzentrationen sind zu den verschiedenen Inkubationszeiten dargestellt. Nach PN-Zugabe kam es in beiden Genotypen rasch zu einem PLP-Anstieg. Ähnlich dem Versuch aus Kapitel 6.4.3.1 (PLP-Umsatz verschiedener B6-Vitamere) erreichte die PLP-Konzentration nach bereits ~ 30 Minuten ein Plateau. Dabei wiesen die Erythrozyten der KO-Mäuse knapp doppelt so hohe PLP-Level im Vergleich zu den Wildtypen auf. Obwohl die absolute PL-Formation neben der PLP-Bildung eher gering erscheint, ergibt sich in der PL-Bildung zwischen den Genotypen ein entscheidender Unterschied. Zur besseren Beurteilung wurde im rechten Bild die Skalierung der Y-Achse entsprechend den PL-Konzentrationen gewählt. In beiden Genotypen kam es zunächst zu einem PL-Anstieg nach Inkubation mit PN, ehe die PL-Konzentration nach ebenfalls rund 30 Minuten ein Plateau erreichte. Dabei kam es in den Wildtyp-Mäusen mit rund $2 \mu\text{mol PL/L RBCs}$ zu einer vierfach höheren PL-Produktion als in den PDXP-defizienten Mäusen mit lediglich $0,5 \mu\text{mol PL/L RBCs}$.

Setzt man die PL-Produktion in Relation zur PLP-Formation, so wurden im Wildtyp ca. 10% des neu gebildeten PLPs PDXP-abhängig zu PL dephosphoryliert. Der Versuch gibt zugleich Auskunft über die Phosphatase-Aktivität von PDXP, die sich anhand der Zunahme ihres Substrates PL pro Zeiteinheit beurteilen lässt. Ermittelt man eine lineare Regressionsgerade durch die Datenpunkte bis zum Erreichen des Plateaus der PL-Konzentrationen ($t=30$ min), so entspricht deren Steigung der Phosphatase-Aktivität von PDXP. So ergab sich für den Wildtyp eine Aktivität von rund $2,4 \mu\text{mol PL/h/L RBCs}$, identisch zu der bereits abgeleiteten Phosphatase-Aktivität in Kapitel 6.4.3 (Bestimmung der Phosphatase-Aktivität nach Substratzufuhr). Dies bestätigt die Zuverlässigkeit der hier angewandten Methoden.

Zudem sollte die PL-Produktion in murinem Vollblut (physiologisches Milieu) bestimmt werden. Dazu wurde Vollblut aus jeweils drei WT- und drei KO-Mäusen mit genau der Menge an Pyridoxin versetzt, aus der eine äquivalente Konzentration an PN pro Liter RBCs resultiert, identisch derer unter den Versuchsbedingungen mit isolierten Erythrozyten. Übriger Versuchsaufbau erfolgte analog zu vorherigem. Abbildung 27 stellt die entsprechenden Ergebnisse dar.

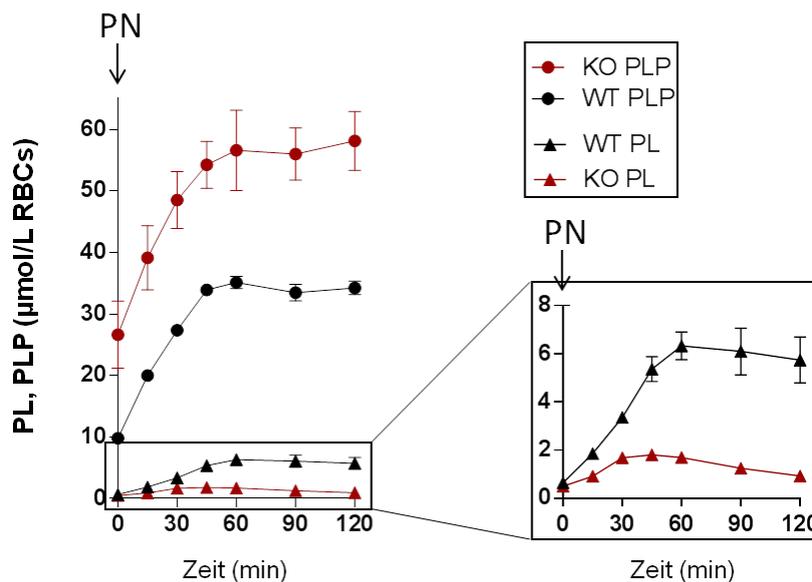


Abbildung 27: Vergleich der PL- bzw. PLP-Bildung in Vollblut aus Wildtyp- und PDXP-defizienten Mäusen

Darstellung der PL- bzw. PLP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit nach Zusatz von PN in Vollblut aus WT- und KO-Mäusen. Für den Versuch wurde Vollblut aus Wildtyp- und PDXP-defizienten Mäusen herangezogen. Der restliche Versuchsaufbau erfolgte analog vorherigem (siehe Abbildung 26). Es wurden $n=3$ männliche Mäuse pro Genotyp analysiert. Zur besseren Beurteilung wurde die Skalierung der Y-Achse im rechten Bild entsprechend den PL-Konzentrationen angepasst. Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. Trotz angepasster Skalierung (rechts) werden die Fehlerbalken der PL-Konzentrationen aus den KO-Mäusen aufgrund ihrer geringen Streuung nicht angezeigt.

Die PL bzw. PLP-Konzentrationen sind zu den verschiedenen Inkubationszeiten dargestellt. Ähnlich vorherigem Versuch (siehe Abbildung 26) ließ sich nach Zugabe von PN in beiden Genotypen ein deutlicher PLP-Anstieg erkennen. Hierbei erreichten die PLP-Konzentrationen nach rund 60 Minuten ein Plateau. In den KO-Mäusen ergaben sich annähernd doppelt so hohe PLP-Level verglichen mit den WT-Mäusen. Die PL-Produktion zeigte erneut deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen. Die absoluten PL-Konzentrationen überstiegen dabei jene, die aus vorherigen Versuchen mit isolierten Erythrozyten hervorgingen. Der Wildtyp wies mit $\sim 6 \mu\text{mol PL/L RBCs}$ erneut eine rund vierfach höhere PL-Produktion auf als der Knockout mit $\sim 1,5 \mu\text{mol PL/L RBCs}$. Bestimmt man die Phosphatase-Aktivität von PDXP, die als Steigung der Regressionsgeraden bis zum Erreichen des Plateaus der PL-Konzentrationen (hier nach ca. 60 Minuten) definiert werden kann, so ergibt sich für den Wildtyp eine Aktivität von etwa $5,5 \mu\text{mol PL/h/L RBCs}$. Die Phosphatase-Aktivität von PDXP ist somit im physiologischen Milieu (Vollblut) mehr als doppelt so groß als in isolierten Erythrozyten. So wurden nach PN-Zufuhr im Vollblut aus Wildtyp-Mäusen sogar etwa 25% des neu gebildeten PLPs zu PL hydrolysiert. Mögliche Erklärungsansätze für die erhöhte PDXP-Aktivität im Vollblut verglichen mit der aus isolierten Erythrozyten werden an anderer Stelle diskutiert (siehe Kapitel 7.4).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen deutlich, dass sowohl in isolierten Erythrozyten als auch in murinem Vollblut lediglich der Wildtyp zur PL-Produktion ausgehend von einer PN-Zugabe befähigt ist. Die Phosphatase PDXP ist somit essenziell für die intrazelluläre Konversion von Pyridoxin zu Pyridoxal.

6.7 Auswirkungen des Alters auf den Vitamin B6-Metabolismus muriner Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen

Es fielen bereits mehrmals gewisse Schwankungen der ermittelten PLP-Konzentrationen aus Tieren desselben Genotyps auf. Sogar innerhalb eines Versuchsaufbaus ließen sich Abweichungen in den gemessenen PLP-Leveln der Tiere feststellen. Äußere Einflüsse resultierend aus dem Zeitpunkt der Blutentnahme sowie aus der Tierhaltung (Fütterung, Tag- und Nachtrhythmus) konnten nahezu ausgeschlossen werden, da diese fortwährend gleich gehandhabt wurden. So rückte das Alter der Tiere als mögliche Ursache variierender erythrozytärer PLP-Konzentrationen in den Fokus.

6.7.1 Rückgang erythrozytärer PLP-Level mit zunehmendem Alter

Um zu untersuchen, inwieweit sich das Alter eines Tieres auf dessen erythrozytäre PLP-Konzentration auswirkt, wurden alle bisher chromatographisch ermittelten PLP-Konzentrationen abhängig vom jeweiligen Alter der Maus in einem Diagramm dargestellt (siehe Abbildung 28, A).

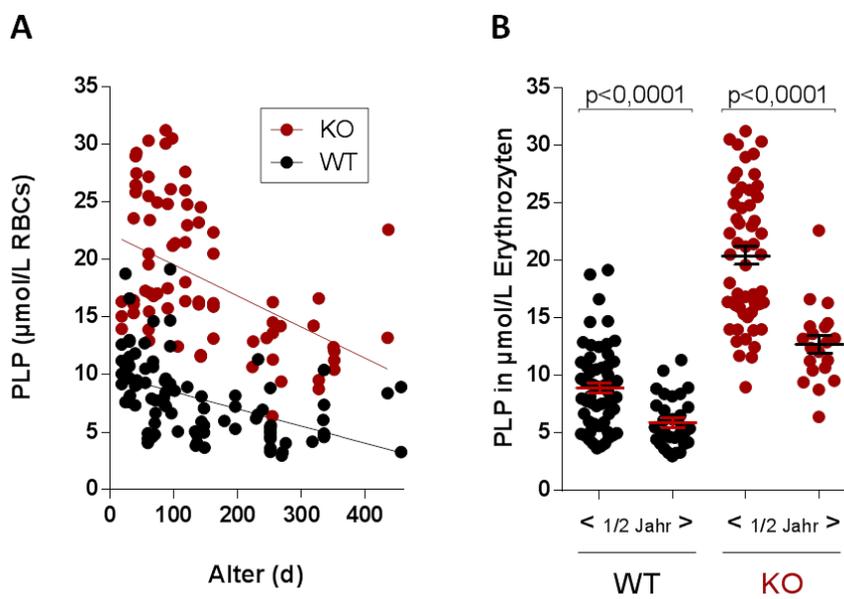


Abbildung 28: Physiologischer Rückgang erythrozytärer PLP-Konzentrationen in Wildtyp- (WT) und PDXP-defizienten (KO) Mäusen mit zunehmendem Lebensalter.

Murine Erythrozyten wurden lysiert, PLP mit Semicarbazid derivatisiert und nach Deproteinisierung mittels Perchlorsäure chromatographiert. (A) PLP-Konzentrationen muriner Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen dargestellt als Funktion des Alters. Jeder Datenpunkt entspricht der PLP-Konzentration eines Tieres. Es wurden $n=93$ männliche WT- und $n=81$ männliche KO-Mäuse analysiert. Für beide Genotypen sind die mit *GraphPadPrism* berechneten, linearen Regressionsgeraden abgebildet. (B) PLP-Konzentrationen aus (A) sind eingeteilt in Altersgruppen jeweils kleiner und größer einem halben Jahr dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht der PLP-Konzentration eines Tieres, zudem sind die Mittelwerte \pm S.E.M. angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test (*two-tailed, unpaired*) ermittelt. d, days.

Die PLP-Konzentrationen stammen von 93 Wildtypen und 81 KO-Mäusen, die eine Altersspanne von 18-436 Tagen umfassen. Jeder Datenpunkt entspricht der PLP-Konzentration eines Tieres. Beide Genotypen zeigen einen deutlichen Rückgang ihres PLP-Levels mit dem Alter. Um einen fassbaren Wert für die PLP-Abnahme pro Zeiteinheit zu erlangen, wurden mittels *GraphPadPrism* lineare Regressionsgeraden durch die Punkte ermittelt und deren negative Steigungen verglichen. Diese unterschieden sich (pro gewählter Zeiteinheit von 100 Tagen) im Wildtyp mit $1,4 \mu\text{mol PLP/L RBCs}$ pro 100 Lebenstagen sowie in dem PDXP-Knockout mit $2,7 \mu\text{mol PLP/L RBCs}$ pro 100 Lebenstagen signifikant von null. Die KO-Mäuse wiesen dabei einen rund doppelt so hohen Rückgang ihrer PLP-Konzentration mit dem Alter auf. In

Abbildung 28, (B) wurden die PLP-Konzentrationen aus (A) nach Altersgruppen jünger und älter einem halben Jahr separiert dargestellt und miteinander verglichen. Beim Wildtyp unterschied sich die jüngere Altersklasse signifikant mit einem Durchschnitt von 8,9 $\mu\text{mol PLP/L RBCs}$ von der älteren mit nur noch rund 5,9 $\mu\text{mol PLP/L RBCs}$. Die jüngeren WT-Mäuse wiesen somit rund 50% höhere PLP-Level auf als deren ältere Vergleichsgruppe. Im Knockout stellte sich der Unterschied mit Durchschnittswerten von 20,4 $\mu\text{mol PLP/L RBCs}$ (<1/2 Jahr) zu 12,7 $\mu\text{mol PLP/L RBCs}$ (>1/2 Jahr) noch eindrücklicher dar. Somit zeigte die Altersgruppe der jüngeren KO-Mäuse sogar 60% höhere PLP-Konzentrationen verglichen mit den älteren KO-Tieren. Der t-Test ermittelte in beiden Genotypen einen signifikanten Unterscheid zwischen den Altersgruppen jünger bzw. älter einem halben Jahr ($p < 0,0001$).

Insgesamt konnte ein Einfluss des Tieralters auf dessen Vitamin B6-Metabolismus nachgewiesen werden. Dieser äußerte sich in beiden Genotypen in einer Abnahme erythrozytärer PLP-Konzentrationen mit zunehmendem Alter des Tieres. Jüngere Mäuse weisen somit signifikant höhere PLP-Level auf als die Älteren. Im Knockout war dieser Unterschied mit rund 60% noch deutlicher ausgeprägt als im Wildtyp mit etwa 50%.

6.7.2 Das physiologische Alter der Mäuse hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die erythrozytäre Phosphatase-Aktivität von PDXP

Wie in Kapitel 6.7.1 bereits beschrieben, weisen jüngere Mäuse (WT sowie KO) höhere erythrozytäre PLP-Konzentrationen als ältere Mäuse auf. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Steigerung der PDXP-Aktivität mittels Substratzufuhr (durch Erhöhung der PLP-Ausgangskonzentration siehe Kapitel 6.4.3), rechtfertigt die Frage, ob die physiologisch höheren PLP-Konzentrationen in jüngeren Mäusen durch eine verringerte PDXP-Aktivität bedingt sein könnten. So wurde analog dem Versuchsaufbau in Kapitel 6.4.3 die Phosphatase-Aktivität von PDXP in Erythrozyten jüngerer WT- und KO-Mäuse bestimmt. Dazu wurden jeweils fünf Wildtypen und Knockout-Mäuse herangezogen, die sich in einer Altersspanne von 62-102 Tagen befanden. Erythrozyten wurden isoliert, zum Zeitpunkt $t=0$ h mit 2 $\mu\text{M PN}$, sowie zum Zeitpunkt $t=1$ h mit 10 $\mu\text{M GT}$ inkubiert und nach den in der Graphik angegebenen Zeiten lysiert. PLP wurde nach Derivatisierung mit Semicarbazid und Deproteinisierung durch Perchlorsäure chromatographisch analysiert.

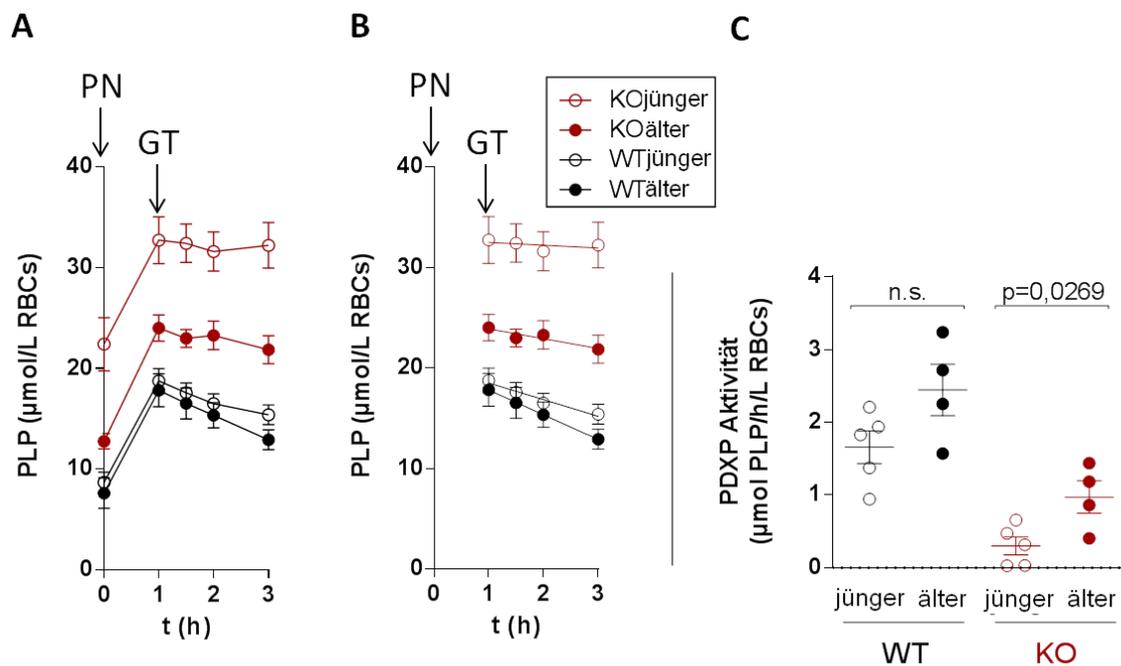


Abbildung 29: Vergleich der PDXP-Aktivität in Erythrozyten aus jüngeren (<100 d) mit älteren (>100 d) WT- und KO-Mäusen

Murine Erythrozyten wurden isoliert, zum Zeitpunkt $t=0$ h mit 2 μM Pyridoxin (PN) sowie zum Zeitpunkt $t=1$ h mit 10 μM Ginkgotoxin (GT) inkubiert (siehe Pfeilmarkierung) und nach den angegebenen Zeiten lysiert. PLP wurde nach Derivatisierung und Deproteinisierung mittels HPLC analysiert. Es wurden $n=5$ männliche Mäuse pro Genotyp analysiert. (A) Darstellung erythrozytärer PLP-Konzentrationen als Funktion der Zeit. Ergänzung mit Daten älterer Tiere aus vorherigem Versuch (siehe Kapitel 6.4.3.2). (B) Mit *GraphPadPrism* ermittelte lineare Regressionsgeraden aus (A) ab $t=1$ h. Daten in (A) und (B) sind Mittelwerte \pm S.E.M. (C) Ableitung der negativen Steigungen der Geraden aus (B). Die Phosphatase-Aktivität von PDXP wird unter den Versuchsbedingungen als negative Steigung definiert. Jeder Punkt entspricht der Aktivität in einem Tier, davon sind die Mittelwerte \pm S.E.M. inklusive Fehlerbalken dargestellt. Die statistische Signifikanzanalyse erfolgte mittels t-Test (two-tailed, unpaired).

Abbildung 29, (A) zeigt die daraus ermittelten erythrozytären PLP-Konzentrationen der jüngeren Tiere in Abhängigkeit von der Zeit. Um den direkten Vergleich zu den Älteren ziehen zu können, wurde die Graphik mit den Daten zur Messung der PDXP-Aktivität nach Substraterhöhung aus Kapitel 6.4.3.2 ergänzt, die ausschließlich ältere Tiere analysierte (223-435 Tage). Zum Zeitpunkt $t=0$ h zeichneten sich bereits die höheren erythrozytären PLP-Konzentrationen der jüngeren Tiere beider Genotypen verglichen mit den Älteren ab, die auch nach Inkubation mit PN fortbestanden. Vor allem beim Knockout stellte sich der Unterschied sehr ausgeprägt dar. So wiesen die jüngeren KO-Mäuse zum Zeitpunkt $t=0$ h rund 80% höhere PLP-Level auf als die älteren KO-Mäuse. Um die Phosphatase-Aktivität beurteilen zu können, wurden in (B) lineare Regressionsgeraden ab $t=1$ h mit *GraphPadPrism* durch die Punkte ermittelt. Die PDXP-Aktivität ist unter den Versuchsbedingungen als negative Steigung der Regressionsgeraden definiert. Abbildung 29, (C) stellt die aus (B) abgeleiteten negativen Steigungen graphisch dar und vergleicht die ermittelten PDXP-Aktivitäten aus den

jüngeren Tieren mit denen der Älteren. Im Wildtyp ließ sich dabei kein signifikanter Unterschied feststellen. Im Knockout ließ sich zwar ein signifikanter Unterschied der ermittelten negativen Steigungen nachweisen ($p=0,0269$), diese Aktivität kann durch die PDXP-Defizienz der KO-Tiere jedoch nicht auf die Phosphatase-Aktivität von PDXP zurückgeführt werden und muss daher auf anderen Mechanismen beruhen.

Die Untersuchung hat gezeigt, dass sich die aus jüngeren WT-Mäusen ermittelte Phosphatase-Aktivität von PDXP nicht von der aus Älteren unterscheidet. Somit hat das jeweilige Alter des Tieres keinen Einfluss auf die erythrozytäre PDXP-Aktivität.

6.7.3 Altersbedingter Unterschied in der PNPO Enzymexpression muriner Erythrozyten

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, resultiert die intrazelluläre PLP-Konzentration in Erythrozyten aus einem Zusammenwirken der Enzyme PNPO, PDXK sowie PDXP. Somit bestehen mehrere Wege, die zu einer altersabhängigen Abnahme der PLP-Konzentration in Erythrozyten führen könnten.

Um zu klären, ob dem altersabhängigen Rückgang der erythrozytären PLP-Konzentration Änderungen in der Enzymexpression zugrunde liegen, wurden Erythrozyten mittels Western Blot auf die Expression von PNPO, PDXP und PDXK hin analysiert. Dabei sollte der Vergleich zwischen jüngeren (Altersspanne 18-60 Tage) und älteren Mäusen (Altersspanne 255-456 Tage) gezogen werden. Dazu wurden isolierte Erythrozyten mit zweifach konzentriertem Lämmli-Puffer denaturiert, aufgekocht und anschließend auf ein SDS-Gel (12%) aufgetragen. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die separierten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurden die jeweiligen Enzyme mit spezifischen Primärantikörpern detektiert, und die Membran nach Inkubation mit einem HRP-markiertem Sekundärantikörper entwickelt. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Es wurden insgesamt 16 WT- sowie 16 KO-Mäuse mittels Western Blot analysiert, die in Altersgruppen zu je 8 jüngeren und 8 älteren Tieren aufgeteilt waren.

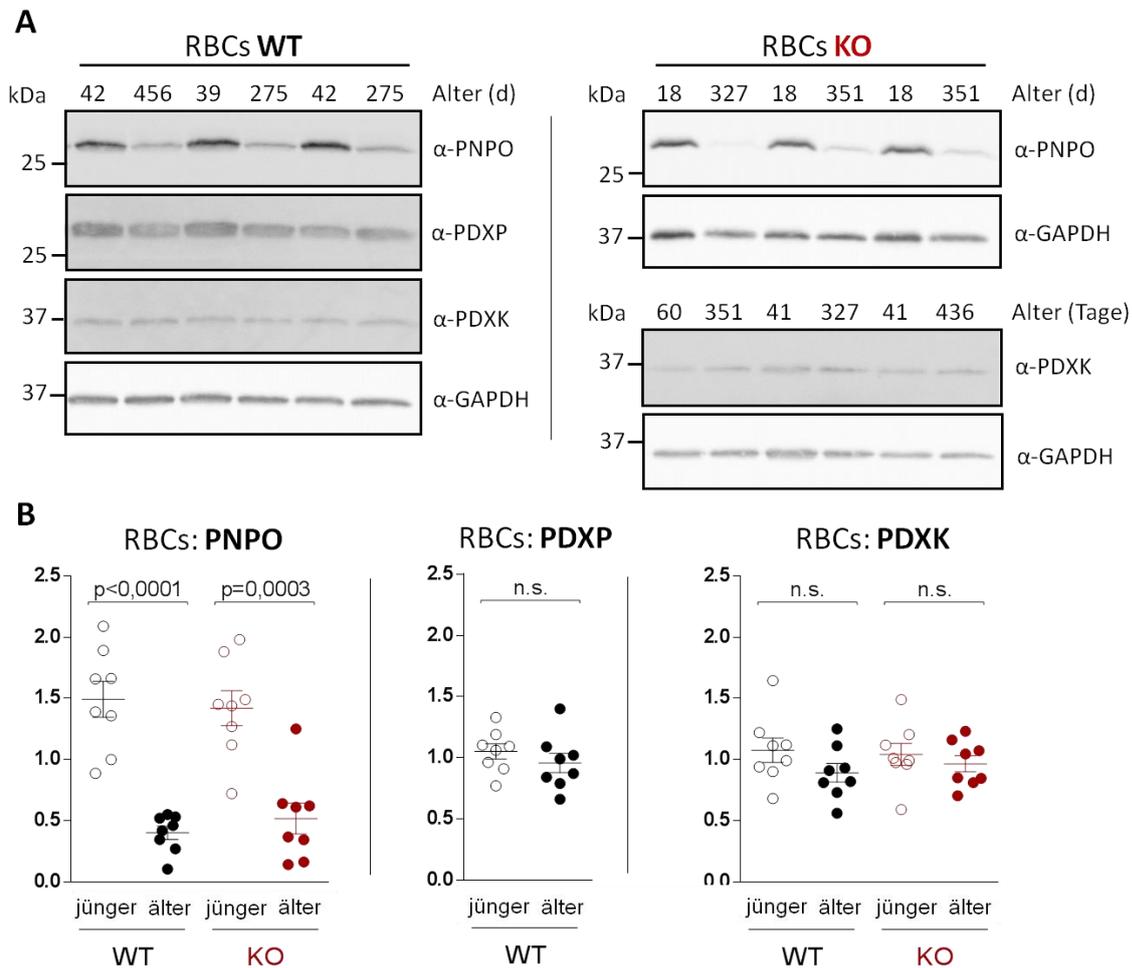


Abbildung 30: Altersbedingte Unterschiede in der Expression von PNPO muriner Erythrozyten aus Wildtyp- (WT) und PDXP-defizienten (KO) Mäusen.

(A) Western Blot Analysen der PNPO, PDXP und PDXK Expression muriner Erythrozyten aus männlichen WT- und KO-Mäusen unterschiedlichen Alters (siehe Angabe). Isolierte Erythrozyten wurden in zweifach konzentriertem Lämmli-Puffer denaturiert, bei 94°C aufgeköcht und auf ein SDS-Gel (12%) geladen. Nach abgeschlossener Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im Gel mittels *semi-dry* Blotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese wurde mit PNPO-, PDXP- und PDXK- spezifischen Primärantikörpern inkubiert, und anschließend mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper chemilumineszenzbasiert entwickelt. Die Ladekontrolle erfolgte mittels Anti-α-GAPDH Antikörper. Für Details, siehe Material und Methoden. Jede Bande entspricht dem Proteinnachweis in einem Tier. (B) Densitometrische Analyse und Auswertung der Blots. PNPO-, PDXP- und PDXK-Signale wurden jeweils intern sowie zu GAPDH normalisiert. Jeder Punkt entspricht der Enzymexpression eines Tieres, zusätzlich sind die Mittelwerte ± S.E.M. inklusive Fehlerbalken angegeben. Es wurden $n=16$ männliche Mäuse pro Genotyp auf die jeweiligen Enzyme analysiert, davon Aufteilung in Altersgruppen jünger / älter zu jeweils $n=8$ Mäusen. Alter der Tiere: WT jünger: 18-42 d; KO jünger: 18-60 d; WT älter: 275-456 d; KO älter: 255-436 d. Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels T-test (two-tailed, unpaired) ermittelt. n.s., nicht signifikant. PNPO, Pyridox(am)in Oxidase; PDXP, Pyridoxal (5'-Phosphat) Phosphatase; PDXK, Pyridoxal (5'-Phosphat) Kinase; d, *days*.

Abbildung 30, (A) zeigt die Western Blot Analysen der PNPO-, PDXP- und PDXK-Expressionen. Auf den Membranen wurden abwechselnd Proben aus jüngeren und älteren Tieren aufgetragen, jede Bande entspricht dabei dem Enzymnachweis in einem Tier. Die jüngeren WT- und KO-Mäuse zeigen dabei ein deutlich intensiveres Signal ihrer PNPO-Banden verglichen mit den älteren Tieren. Um die unterschied-

lichen Enzymexpressionen besser bewerten zu können, wurden die Signale mit *ImageJ* densitometrisch quantifiziert und die Ergebnisse in Diagrammen dargestellt. (B) Die Auswertung ergab vierfach erhöhte PNPO-Expressionslevel in den jüngeren Mäusen beider Genotypen. Der t-Test ermittelte dabei jeweils eine hohe statistische Signifikanz ($p < 0,0001$ im WT und $p = 0,0003$ im KO). Im Gegensatz dazu ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von PDXP und PDXK zwischen den Altersgruppen. Durch die Analyse mittels Western Blot konnte für beide Genotypen in den Erythrozyten aus jüngeren Mäusen eine signifikant erhöhte PNPO-Expression verglichen mit älteren Tieren nachgewiesen werden.

6.8 Einfluss des Mausalters auf den Vitamin B6-Metabolismus im Hippocampus

PLP wird im Gehirn unter anderem als Kofaktor für Decarboxylierungen zur Biosynthese vieler Neurotransmitter wie Dopamin, (Nor)epinephrin, Serotonin und GABA benötigt. (47) Da phosphorylierte B6-Vitamine die Blut-Hirn-Schranke wahrscheinlich nicht überschreiten können, wird - ähnlich wie in Erythrozyten - eine Aufnahme der unphosphorylierten Formen vermutet, die durch anschließende PDXK-abhängige Phosphorylierung in der Zelle gehalten werden. (78, 79) Es wird vermutet, dass die Hirnzellen dabei die unphosphorylierten B6-Vitamine von extrazellulär beziehen und auf das Angebot im Blut angewiesen sind. (77, 78) So wäre es möglich, dass das Hirngewebe - bedingt durch die alterskorrelierten Änderungen im erythrozytären Vitamin B6-Metabolismus - auch altersabhängigen Änderungen unterliegt.

6.8.1 Altersabhängige Dynamik der PLP-Konzentration in isolierten Hippocampi

Um zu eruieren, inwieweit das Alter eines Tieres dessen Vitamin B6-Metabolismus im Hirngewebe beeinflusst, wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Jeanclos und Frau A. Keller die PLP-Konzentrationen in Lysaten aus isolierten Hippocampi von WT- und KO-Mäusen chromatographisch bestimmt. Dazu wurden die Hippocampi aus den Tieren isoliert und davon Lysate hergestellt. Für Details, siehe Kapitel 5.2.4 (Isolation von murinen Hippocampi und Lysatherstellung). Analog den Messungen in Erythrozyten wurde deren PLP in den Lysaten mit Semicarbazid derivatisiert, deproteinisiert und mittels HPLC chromatographisch aufgetrennt. Nach Umrechnung wurden die PLP-Konzentrationen anschließend in Abhängigkeit vom jeweiligen Alter der Tiere

graphisch dargestellt (siehe Abbildung 31). Es wurden 63 Wildtypen und 37 Knockout-Mäuse analysiert, die eine Altersspanne von 14-391 Tagen umfassten.

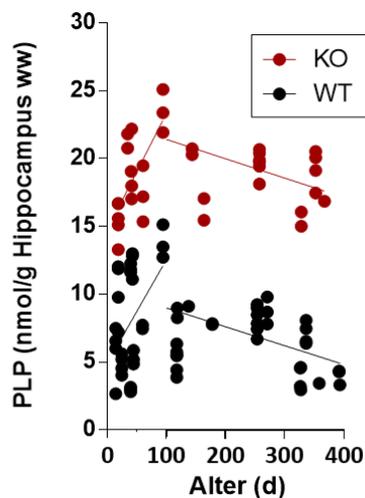


Abbildung 31: Veränderung der PLP-Konzentrationen isolierter Hippocampi aus WT- und KO-Mäusen mit zunehmendem Alter der Tiere

Die Hippocampi wurden aus den Tieren isoliert und Lysate hergestellt. Für Details, siehe Material und Methoden. PLP wurde mit Semicarbazid derivatisiert, deproteinisiert und mittels HPLC chromatographisch aufgetrennt. Die daraus abgeleiteten PLP-Konzentrationen wurden in Abhängigkeit vom jeweiligen Alter der Tiere dargestellt. Jeder Punkt entspricht der Konzentration eines Tieres, es wurden $n=63$ männliche WT und $n=37$ männliche KO analysiert. Für beide Genotypen wurden durch *GraphPadPrism* lineare Regressionsgeraden ermittelt, die am x-Wert „100 Tage“ geteilt wurden, um die Dynamik wiedergeben zu können. *ww*, *wet weight*.

Zunächst fallen die rund doppelt so hohen PLP-Konzentrationen in den Hippocampi aus KO-Mäusen verglichen mit den Wildtypen auf. Diese konnten zu jedem Alter beobachtet werden. Beide Genotypen weisen eine ähnliche Dynamik ihres PLP-Spiegels über die Lebenszeit auf. Mittels *GraphPadPrism* wurden lineare Regressionsgeraden durch die Punkte ermittelt und jeweils am x-Wert „100 Tage“ gespalten, um die Dynamik wiedergeben zu können. In beiden Mausmodellen manifestiert sich ein deutlicher Anstieg der PLP-Konzentration bis zum Tag 94. So verdoppelten sich die PLP-Werte innerhalb der ersten 13 Lebenswochen im Wildtyp von anfangs 8 nmol/g Hippocampus *ww* (*wet weight*) auf 14 nmol/g Hippocampus *ww*, sowie im Knockout von 14 nmol/g Hippocampus *ww* auf 23 nmol/g Hippocampus *ww*. Die ermittelten Steigungen unterschieden sich dabei mit den Werten $\sim 7,6$ nmol/g Hippocampus *ww* pro 100 Tagen für den Wildtyp und $\sim 8,6$ nmol/g Hippocampus *ww* pro 100 Tagen für den Knockout signifikant von null (WT, $p=0,0127$; KO, $p=0,0018$). Ab ca. 100 Tagen lässt sich in beiden Mausmodellen mit identischer negativer Steigung (etwa 1,4 nmol/g Hippocampus *ww* pro 100 Tagen) ein signifikanter Rückgang des PLP-Levels verzeichnen. So sanken die PLP-Konzentrationen mit zunehmendem

Lebensalter (hier bis knapp 400 Tage analysiert) annähernd auf ihre Ausgangswerte zurück.

Die Untersuchungen konnten eine Dynamik des PLP-Levels in Hippocampi von WT und KO-Mäusen mit zunehmendem Tieralter aufzeigen. Diese wird durch den Wechsel aus einem anfänglichen Anstieg und einem anschließenden Rückgang der PLP-Konzentrationen auf die nahezu ursprünglichen Ausgangswerte gekennzeichnet. Somit konnte ein altersbedingter Einfluss auf die PLP-Konzentrationen in Hippocampi beider Genotypen nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der PDXP-Knockout im Hippocampus zu rund doppelt so hohen PLP-Konzentrationen führt. Dies spiegelt die Ergebnisse vorheriger mittels UPLC-MS / MS durchgeführter Analysen des gesamten Gehirns wieder. Dabei konnten JEANCLOS ET AL. dreifach erhöhte PLP-Konzentrationen im Knockout verglichen mit dem Wildtyp nachweisen. (47)

6.8.2 Abweichende PDXP Enzymexpression in isolierten murinen Hippocampi unterschiedlicher Altersgruppen

Analog zu den Western Blot Analysen der Erythrozyten (siehe Kapitel 6.7.3) wurden dieselben Tiere herangezogen, um mögliche Unterschiede in der hippocampalen Enzymexpression von PNPO, PDXK und PDXP zwischen jüngeren und älteren Mäusen in Erfahrung bringen zu können. Dazu wurden die Hippocampi aus den Tieren isoliert und anschließend Lysate hergestellt. Diese wurden auf die Expression von PDXP, PDXK und PNPO mittels Western Blot mit analogem Vorgehen untersucht (Abbildung 32, A). Die Altersgruppe der jüngeren Mäuse umfasste (wie bereits in Kapitel 6.7.3 beschrieben) eine Altersspanne von 18-60 Tagen, die älteren Tiere befanden sich in einem Alter zwischen 255-456 Tagen. Nach Quantifizierung der Signale und Auswertung der Blots ergab die Analyse der PDXP-Expression vierfach erhöhte Werte in den älteren Wildtypen verglichen mit den Lysaten aus den Jüngeren. Dabei konnte eine deutliche Signifikanz ($p= 0,0001$) ermittelt werden. Auch die Expression der PDXK zeigte sich in älteren Wildtypen um ~30% erhöht verglichen mit den Jüngeren. In den älteren Knockout-Mäusen war die Expression der PDXK sogar um ~60% erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der Expression der PNPO keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen beider Mausmodelle.

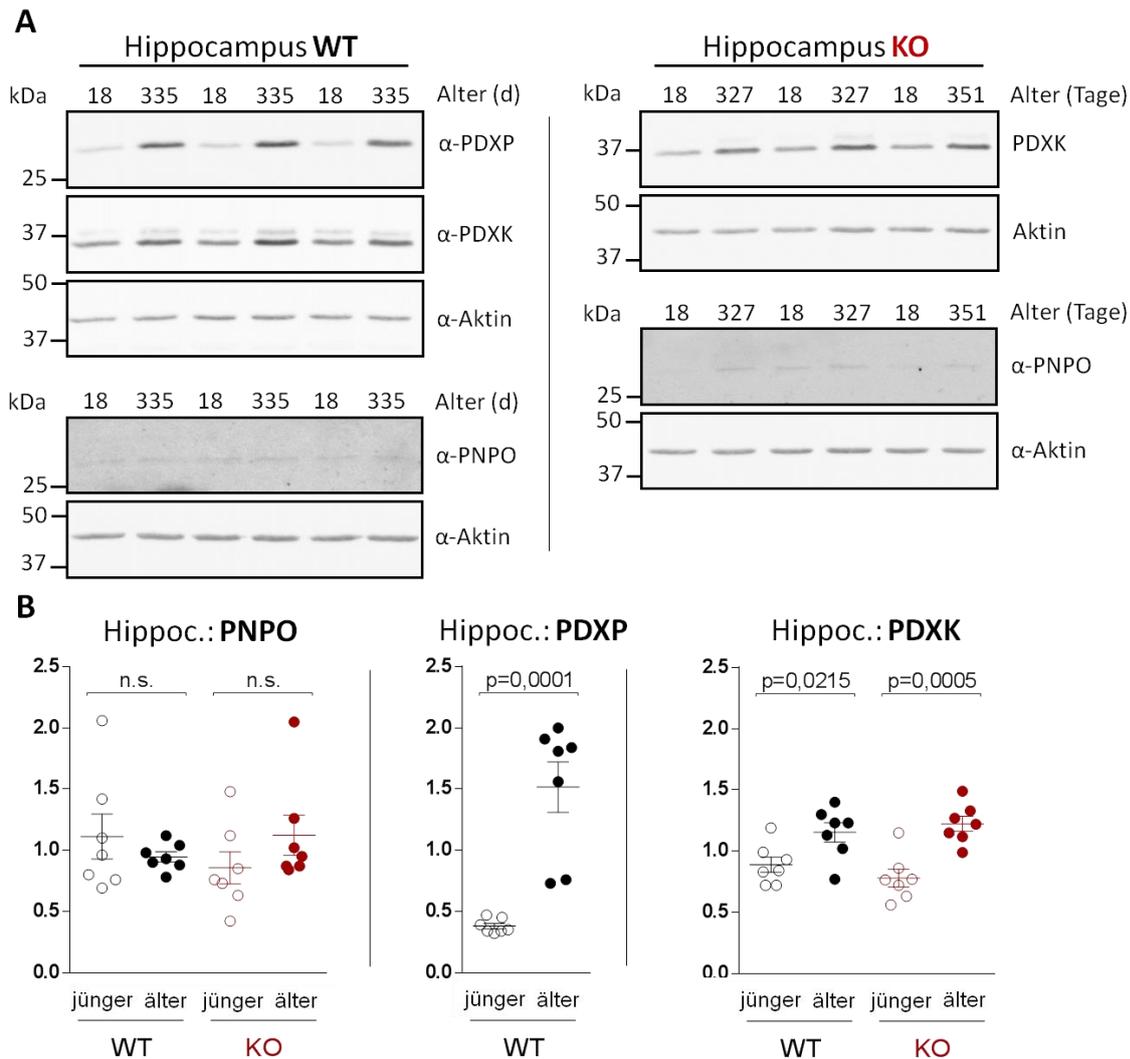


Abbildung 32: Altersabhängige Unterschiede in der PDXP-Expression in Lysaten isolierter Hippocampi aus Wildtyp- (WT) und PDXP-defizienten (KO) Mäusen.

(A) Western Blot Analysen der PNPO, PDXP und PDXK Expression in Lysaten isolierter Hippocampi aus männlichen WT- und KO-Mäusen unterschiedlicher Altersklassen (siehe Angaben). Die aus den isolierten Hippocampi hergestellten Lysate wurden wie in Kapitel 5.2.5 beschrieben vorbereitet. Anschließend wurden die Proben auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen und deren Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese in spezifischen Primärantikörpern gegen PNPO, PDXP und PDXK inkubiert und mittels HRP-konjugiertem Sekundärantikörper chemilumineszenzgestützt entwickelt. Aktin diente dabei als Ladekontrolle. Für Details, siehe Material und Methoden. Jede Bande entspricht dem Proteinnachweis in einem Tier. (B) Analyse mittels densitometrischer Quantifizierung nach interner sowie Normalisierung zu Aktin. Jeder Datenpunkt entspricht der Enzymexpression eines Tieres. Zudem sind die Mittelwerte \pm S.E.M. und zugehörige Fehlerbalken angegeben. Es wurden $n=16$ Mäuse pro Genotyp auf die jeweiligen Enzyme analysiert, davon Aufteilung in die Altersgruppen jünger und älter zu jeweils $n=8$ Mäusen. Bei den Tieren handelt es sich um dieselben Individuen wie in Abbildung 30. Das Alter der Tiere ist dementsprechend identisch: WT jünger: 18-42 d; KO jünger: 18-60 d; WT älter: 275-456 d; KO älter: 255-436 d. Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (*two-tailed, unpaired*) ermittelt. n.s., nicht signifikant.

6.9 Vergleich der freien PLP-Konzentrationen in isolierten Erythrozyten und Hippocampi

Aus der Reaktionsfreudigkeit der Aldehydgruppe von PLP, ergeben sich für die Zelle einige Probleme wie unspezifische Reaktionen mit anderen Nucleophilen oder das Anhäufen möglicher toxischer Metaboliten. Deswegen könnte der Geringhaltung freier PLP-Level als zellulärer Schutzmaßnahme besondere Bedeutung zukommen. Dies gelingt der Zelle unter anderem durch Dephosphorylierung von PLP. (47, 63, 159) Nun stellt sich die Frage, ob ein PDXP-Knockout neben den bereits dargestellten erhöhten gesamt PLP-Spiegeln (siehe Kapitel 6.2) auch erhöhte Konzentrationen an freiem PLP nach sich zieht. Um dies zu erörtern, wurde identisch der Vorgehensweise zur Messung des freien PLPs (siehe Kapitel 6.4.4) parallel das freie sowie das totale PLP isolierter Erythrozyten und Hippocampi chromatographisch analysiert (siehe Abbildung 33).

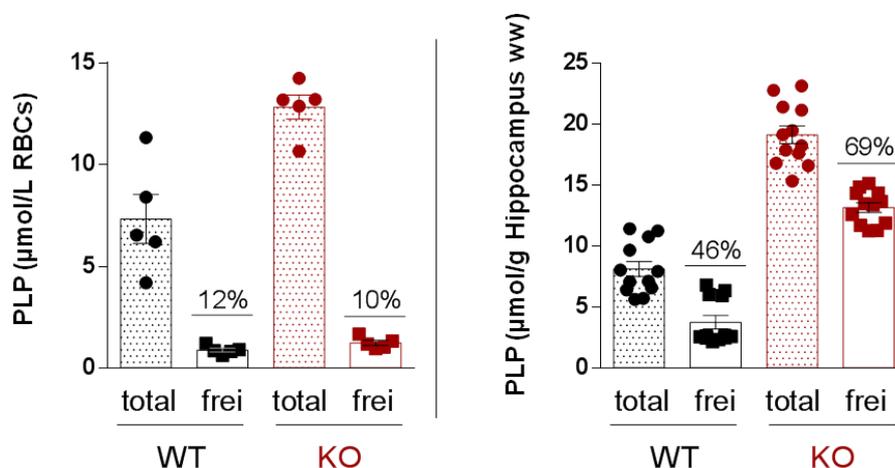


Abbildung 33: Bestimmung des Anteils an freiem PLP am gesamten PLP in isolierten Erythrozyten und Hippocampi aus WT- und KO-Mäusen

Isolierte Erythrozyten und Hippocampi wurden lysiert, freies und gesamtes PLP wurden mittels Semi-carbazid derivatisiert und nach Deproteinisierung chromatographiert. Freies PLP ist analog zu den Versuchen in Kapitel 6.4.4 als jenes PLP definiert, das frei oder gebunden in Komplexen <3 kDa vorliegt. Es wurde durch Zentrifugation mittels Filter mit einem MWCO von 3 kDa gewonnen. Der prozentuale Anteil des freien PLPs am gesamten PLP ist angegeben. Jeder Punkt entspricht der PLP-Konzentration eines Tieres, zusätzlich sind Mittelwerte \pm S.E.M. mit den entsprechenden Fehlerbalken abgebildet. Erythrozyten: $n=5$ Mäuse wurden pro Genotyp analysiert. Hippocampus: $n=12$ Mäuse wurden pro Genotyp analysiert.

Die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen an freiem und totalem PLP wurden prozentual ins Verhältnis gesetzt. In den RBCs ergaben sich dabei mit $\sim 12\%$ im WT und $\sim 10\%$ im KO ähnliche Anteile des freien PLPs am Gesamt-PLP. Um den Vergleich mit dem Hippocampus herzustellen, wurden in dessen Lysaten ebenfalls die Konzentrationen an freiem bzw. totalem PLP mittels HPLC ermittelt und einander gegenüber-

gestellt. Mit einem prozentualen Anteil von ~46% im WT belief sich das freie PLP auf das ca. vierfache verglichen mit dem in RBCs ermittelten freiem PLP (siehe Abbildung 33, B). Im Knockout entsprach es mit ~69% einem noch größeren Vielfachen. Zudem ließ sich im Hippocampus ein Unterschied zwischen beiden Genotypen feststellen. So wies der Knockout rund 1/3 mehr freies PLP auf als der Wildtyp.

7 DISKUSSION

7.1 Gemessene Phosphatase-Aktivität von PDXP in murinen Erythrozyten

Neben PDXP sind weitere Phosphatasen beschrieben, die PLP dephosphorylieren können, wie die TNSALP (*tissue non-specific alkaline phosphatase*) oder auch saure unspezifische Phosphatasen. Diese nehmen dadurch ebenfalls an der Regulation des Vitamin B6-Metabolismus teil. PDXP stellt jedoch die einzig bekannte, für PLP spezifische Phosphatase dar und unterscheidet sich daher von jenen mit breiter Substratspezifität für Phosphomonoester. Durch seine intrazelluläre Lokalisation wird PDXP schon lange als eine wichtige Determinante zellulärer PLP-Level diskutiert. (23, 160)

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es die Phosphatase-Aktivität von PDXP in isolierten Erythrozyten aus WT- und KO-Mäusen zu bestimmen. Die Inhibition der PDXK mittels Ginkgotoxin ermöglichte die Ableitung der PDXP-Aktivität anhand der Verringerung des gemessenen PLP-Levels über die Zeit durch PDXP-abhängige Hydrolyse. Da diese im Wildtyp mit $0,4 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$ zunächst nur sehr gering ausfiel, wurde versucht, sie zu steigern. Aus den Gesetzen der Enzymkinetik geht hervor, dass sich die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion durch Erhöhung des Substratangebots - und somit der Erhöhung des Enzym-Substrat-Komplexes - steigern lässt. (161, 162) Die erythrozytären PLP-Konzentrationen wurden durch Inkubation mit Pyridoxin angehoben. Tatsächlich konnte so eine sechsfach gesteigerte erythrozytäre PDXP-Aktivität im WT erreicht werden, die sich erstmals signifikant von null differenzierte. Die im WT gemessene Aktivität belief sich auf $2,4 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$.

KNOBLOCH, G. charakterisierte die Enzymkinetik von PDXP mittels *in vitro* Malachitgrün-Assays, in denen das durch Hydrolyse von PLP entstehende Phosphat optisch quantifiziert werden kann. Er ermittelte dabei für PDXP eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} von 2895 nmol/min/mg ($= 556 \mu\text{mol/h/L RBCs}$) und eine Michaeliskonstante K_M von $36,2 \mu\text{M}$. (36, 163) Anhand dieser Konstanten lässt sich mittels der Michaelis-Menten-Gleichung (155) eine PDXP-Aktivität von $\sim 36 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$ errechnen, die auf dem vorher gemessenen Substratangebot an erythrozytär freiem PLP ($= 2,5 \mu\text{mol PLP/L RBCs}$) basiert (siehe Kapitel 6.4.4). Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Phosphatase-Aktivität von PDXP (siehe Kapitel 6.4.3.2) ist mit rund $2,4 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$ etwa 15-fach geringer als im Vergleich zu der, die aus *in vitro* Bestimmungen durch KNOBLOCH, G. hervorgehen würde. Zur Umrechnung der Phos-

phatase-Aktivität von nmol/min/mg Enzym in $\mu\text{mol/h/L}$ RBCs war die Ermittlung der PDXP-Enzymkonzentration der isolierten Erythrozyten in mg/L RBCs nötig. Diese gelang mittels Western Blot durch den Vergleich der Schwärzungsgrade aufgetragener Proben mit PDXP-Standardproben bekannter Konzentrationen. Die untersuchten Proben wiesen dabei eine ungefähre PDXP-Konzentration von 3,2 mg/L RBCs auf (unveröffentlichte Daten).

Nach demselben Prinzip wurde die Geschwindigkeit von PDXP auf Basis der von FONDA, M. ermittelten enzymkinetischen Parametern errechnet. Mit einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} von 3,2 $\mu\text{mol/min/mg}$ Enzym (= 614 $\mu\text{mol/h/L}$ RBCs) und einer Michaeliskonstante K_M von 1,5 μM würde unter dem angenommenen Substratangebot von 2,5 μmol freies PLP/L RBCs eine PDXP-Aktivität von 384 $\mu\text{mol PLP/h/L}$ RBCs resultieren. Verglichen damit ist die hier gemessene PDXP-Aktivität sogar rund 150-fach verringert. (23) Der von FONDA, M. ermittelte K_M -Wert bezieht sich dabei jedoch auf kinetische Analysen von humanen Erythrozyten und fällt deutlich kleiner aus als der K_M -Wert von murinen Erythrozyten, was zu einer höheren Aktivität beiträgt. (26)

Anders als *in vitro* ergeben sich intrazellulär in Erythrozyten zusätzliche Einflussfaktoren, die das Angebot an PLP gewissermaßen einschränken können. So liegt PLP in Erythrozyten größtenteils gebunden an Hämoglobin vor, und ist so schwerer zugänglich für seine enzymatische Hydrolyse. (23) Ein interessanter von SALVO ET AL. beschriebener Ansatz ist die Fähigkeit von PNPO, PLP an einer nicht-katalytischen Seite zu binden. Daraus könnte sich eine Konkurrenz um PLP ergeben. (63) Ferner sollte bedacht werden, dass vorhandenes PNP auch als Substrat von PDXP agieren kann, wenn auch mit geringerer Selektivität. (24)

In der KO-Maus ließ sich während den Aktivitätsmessungen zwar kein signifikanter PLP-Rückgang feststellen, es zeichnete sich jedoch eine gewisse Tendenz zur PLP-Verringerung ab. Da diese nicht aus einer PDXP-abhängigen Dephosphorylierung von PLP resultieren kann, werden an dieser Stelle zwei Ansätze zur Erklärung diskutiert. Zum einen sollte bedacht werden, dass die gemessene PLP-Konzentration nicht ausschließlich von intrazellulär rühren muss, da die Erythrozyten nach den jeweiligen Messzeiten nicht erneut gewaschen wurden. So ist es möglich, dass die PLP-Verringerung nicht intrazellulär, sondern im Medium stattfand. Die mechanische Belastung durch Zentrifugationsschritte sowie Inkubation über mehrere Stunden kann zur

Schädigung und Hämolyse der Erythrozyten führen. (164, 165) Durch die Hämolyse gelangt ihr zelluläres PLP ins Medium, welches dort von unspezifischen alkalischen Phosphatasen, die extern an Plasmamembranen lokalisiert sind, zu PL umgesetzt werden könnte. (84) Daraus würde eine geringere Konzentration an messbarem PLP im Medium resultieren. Diesen - aus der Hämolyse resultierenden PLP-Verlust - würde man somit fälschlicherweise dem intrazellulären PLP-Level zuschreiben. Der gleichzeitige PL-Anstieg, der auch für den KO-Typ verzeichnet werden konnte, ließe sich damit ebenfalls erklären. Zum anderen kann trotz der als zuverlässig beschriebenen Methode zur Isolation von Erythrozyten aus Vollblut (117), die Anwesenheit einzelner Leukozyten nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Diese beherbergen in speziellen Granula, den sogenannten Phosphasomen, verhältnismäßig hohe Konzentrationen an unspezifischer alkalischer Phosphatase, die ebenfalls zur Hydrolyse des durch Hämolyse entlassenen PLPs im Medium beitragen könnte. (166) Natürlich darf die Anwesenheit weiterer derzeit noch unbekannter PLP-Phosphatasen, die ebenfalls intrazellulär lokalisiert sind, nicht ausgeschlossen werden. Bereits KYAW, A. beschrieb eine weitere für PLP spezifische saure Phosphatase, die in der murinen Leber lokalisiert ist. (23, 167) Zuletzt sollte in Betracht gezogen werden, dass trotz des generierten Ganzkörper PDXP-Knockouts eine gewisse Restaktivität von PDXP in Erythrozyten bestehen könnte. Obwohl sich in den Western Blot Analysen der KO-Mäuse zwar kein PDXP nachweisen lässt, wäre es durchaus möglich, dass nach Kreuzung der geflochtenen PDXP-Mäuse mit EIIa-Cre Mäusen keine 100%-ige Deletion in den hämatopoetischen Erythrozyten-Vorläuferzellen stattgefunden hat.

7.2 Dynamischer Gleichgewichtszustand zwischen gebundener und freier Form von PLP

PLP stellt einen der vielseitigsten Kofaktoren im Organismus dar und nimmt an der Katalyse von mehr als 140 Reaktionen teil. Die meisten PLP-abhängigen Enzyme sind am Aminosäurestoffwechsel beteiligt. (39, 47) Während der Katalyse bindet PLP kovalent über seine reaktive Aldehydgruppe an einen Lysinrest des Substrates und stabilisiert den Übergangszustand durch Delokalisierung von Elektronen (siehe Kapitel 3.2). (26, 43, 168) Um unspezifische Reaktionen seiner reaktiven Carbonylgruppe mit umgebenden Nucleophilen zu vermeiden, kommt der Aufgabe zur Geringhaltung des Levels an zellulär freiem PLP besondere Bedeutung zu. Im Vergleich zum totalen PLP fiel der Anteil an erythrozytärem, gemessenem freiem PLP mit $\sim 0,9 \mu\text{mol/L}$ RBCs im WT und $\sim 1,2 \mu\text{mol/L}$ RBCs in der KO-Maus (siehe Kapitel 6.9) tatsächlich deutlich geringer aus. SALVO, M. beschrieb das Level an freiem PLP in eukaryotischen Zellen kleiner als $1 \mu\text{M}$, was sich mit den hier ermittelten Werten für Erythrozyten deckt. (63) Der Großteil an PLP liegt in Erythrozyten gebunden an Hämoglobin, und im Plasma gebunden an Albumin vor. (75, 169) Ein bestehendes Gleichgewicht zwischen der freien und der gebundenen Form von PLP liegt nahe. Folgende Interpretation der Ergebnisse, die aus den in Kapitel 6.4.4 beschriebenen Versuchen hervorgehen, würde dies unterstützen.

So konnte in den Versuchen zur Messung der PDXP-Aktivität gegen hier als „frei“ definiertes PLP (d.h., ungebundenes PLP oder PLP in Komplexen $<3 \text{ kDa}$) keine vollständige Hydrolyse dessen erreicht werden. Die vorher gemessene Phosphatase-Aktivität von $2,4 \mu\text{mol PLP/h/L RBCs}$ hätte eine komplette Hydrolyse des freien PLPs ($2,5 \mu\text{mol/L RBCs}$) aus kapazitätstechnischer Sicht durchaus erwarten lassen, wenn der Pool an zellulär freiem PLP konstant vorliegen würde. Die unvollständige Hydrolyse des freien PLPs unterstützt die Annahme, dass der Anteil an freiem (für PDXP zugänglichem) PLP in einem Gleichgewicht mit der gebundenen Form von PLP steht. Außerdem konnte der Versuch mit Zusatz von exogenem, aufgereinigtem PDXP (siehe Kapitel 6.4.4) zu gebundenem PLP aufzeigen, dass die Phosphatase PDXP sowohl im WT- als auch im KO-Modell in der Lage war, einen erheblichen Teil des PLPs in der Fraktion mit gebundenem PLP zu dephosphorylieren. Dies unterstützt ebenfalls die Annahme eines dynamischen Gleichgewichts zwischen freier und gebundener Form, welches sich durch die Zugabe von aufgereinigtem, rekombinantem PDXP verschoben und neu eingestellt hat.

Unter der Annahme, dass ein konstanter Pool an freiem PLP vorliege, ohne im Gleichgewicht mit gebundenem PLP zu stehen, würde eine messbar höhere Phosphatase-Aktivität gegen das freie PLP resultieren. Die Versuchsergebnisse konnten dies jedoch nicht bestätigen und ergaben mit 0,4 μmol freies PLP/h/L RBCs eine scheinbar verringerte Phosphatase-Aktivität gegen freies PLP verglichen mit der Aktivität gemessen gegen totales PLP (2,4 μmol PLP/h/L RBCs, siehe Kapitel 6.4.3). An dieser Stelle sollte jedoch auf bestehende Limitationen des Versuchsaufbaus hingewiesen werden. Die Rahmenbedingungen entsprachen exakt denen der zur Messung der Phosphatase-Aktivität gegen das totale PLP. Es wurde nichts an der Ausgangssituation für PDXP geändert, d.h. die zellulär vorhandene PDXP setzte unter identischen Bedingungen die identische Menge an PLP um. Somit blieb auch die Aktivität dieselbe, und fiel nur vermeintlich geringer aus. Durch den Filtrationsschritt am Ende zur Gewinnung des freien PLPs wurde nur ein willkürlicher Teil des Gleichgewichts betrachtet, der gerade zu diesem Zeitpunkt in der freien Form vorlag. Die abgeleitete Aktivität wird zwangsläufig von der Gleichgewichtslage der freien und gebundenen Form von PLP beeinflusst. Somit kann unter den Versuchsbedingungen kein Rückschluss auf die Phosphatase-Aktivität von PDXP, die sich rein gegen freies PLP ergeben würde, getroffen werden. Angesichts der hohen Reaktivität von freiem PLP wird - abgesehen von *in vitro* Versuchen - die Generierung eines Versuchsmodells, das auf der Bestimmung der Phosphatase-Aktivität rein gegen freies PLP in Zellen basiert, nur schwer zu realisieren sein.

Der Umgang mit freiem PLP stellt für die Zelle eine besondere Herausforderung dar. So muss die Konzentration an freiem PLP möglichst geringgehalten werden, um schädlichen Konsequenzen aus unspezifischen und möglicherweise auch irreversiblen Reaktionen vorzubeugen. (26) Gleichzeitig muss ein adäquates Angebot an freiem PLP für die zahlreichen B6-Apoenzyme, die den Kofaktor benötigen, vorhanden sein. (63) SALVO, M. beschrieb drei Prinzipien, die für die Bereitstellung von freiem PLP in Frage kommen. [1] Der bisher angenommene Mechanismus basiert auf freiem PLP, welches die Apoenzyme direkt erreicht. Die Hydrolyse durch Phosphatasen oder die unspezifische Reaktion mit nicht Vitamin B6-abhängigen Proteinen könnten die Effektivität jedoch mindern. [2] Ein wesentlich eleganterer Mechanismus stellt das direkte Übertragen von PLP durch Donorenzyme auf die B6-Apoenzyme („*channeling*“) dar. (26, 63, 150, 159) Die bisher bekannten Enzyme bzw. Proteine mit einer solchen „PLP *channeling*“-Aktivität sind PDXK, PNPO und *PLPBP* (*PLP-binding*

protein), früher als *PROSC* (*proline synthetase co-transcribed homologue*) bezeichnet. Bei *PLPBP* handelt es sich um ein zytoplasmatisches Protein mit einer PLP-Bindestelle. (159, 170) Genau wie PDXK und PNPO ist es fähig, freies PLP zur Übermittlung an B6-Apoenzyme vorübergehend zu binden. [3] Schließlich könnte eine an Aminosäuren gebundene Vermittlung von PLP in Frage kommen. So vermutet SALVO, M., dass die Umwandlung von B6-Apoenzymen in entsprechende Holoenzyme durch die Reaktion mit an PLP gebundenen Aminosäuren (Aldiminen) stattfindet, deren Struktur den Substraten der B6-Apoenzyme ähnelt. (63) Es wird angenommen, dass ein großer Teil des freien PLPs gebunden an kleinere Aminosäuren vorliegt und somit als Speicher von freiem PLP dient. (63) Auch das im Rahmen dieser Arbeit durch Filtration erhaltene freie PLP schließt die Bindung an kleinere Aminosäuren nicht aus.

7.3 Die PDXP-katalysierte Dephosphorylierung spielt in Zeiten unzureichender Nahrungszufuhr keine Rolle für die Mobilisierung intrazellulärem PLPs in Form von PL

Wie bereits in Abbildung 4 und Abbildung 17 dargestellt können Erythrozyten über die Nahrung aufgenommenes Pyridoxin in den Kofaktor PLP umwandeln. (23) Dafür stehen ihnen zwei Enzyme, die Pyridoxal Kinase (PDXK) sowie die Pyridox(am)in Oxidase (PNPO), zur Verfügung. (171) Das neu synthetisierte PLP bindet an umliegende Proteine oder kann durch die zelluläre PDXP zu PL hydrolysiert werden. (23, 157) Daraufhin wird eine allmähliche Freisetzung des PL ins Plasma vermutet. (82, 172) Es ist möglich, dass PL eine Transportform von PLP darstellt und durch den Blutkreislauf in andere Gewebe gelangt, die dort wiederum mithilfe der PDXK PLP synthetisieren könnten. (64, 82, 160) Im Gegensatz zu PDXK, deren Aktivität in fast allen Geweben vorhanden ist, ist die PNPO nur selektiv präsent. (157) KANG ET AL. analysierten die Expressionsprofile von PDXK, PDXP und PNPO in unterschiedlichen Geweben. (158) Dabei ist die PNPO im Gegensatz zu PDXK (und PDXP) in mehreren Geweben verhältnismäßig nur gering exprimiert. Besonders der Appendix, die Lymphknoten und die peripheren Leukozyten fallen dabei mit ihren minimalen PNPO-Expressionsleveln ins Auge. (158) Auch im Rahmen dieser Arbeit fiel die mittels Western Blot analysierte PNPO-Expression im Hippocampus viel niedriger aus als im Vergleich zu den Erythrozyten (siehe Western Blot-Analysen, Abbildung 30 und Abbildung 32). Durch das Fehlen der PNPO wären die Gewebe nicht fähig, PLP ausgehend von PN herzustellen, und somit auf die Versorgung mit PLP bzw. PL angewiesen. Der Bereit-

stellung von PL mittels PDXP-abhängiger Dephosphorylierung von PLP könnte dabei eine entscheidende Rolle zukommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden WT- und KO-Mäuse vor Versuchsbeginn gefastet, um den Zustand eines verminderten Angebots an B6-Vitaminen zu schaffen. Der anschließende Vergleich ihres erythrozytären PLP- und PL-Gehalts mit normal gefütterten Mäusen sollte einen Hinweis darauf liefern, ob PDXP für die hydrolytische Bereitstellung von PL in Fastenzeiten benötigt wird. Die Ergebnisse konnten diese Annahme jedoch nicht bestätigen. Sowohl die gefasteten Wildtypen als auch die gefasteten Knockout-Mäuse wiesen gleichermaßen signifikant verringerte PLP-Level auf (siehe Abbildung 25). Daraus ergibt sich die Frage, was die Verringerung der intrazellulären PLP-Level in den gefasteten PDXP-defizienten Mäusen verursacht haben könnte.

Unspezifische alkalische Phosphatasen wären zwar in der Lage, PLP enzymatisch zu hydrolysieren, sind aber angesichts ihrer extrazellulären Lokalisation an der Plasmamembran nur an der Regulation extrazellulärer PLP-Level beteiligt. (83, 84) Die Anwesenheit anderer bisher noch unbekannter PLP-Phosphatasen darf für die Erythrozyten nicht ausgeschlossen werden, so wurden in Studien bereits unspezifische saure Phosphatasen in Leber und Niere, sowie eine alkalische Phosphatase im menschlichen Gehirn beschrieben. (84, 86-89)

Einen neuen Erklärungsansatz für die verringerten PLP-Level in den gefasteten KO-Mäusen könnten kürzlich identifizierte mechanotransduktive Kationenkanäle liefern, die eine zelluläre ATP-Freisetzung regulieren. Erythrozyten exprimieren auf ihrer Zellmembran den sogenannten Piezo-1-Kanal. (173) Mechanische Stimuli induzieren das Öffnen des Piezo-1-Kanals mit einem darauffolgenden Calcium-Einstrom, der wiederum zelluläres ATP freisetzt. (173, 174) Den Kanälen wird eine regulatorische Funktion zur Steuerung des erythrozytären Volumens zugesprochen. (174) Möglicherweise könnten die Piezo-1-Kanäle auch einen Weg für PLP darstellen, die Erythrozyten zu verlassen. Initiale hier durchgeführte Versuche zur Stimulation des Kanals gaben jedoch keinen Hinweis auf eine vermehrte PLP-Freisetzung aus den Erythrozyten durch Kanalöffnung (unveröffentlichte Daten).

Anstatt von einer PLP-Verringerung im gefasteten Tiermodell auszugehen, käme als anderer Ansatz auch eine geringere Netto-PLP-Synthese in Frage. Diese könnte aus dem durch das Fasten hervorgehenden eingeschränkten Angebot an B6-Vitaminen

resultieren. Tatsächlich beschrieb HAMFELT, A. einen Zusammenhang zwischen einer Vitamin B6-Mangelernährung und einer geringeren Sättigung der erythrozytären PDXK mit PLP-Vorstufen, durch welche geringere PLP-Level bedingt sein könnten. Der Zustand der Vitamin B6-Mangelernährung erfolgte dabei allerdings über drei Wochen. (175) Der hier deutlich kürzere Fastenzeitraum sollte die kurzfristigen Reaktionen auf ein geschaffenes Vitamin B6-Defizit darstellen.

Die ermittelten PL-Konzentrationen im Plasma erwiesen sich in den gefasteten Tieren beider Genotypen ebenfalls als signifikant erniedrigt. Das ließe sich mit oben vermuteter PL-Bereitstellung an umliegende Gewebe decken. UPLC-MS / MS-basierte Vergleichswerte aus murinem Plasma lagen mit ~ 500 nmol PL/L (WT und KO) in derselben Größenordnung wie in den hier durchgeführten Versuchen mit ~ 450 nmol PL/L. (47) Die analysierten PLP-Konzentrationen im Plasma ergaben keine signifikanten Unterschiede der gefasteten Mäuse im Vergleich zu den normal gefütterten Tieren. Die Werte lagen in beiden Genotypen bei rund 200 nmol/L Plasma. UPLC-MS / MS-basierte Vergleichswerte aus murinem Plasma lagen für beide Genotypen bei ~ 150 nmol PLP/L, und wichen damit nur gering von den hier ermittelten Werten ab. (47) Entsprechende Werte in der Literatur aus analysiertem menschlichem Plasma bewegten sich dagegen zwischen 65-100 nmol PLP/L Plasma. (82, 176, 177)

Wie hier aus dem Vergleich von Wildtyp und KO-Maus hervorgeht, spielt die PDXP-abhängige Dephosphorylierung von PLP in Fastenzeiten keine Rolle für die erythrozytäre Bereitstellung von PLP. Wie es zu der intrazellulären Verringerung der PLP-Level auch in den KO-Mäusen kommt, ist derzeit noch unklar.

7.4 Die erythrozytäre Konversion von PN zu PL ist PDXP-abhängig

Da PLP die einzig aktive Form von Vitamin B6 darstellt, kommt der zellulären Interkonversion der B6-Vitamere zu PLP besondere Bedeutung zu. Im Gegensatz zu den Erythrozyten ist nicht jede Zelle gleichermaßen mit den dafür benötigten Enzymen PDXK, PDXP und PNPO ausgestattet (157, 158, 178) Es liegt nahe, dass die Zellen / Organe, denen eine Interkonversion zu PLP nicht möglich ist, auf das PLP-Angebot anderer Zellen angewiesen sind. In der Tat beherbergen Erythrozyten im Vergleich zum Plasma große Mengen an intrazellulärem PLP. Die erythrozytäre PLP-Konzentration ist um ein 35-faches größer als der PLP-Gehalt im Plasma (siehe Abbildung 25). Der Vergleich der PLP-Konzentrationen gefasteter Mäuse mit normal gefütterten Tieren (siehe Kapitel 6.5) konnte aufzeigen, dass die RBCs ihre PLP-Speicher in Zeiten mangelnden Angebots mobilisieren. Die Mobilisation ihres intrazellulären PLPs während einem verminderten Vitamin B6-Angebot erfolgte jedoch PDXP-unabhängig.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, eine stattfindende PDXP-abhängige Hydrolyse von PLP zu PL während PN-Zufuhr nachzuweisen (siehe Kapitel 6.6). Dabei erwies sich die Phosphatase PDXP als essenziell für eine intrazelluläre Konversion von PN zu PL. Die erythrozytäre PL-Produktion ausgehend von PN war im Wildtyp mit $\sim 2 \mu\text{mol PL/L RBCs}$ rund vierfach höher als in der KO-Maus mit nur $\sim 0,5 \mu\text{mol PL/L RBCs}$. So wurden in den isolierten Erythrozyten aus WT-Mäusen etwa 10% des neu gebildeten PLPs PDXP-abhängig zu PL hydrolysiert. Im WT-Vollblut war die PL-Produktion nach PN-Zusatz ebenfalls rund vierfach höher als im Vollblut aus KO-Mäusen. Insgesamt wurden im Vollblut sogar 25% des neu gebildeten PLPs zu PL hydrolysiert.

Die PDXP-Aktivität konnte anhand der PL-Produktion pro Zeiteinheit ermittelt werden. In den isolierten Erythrozyten aus WT-Mäusen ergab sich eine Phosphatase-Aktivität von $\sim 2,4 \mu\text{mol PL/h/L RBCs}$. Diese Aktivität entspricht exakt derer aus vorherigen Versuchen mit isolierten Erythrozyten, in welchen die PLP-Verringerung pro Zeiteinheit zur Beurteilung der PDXP-Aktivität herangezogen wurde (siehe Kapitel 6.4.3.2). Das stützt die Zuverlässigkeit der im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse. Interessanterweise konnte im Vollblut eine mehr als doppelt so große PDXP-Aktivität als im Vergleich zu isolierten RBCs bestimmt werden. Sie belief sich auf rund $5,5 \mu\text{mol PL/h/L RBCs}$.

Nun stellt sich die Frage, weshalb die Phosphatase-Aktivität von PDXP im Vollblut um das Doppelte höher ausfällt als in isolierten Erythrozyten. Im Vollblut befinden sich

neben den Erythrozyten noch weitere Blutzellen, die Blutplättchen (Thrombozyten) sowie die weißen Blutkörperchen (Leukozyten). (179) Es wäre möglich, dass diese ebenfalls eine Phosphatase-Aktivität besitzen und so zur gemessenen, erhöhten gesamt PDXP-Aktivität im Vollblut beitragen. Da Leukozyten und Thrombozyten zusammen jedoch nur ca. 1% der Blutzellen ausmachen (99% Erythrozyten), scheint es zweifelhaft, dass die erhöhte PDXP-Aktivität von diesen rührt. (180) Zudem exprimieren die peripheren Leukozyten verhältnismäßig wenig (bis nahezu keine) PNPO, was ihnen eine Konversion von PN zu PLP unmöglich macht. Somit wäre nach PN-Zufuhr auch keine intrazelluläre PDXP-abhängige Dephosphorylierung von PLP zu PL möglich. So ist die erhöhte PDXP-Aktivität im physiologischen Milieu Vollblut vermutlich den Erythrozyten zuzuschreiben. Es ist nicht auszuschließen, dass das Blutplasma und die darin enthaltenen Plasmaproteine, Antikörper sowie Hormone einen aktivierenden Einfluss auf die erythrozytäre Phosphatase-Aktivität von PDXP haben könnte.

ANDERSON ET AL. charakterisierten die Konversion von Pyridoxin zu Pyridoxalphosphat bzw. Pyridoxal in menschlichem Blut. (82) Nach Inkubation des Vollblutes mit PN untersuchten sie *in vitro* dessen PL(P)-Bildung. Die Autoren bestätigten eine stattfindende Konversion von PN zu PLP bzw. PL sowie eine allmähliche Freisetzung von PL ins Plasma. (82) Um zu prüfen, ob in den hier untersuchten isolierten Erythrozyten ebenfalls eine PL-Freisetzung nach extrazellulär erfolgt, wurde in Pilotversuchen der PL-Gehalt der extrazellulären Lösung bestimmt. Die Messungen ergaben jedoch keine nennenswerten PL-Konzentrationen außerhalb der Erythrozyten (unveröffentlichte Daten). ANDERSON ET AL. wiesen einen linearen Zusammenhang zwischen dem ins Plasma freigesetzte PL und der Menge an vorhandenem Plasma im Blut nach. Demnach vermuteten die Autoren einen Faktor im Blutplasma, der die PL-Freisetzung ins Plasma beeinflussen könnte. (82) Auch nach Zugabe von Plasma zu den isolierten RBCs konnte extrazellulär keine nennenswert höhere PL-Konzentration nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten).

Neben möglichen Faktoren im Blutplasma könnte es weitere Trigger zur Freisetzung des gebildeten PLs nach extrazellulär geben. DANIELCZOK ET AL. konnten die molekularen Abläufe in Erythrozyten beim Passieren einer Kapillare darstellen. (181) Dabei spielen die bereits erwähnten Piezo-Kanäle (siehe Kapitel 7.3) eine Rolle. Der mechanische Reiz, der durch den Kontakt beim Durchwandern der RBCs mit den Kapillaren entsteht, führt zum Öffnen der mechanotransduktiven Piezo-Kanäle. Daraufhin kommt es zu einem Calcium-Einstrom, der weitere Kanäle öffnet, was letztlich zu einem

Wasserverlust und somit zur Schrumpfung der RBCs führt. Da es sich bei den Piezo-Kanälen um unspezifische Kationenkanäle handelt, wäre es möglich, dass auch PL, z.B. gebunden an Lysin, auf diesem Wege die Erythrozyten verlässt. Während der Passage von engen Kapillaren kommt es zudem zur Interaktion von Erythrozyten mit Leukozyten. (182) So wäre es durchaus vorstellbar, dass die Leukozyten einen Stimulus zur erythrozytären Freigabe von PL darstellen, zumal diese aufgrund ihrer geringen Expression von PNPO auf die Versorgung mit PL angewiesen sein könnten.

Insgesamt ermöglicht die Fähigkeit zur Konversion von Pyridoxin zu Pyridoxal dem Organismus gewissermaßen metabolische Flexibilität. Unabhängig davon, welche Form der B6-Vitamer durch die Nahrung aufgenommen wird, erlauben die Erythrozyten die Umwandlung in den Kofaktor PLP. Zudem scheint durch den Schritt der PDXP-vermittelten Hydrolyse von PLP zu PL eine Versorgung anderer Gewebe oder Zellen mit PL(P) möglich.

7.5 Altersbedingter Rückgang erythrozytärer PLP-Konzentrationen

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, nimmt das physiologische Alter der Mäuse Einfluss auf deren erythrozytäre PLP-Konzentrationen. Sowohl im Wildtyp- als auch im Knockout-Tiermodell ließ sich ein signifikanter zeitlicher Rückgang des PLP-Levels nachweisen. In PDXP-defizienten Mäusen betrug der Rückgang $\sim 2,7 \mu\text{mol PLP/L RBCs}$ pro 100 Lebenstagen im Vergleich zu $1,4 \mu\text{mol PLP/L RBCs}$ pro 100 Lebenstagen in WT-Mäusen. In der Literatur wurden bereits altersbedingte Schwankungen im Vitamin B6-Metabolismus beschrieben, die sich jedoch auf Analysen des Plasmas beziehen. So ermittelten FUKUWATARI ET AL. HPLC-basiert die Plasma PLP-Konzentrationen aus männlichen Wistar Ratten unterschiedlichen Alters. Im Vergleich von 8-Wochen alten mit 80-Wochen alten Tieren, konnten diese Autoren ein verringertes Plasma PLP-Level der älteren Tiere feststellen. (183) Die Analyse der PLP-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom Alter der hier gewählten Tiere ist kein Gegenstand dieser Arbeit, da PDXP auch aufgrund der intrazellulären Lokalisation offenbar keinen Einfluss auf die Plasma PLP-Konzentrationen hat.

Ungeachtet dessen stellt sich die Frage, welche Mechanismen für die altersbedingte PLP-Abnahme im Plasma verantwortlich sein könnten. HAMFELT, A. setzte sich bereits in menschlichen Individuen damit auseinander und beschrieb mögliche Ursachen, die auch für eine alterskorrelierte erythrozytäre PLP-Verringerung in Mäusen in Frage

kämen. (184) So könnten eine [1] Vitamin B6-Mangelernährung, [2] eine gestörte Resorption im Darm, [3] eine vermehrte Ausscheidung über den Urin, oder [4] eine verminderte PLP-Synthese durch die verantwortlichen Enzyme eine Rolle spielen. (184) Es muss jedoch betont werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit als älter bezeichneten Tiere maximal mittelalten Erwachsenen gleichkommen würden (bezogen auf das Menschenalter).

[1] Unterschiede in der Nahrung lassen sich in den hier durchgeführten Versuchen größtenteils ausschließen, da die Tiere identisches Futter auf gleicher Weise erhielten.

[2] Da die intestinale Aufnahme von Pyridoxin vermutlich über einen Carrier-vermittelten Mechanismus sowie passive Diffusion erfolgt, wären weitere Studien zur Bewertung der intestinalen Resorption von B6-Vitaminen in älteren Mäusen hilfreich. (70-73)

[3] HPLC-basierte Untersuchungen von FUKUWATARI ET AL. zur Messung von 4-Pyridoxinsäure (dem Abbauprodukt von Vitamin B6) im Urin männlicher Ratten ergaben keine erhöhte Exkretion von 4-Pyridoxinsäure in älteren Tieren. (183) Das würde die These einer vermehrten Vitamin B6-Ausscheidung relativieren.

[4] Um einen Anhaltspunkt auf eine mögliche verringerte PLP-Synthese als Ursache des dargestellten alterskorrelierten Rückgang der PLP-Konzentrationen in Erythrozyten zu bekommen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Tiere jeweils verschiedener Altersgruppen auf ihre erythrozytäre Enzymexpression von PNPO, PDXK und PDXP hin analysiert (siehe Kapitel 6.7.3, Abbildung 30). Dabei konnte in den jüngeren Tieren beider Genotypen (WT und PDXP-KO) eine signifikant vierfach erhöhte PNPO-Expression festgestellt werden. Unter der Annahme, dass die PNPO-vermittelte Oxidation den limitierenden Schritt bei der PLP-Synthese darstellt (157), könnten derart erhöhte PNPO-Expressionen der jüngeren Tiere durchaus für die höheren erythrozytären PLP-Level verantwortlich sein. Zudem scheint ein linearer Zusammenhang zwischen der PNPO-Expression und der erythrozytären PLP-Konzentration zu bestehen (unveröffentlichte Daten). Eine erhöhte PNPO-Expression darf jedoch nicht ohne weiteres mit einer erhöhten Enzymaktivität gleichgesetzt werden. Dafür wären künftige Studien zur Bestimmung der PNPO-Aktivität in murinen Erythrozyten erforderlich.

Für den nachgewiesenen alterskorrelierten Rückgang erythrozytärer PLP-Konzentrationen scheint die PDXP keine (oder nur eine untergeordnete) Rolle zu spielen, zumal sich diese Erscheinung gleichermaßen in den PDXP-defizienten Knockout-Tieren abzeichnet. Die Phosphatase-Aktivitätsbestimmungen aus jüngeren Wildtypen verglichen mit Älteren ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der

PDXP-Aktivität trotz variierender PLP-Level (siehe Kapitel 6.7.2, Abbildung 29). So scheint vor dem Hintergrund analysierter Enzymexpressionen eher die erhöhte PNPO-Expression in den jüngeren Tieren einen Hinweis auf ihre erhöhten PLP-Konzentrationen zu liefern.

7.6 Vitamin-B6 Metabolismus in Hippocampi

Neben dem Aminosäurestoffwechsel stellt PLP im Gehirn für die Synthese einiger Neurotransmitter einen wichtigen Kofaktor dar. (47) Es wird jedoch angenommen, dass die phosphorylierten B6-Vitamer die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können und in Form ihrer Vorstufen PN, PL bzw. PM aufgenommen werden müssen. (77-79, 178) Ähnlich den Erythrozyten schließt der vermutete Metabolismus zur Herstellung von PLP im Gehirn dabei die PDXK-abhängige Phosphorylierung sowie die darauffolgende PNPO-katalysierte Oxidation zu PLP ein. Das Angebot an unphosphorylierten Vitamer-Vorstufen, insbesondere PL, wird dabei vom Blut bezogen. (77) WAYMIRE ET AL. konnten zeigen, dass Mäuse mit fehlender Aktivität der TNSALP (*tissue non-specific alkaline phosphatase*) reduzierte PLP-Konzentrationen im Gehirn aufwiesen. Das Ektoenzym TNSALP hydrolysiert PLP im Plasma zu PL. Bei fehlender Aktivität der TNSALP wurden erhöhte Plasma PLP- sowie erniedrigte Plasma PL-Konzentrationen nachgewiesen. Die erniedrigten PLP-Konzentrationen im Gehirn bei nachgewiesenen reduzierten Plasma PL-Konzentrationen würden die These, dass Hirnzellen zur PLP-Synthese auf das Plasma PL-Angebot angewiesen sind, stützen. (185) Wie bereits oben erwähnt, wurde in einigen Studien ein altersabhängiger PLP-Rückgang im Plasma nachgewiesen. (148, 184, 186) Es wäre vorstellbar, dass sich daher auch im Hirngewebe altersabhängige Einflüsse auf den Vitamin-B6 Metabolismus ergeben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die PLP-Konzentrationen isolierter Hippocampi aus WT- und PDXP-defizienten Mäusen chromatographisch analysiert und ebenfalls in Abhängigkeit vom jeweiligen Alter des Tieres betrachtet (siehe Kapitel 6.8.1). Die analysierten Mäuse deckten dabei eine Altersspanne von 14-391 Tagen ab. Es ließ sich eine gewisse Dynamik der PLP-Level in beiden Genotypen beobachten, die aus einem anfänglichen Anstieg der PLP-Konzentrationen mit darauffolgendem Rückgang bis auf die Anfangswerte gekennzeichnet war (siehe Abbildung 31). FONDA ET AL. analysierten die PLP-Level in Gehirnen aus C57Bl/6J Mäusen aus unterschiedlichen Altersgruppen. (77) Sie konnten dabei keinen signifikanten Unterschied in der PLP-Konzentration zwischen den Altersgruppen nachweisen. Die analysierten Tiere lagen

dabei mit 10-33 Monaten jedoch außerhalb des hier untersuchten Zeitrahmens. So wären auch im Hippocampus ähnlich konstante PLP-Konzentrationen ab dem 1. Lebensjahr der Tiere denkbar, zumal deren PLP-Level bereits gegen Ende des hier untersuchten Zeitrahmens wieder nahezu auf die Anfangswerte gesunken sind. Weitere Studien zur Bestimmung hippocampaler PLP-Level aus älteren Mäusen erschienen zur Vervollständigung sinnvoll.

Obwohl die *steady state* PLP-Konzentrationen im Hirngewebe aus jüngeren und älteren Mäusen nicht variierten, stellten FONDA ET AL. in den älteren Mäusen eine erhöhte Aufnahme von radioaktiv markierten Pyridoxin fest. (77) Damit könnten die abfallenden Plasma PLP-Level älterer Mäuse erklärt werden, die womöglich auf Kosten der erhöhten Vitamer Aufnahme aus dem Plasma zur Aufrechterhaltung der Hirn PLP-Konzentrationen im Alter entstünden. Der hier festgestellte Anstieg des PLP-Levels bis zum 3. Lebensmonat der Mäuse ließe sich durch eine in dieser Zeit vermehrten Synthese von Neurotransmittern erklären. Tatsächlich gibt es in der Literatur Hinweise auf eine signifikant erhöhte hippocampale Noradrenalin-Konzentration in den ersten drei Lebensmonaten von Mäusen. Es wird davon ausgegangen, dass die Entwicklung von Noradrenalin sowie Serotonin ein überwiegend postnatales Ereignis darstellt. (187, 188) Generell wiesen die KO-Mäuse, verglichen mit gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen, jeweils rund doppelt so hohe hippocampale PLP-Konzentrationen auf. JEANCLOS ET AL. konnten für das gesamte Hirngewebe entsprechend fast dreifach erhöhte PLP-Konzentrationen in den PDXP-defizienten Tieren feststellen. (47)

Auch im Gehirn wird PLP PDXP-abhängig zu PL hydrolysiert. (47, 77, 89) Die Untersuchungen von FONDA ET AL. zum Vitamin B6-Metabolismus im Hirngewebe jüngerer und älterer Mäuse zeigten zudem eine erhöhte PLP-Hydrolyse in den älteren Mäusen. (77) Daraus folgerten sie entweder eine erhöhte Phosphatase-Aktivität in älteren Mäusen oder eine vermehrt vorliegende ungebundene Form des PLPs, in der PLP leichter hydrolysiert werden könnte. Die in Kapitel 6.8.2 dargestellte vierfach höhere hippocampale PDXP-Expression in älteren Mäusen (255-456 Tage) im Vergleich zu Jüngeren (18-60 Tage) könnte eine Erklärung für die von FONDA ET AL. beschriebene erhöhte PLP-Hydrolyse in ihren älteren Mäusen (915-946 Tage) sein. An dieser Stelle wären Assays zur Messung der Phosphatase-Aktivität sicherlich hilfreich, da eine erhöhte Expression nicht ohne weiteres zu einer höheren Aktivität des Enzyms führen muss.

Analysen zum freien PLP (siehe Kapitel 6.9) ergaben im Hippocampus einen deutlich höheren Prozentanteil des freien PLPs am gesamten PLP, verglichen mit Erythrozyten. Unter der bereits erwähnten Problematik (Kapitel 7.2), die freies PLP für Zellen darstellt, erscheint es äußerst erstaunlich, dass die Hirnzellen eine vierfach (im WT) bzw. siebenfach (im KO) höhere freie PLP-Konzentration aufweisen. Natürlich muss an dieser Stelle betont werden, dass der definierte Begriff freies PLP durchaus die Bindung an beispielsweise Dopamin oder andere Neurotransmitter zulässt. Im Hippocampus konnte zudem ein deutlicher Unterschied in den freien PLP-Konzentrationen zwischen den Genotypen festgestellt werden. So stellt sich der Anteil des freien PLPs in der PDXP-defizienten Maus um rund 1/3 größer dar als im Wildtyp. Trotz der potenziell größeren Problematik, die eine größere Menge an freiem PLP mit sich bringen kann, sind die KO-Tiere lebensfähig. Der PDXP-Knockout scheint sogar Vorteile mit sich zu bringen. So wiesen die PDXP-defizienten Tiere in Verhaltensstudien verbesserte räumliche Lern- und Gedächtnis-Funktionen auf, die sich vermutlich aus den nachgewiesenen höheren GABA-Leveln der KO-Tiere ergeben. (47) Ein leicht ängstliches Verhalten konnte jedoch für die PDXP-defizienten Tiere festgestellt werden. (47) Der größere Anteil an freiem PLP in der KO-Maus könnte aber die Ursache für die Entwicklung von Pathophysiologien darstellen, die erst unter dem Einfluss erheblicher Stresssituationen zum Vorschein kämen.

7.7 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Die Arbeitsgruppe Gohla konnte bereits demonstrieren, dass die Phosphatase PDXP an der Regulation zellulärer PLP-Konzentrationen von Gehirn, Erythrozyten und Skelettmuskel beteiligt ist, und ein PDXP-Ganzkörperknockout erhöhte PLP-Level aufweist. (47) Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich die erhöhten PLP-Spiegel in Erythrozyten und im Hippocampus bestätigen. Darüber hinaus konnte erstmals eine endogene Phosphatase-Aktivität von PDXP in Erythrozytenlysaten *ex vivo* erfasst werden. Dies eröffnet die Möglichkeit zur Charakterisierung des erythrozytären Vitamin B6-Metabolismus auf einer physiologischeren Ebene verglichen mit *in vitro* Studien. KNOBLOCH ET AL. synthetisierten hydrolysestabile PLP-Analoga, die *in vitro* bereits inhibitorische Wirkung auf die Phosphatase PDXP zeigten. (189) Weiterführende Experimente zur Testung dieser Substanzen wäre nun auch in Erythrozytenlysaten möglich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphatase PDXP nicht an der Mobilisation zellulärer PLPs während Fastenzeiten beteiligt ist. So müssen andere Mechanismen existieren, die eine erythrozytäre PLP-Mobilisation zulassen. Kürzlich identifizierte mechanotransduktive Kationenkanäle, die auf der Erythrozytenmembran exprimiert sind, könnten dafür in Frage kommen. (173, 174) Erste Experimente zur erythrozytären Konversion von Pyridoxin zu Pyridoxal während Nahrungszufuhr lieferten vielversprechende Ergebnisse. Die signifikanten Unterschiede in der PL-Formation zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen machten deutlich, dass die Phosphatase PDXP als *Converter* von PN zu PL in den Erythrozytenlysaten arbeitete. Für humane Erythrozyten wird in der Literatur angenommen, dass konvertiertes Pyridoxal die RBCs verlässt. (82) Auf welche Art und Weise Pyridoxal die Erythrozyten verlässt, ist bisher noch ungeklärt. Auch hierbei könnten wiederum die von den RBCs exprimierten mechanotransduktiven Kationenkanäle eine Rolle spielen. Dazu wären Folge-Experimente mit Aktivierung dieser Kationenkanäle, beispielsweise durch Induktion von Scherstress, und die anschließende Messung der PL-Konzentrationen in Erythrozytenlysaten interessant.

8 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

8.1 Zusammenfassung

Die Phosphatase PDXP (auch bekannt als Chronophin) gehört zur Familie der HAD Phosphatasen, einer ubiquitär exprimierten Enzymklasse mit wichtigen physiologischen Funktionen. PDXP zeigt Phosphatase-Aktivität gegenüber seinem Substrat Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP), der aktivierten Form von Vitamin B6. PDXP-defiziente Mäuse (Knockout-Mäuse) weisen im Vergleich zu Wildtypen verdoppelte PLP-Konzentrationen in Erythrozyten sowie im Gesamthirn auf. (47) Vermutlich kommt PDXP daher eine wichtige Funktion in Erythrozyten und im Hirn zu. Ziel dieser Arbeit war es, erste Einblicke in diese Funktion(en) von PDXP zu erlangen.

Hierzu wurden HPLC-basierte Analysen der erythrozytären PLP-Konzentrationen in Wildtyp- sowie PDXP-defizienten Mäusen durchgeführt. Dabei ließen sich die rund doppelt so hohen erythrozytären PLP-Level in den KO-Mäusen bestätigen. Zudem ist es gelungen, eine Methode zur Messung der endogenen Phosphatase-Aktivität von PDXP in Erythrozytenlysaten zu etablieren. So konnte im Wildtyp anhand der Verringerung der PLP-Konzentrationen pro Zeiteinheit eine erythrozytäre PDXP-Aktivität nachgewiesen werden. Dazu waren die Inkubation mit Pyridoxin, sowie die Anwendung eines Inhibitors der PDXK notwendig. Eine bis dato vermutete Funktion der PDXP, zur Mobilisation von erythrozytärem PLP während Fastenzeiten, konnte ausgeschlossen werden. So zeigte der Vergleich der erythrozytären PLP-Konzentrationen aus gefasteten mit normal gefütterten Tieren in beiden Genotypen exakt dieselbe prozentuale PLP-Verringerung. Während Nahrungszufuhr ließ sich jedoch eine Funktion der Phosphatase PDXP als „*Converter*“ von Pyridoxin zu Pyridoxal erkennen. Ausgehend von PN konnte im Wildtyp (über die Zwischenprodukte PNP und PLP) eine PDXP-abhängige Dephosphorylierung von PLP zu PL erfolgen. So wies der Wildtyp eine rund vierfach höhere PL-Produktion auf, verglichen mit der PDXP-defizienten Maus. Die Phosphatase PDXP erwies sich als essenziell für die erythrozytäre Konversion von Pyridoxin zu Pyridoxal. Dadurch erreicht der Organismus eine metabolische Flexibilität, die ihn bis zu einem gewissen Grad unabhängig von der Nahrungsauswahl macht. Zudem können Zellen oder Organe, denen durch das Fehlen der PNPO, die Konversion zu PLP nicht möglich ist, mit PL versorgt werden.

Aus der hohen Reaktivität von PLP mit umliegenden Nucleophilen ergibt sich eine gewisse Problematik für die Zelle im Umgang mit freiem PLP. So liegt der Großteil des

erythrozytären PLPs gebunden an Proteine (vor allem Hämoglobin) vor. (23, 76) Anhand von Filtern (MWCO, 3000) ließ sich zwischen der hier definiert als „freien“ und der „gebundenen“ Form von PLP differenzieren. So konnten erste Erkenntnisse zur Rolle von PDXP als Determinator freier PLP-Konzentrationen in Erythrozyten und insbesondere im Hippocampus erlangt werden. Im Hippocampus ergaben sich insgesamt deutlich höhere Konzentrationen an freiem PLP als in den Erythrozyten und es bestand zudem ein Unterschied zwischen den Genotypen. So wiesen die KO-Mäuse ~1/3 höhere freie PLP-Konzentrationen im Vergleich zu den Wildtypen auf. Schließlich konnte ein Effekt des Tieralters auf den PLP-Metabolismus festgestellt werden. Sowohl in den Erythrozyten als auch im Hippocampus ergaben sich alterskorrelierte Änderungen ihrer PLP-Konzentrationen. Zudem zeigten Western Blot Analysen altersbedingte Unterschiede ihrer Vitamin B6-Enzymexpressionen. So wiesen ältere Wildtypen im Hippocampus eine fünffach erhöhte PDXP-Expression verglichen mit jüngeren Tieren auf. In den Erythrozytenlysaten hingegen zeigten ältere Tiere beider Genotypen eine rund vierfach geringere PNPO-Expression gegenüber jüngeren Tieren. Die mit dem Alter eintretende physiologische Verringerung der erythrozytären PNPO-Expression würde somit für den Organismus einen Verlust seiner metabolischen Flexibilität bedeuten, die mit der Konversion von PN zu PL einhergeht.

8.2 Summary

The phosphatase PDXP, also called Chronophin, is a member of the ubiquitously expressed HAD-phosphatases, which have some important physiological functions in the organism. Its substrate pyridoxal 5'-phosphate (PLP) is the active form of vitamin B6, an important cofactor of several reactions. PDXP-deficient mice (KO-mice) have PLP-concentrations in erythrocytes and in the whole brain twice as high as wild-type mice. (47) It is assumed that PDXP therefore has an important function in erythrocytes and in the brain. The aim of the study was to gain initial insights into these functions of PDXP.

For this purpose, HPLC-based analyses of the PLP-concentrations in erythrocytes from WT- and KO-mice were carried out. The doubled PLP-levels in the RBCs of KO-mice could be confirmed. In addition, a method for measuring the endogenous phosphatase activity of PDXP in red cell lysates was established. The activity of PDXP could be measured by the reduction of its substrate PLP over time. This required the

incubation with pyridoxine and the inhibition of PDXK by ginkgotoxine. An assumed function of PDXP in mobilization of PL(P) from the erythrocytes in fasting conditions could be ruled out. Therefore, a comparison between the PLP-concentrations in RBCs of fasted mice with normal fed ones was done. Surprisingly the fasted KO-mice showed the same percentaged decrease of cellular PLP-level as the fasted WT-mice. During vitamin B6 intake however, a function of PDXP as being a “converter” of pyridoxine to pyridoxal was found. Starting with PN, a PDXP-mediated dephosphorylation from PLP to PL could take place in the wildtype mice (via the intermediate steps PNP and PLP). Consequently, the WT’s production of PL quadrupled compared to the KO’s. PDXP turned out to be essential for the conversion of pyridoxine to pyridoxal in erythrocytes. This conversion confers some metabolic flexibility to the organism and to a certain extent makes it independent of the choice of food. Moreover, cells and organs, that due to the absence of PNPO cannot produce PL(P) themselves, can be provided via erythrocytes.

The high reactivity of PLP with surrounding nucleophiles poses a certain problem for the cell in dealing with free PLP. The majority of the PLP in RBCs is bound to proteins (primarily hemoglobin). (23, 76) It was distinguished between the here termed “free” PLP and the bound PLP by using filter devices with a MWCO at 3 kDa. First insights could be gained about PDXP as a determinant of free PLP-levels in erythrocytes and hippocampus. The amount of free PLP in the hippocampus was significantly higher than in the RBCs. Additionally, the hippocampus showed some differences in the concentration of free PLP between WT- and KO-mice. The level of free PLP in PDXP deficient mice was one third higher than in wildtype mice. Finally, some correlation between the age of the mice and their PLP-metabolism was found. The results revealed changes of the PLP-concentrations with age in the RBCs and the hippocampus. Moreover, western blot analyses showed some age-related differences in the expression of vitamin B6 enzymes. In the hippocampus older wildtype mice showed a quintupled expression of PDXP compared to younger ones. However, western blot analyses of red blood cell lysates from older animals revealed a lower expression of PNPO by a factor of four. For the organism this physiological reduction of its PNPO expression with age would mean a loss of metabolic flexibility, that is accompanied by the conversion from PN to PL.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abrantes JL, Tornatore TF, Pelizzaro-Rocha KJ, de Jesus MB, Cartaxo RT, Milani R, et al. Crosstalk between kinases, phosphatases and miRNAs in cancer. *Biochimie*. 2014;107 Pt B:167-87.
2. Fontanillo M, Köhn M. Phosphatases: Their Roles in Cancer and Their Chemical Modulators. In: Böldicke T, editor. *Protein Targeting Compounds Advances in Experimental Medicine and Biology*. 917. Heidelberg: Springer, Cham; 2016.
3. Li X, Wilmanns M, Thornton J, Köhn M. Elucidating Human Phosphatase-Substrate Networks. *Science signaling*. 2013;6:rs10.
4. Cohen P. The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol*. 2002;4(5):E127-30.
5. Graves JD, Krebs EG. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther*. 1999;82(2-3):111-21.
6. Barford D, Das AK, Egloff MP. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1998;27:133-64.
7. Sacco F, Perfetto L, Castagnoli L, Cesareni G. The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Lett*. 2012;586(17):2732-9.
8. Bae KH, Kim WK, Lee SC. Involvement of protein tyrosine phosphatases in adipogenesis: new anti-obesity targets? *BMB Rep*. 2012;45(12):700-6.
9. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995;80(2):225-36.
10. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(11):833-46.
11. Gee CE, Mansuy IM. Protein phosphatases and their potential implications in neuroprotective processes. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(10):1120-30.
12. Zhao S, Sedwick D, Wang Z. Genetic alterations of protein tyrosine phosphatases in human cancers. *Oncogene*. 2015;34(30):3885-94.
13. Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(10):514-20.
14. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298(5600):1912-34.
15. Roskoski R. Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66:105-143. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2012;66:105-43.
16. Liberti S, Sacco F, Calderone A, Perfetto L, Iannuccelli M, Panni S, et al. HuPho: the human phosphatase portal. *Febs j*. 2013;280(2):379-87.

17. Chen MJ, Dixon JE, Manning G. Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal*. 2017;10(474).
18. Nishi H, Shaytan A, Panchenko AR. Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Front Genet*. 2014;5:270.
19. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*. 2009;139(3):468-84.
20. Seifried A, Schultz J, Gohla A. Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *Febs j*. 2013;280(2):549-71.
21. Tang X, Benesch MG, Brindley DN. Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology. *J Lipid Res*. 2015;56(11):2048-60.
22. McLennan AG. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(2):123-43.
23. Fonda ML. Purification and characterization of vitamin B6-phosphate phosphatase from human erythrocytes. *J Biol Chem*. 1992;267(22):15978-83.
24. Jang YM, Kim DW, Kang TC, Won MH, Baek NI, Moon BJ, et al. Human pyridoxal phosphatase. Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution. *J Biol Chem*. 2003;278(50):50040-6.
25. Gohla A, Birkenfeld J, Bokoch GM. Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nature Cell Biology*. 2005;7(1):21-9.
26. Gohla A. Do metabolic HAD phosphatases moonlight as protein phosphatases? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019;1866(1):153-66.
27. Wiggan ON, Bernstein BW, Bamberg JR. A phosphatase for cofilin to be HAD. *Nature Cell Biology*. 2005;7(1):8-9.
28. Allen KN, Dunaway-Mariano D. Markers of fitness in a successful enzyme superfamily. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(6):658-65.
29. Burroughs AM, Allen KN, Dunaway-Mariano D, Aravind L. Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases and Allied Enzymes. *Journal of Molecular Biology*. 2006;361(5):1003-34.
30. Allen KN, Dunaway-Mariano D. Catalytic scaffolds for phosphoryl group transfer. *Curr Opin Struct Biol*. 2016;41:172-9.
31. Shin WH, Kihara D. 55 Years of the Rossmann Fold. *Methods Mol Biol*. 2019;1958:1-13.
32. Kestler C. Untersuchungen über die Dimerisierung der HAD-Phosphatase Chronophin [Dissertation]. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2016.

33. Aravind L, Galperin MY, Koonin EV. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends Biochem Sci.* 1998;23(4):127-9.
34. Collet JF, Stroobant V, Van Schaftingen E. Evidence for phosphotransferases phosphorylated on aspartate residue in N-terminal DXDX(T/V) motif. *Methods Enzymol.* 2002;354:177-88.
35. Peisach E, Selengut JD, Dunaway-Mariano D, Allen KN. X-ray crystal structure of the hypothetical phosphotyrosine phosphatase MDP-1 of the haloacid dehalogenase superfamily. *Biochemistry.* 2004;43(40):12770-9.
36. Kestler C, Knobloch G, Tessmer I, Jeanclos E, Schindelin H, Gohla A. Chronophin dimerization is required for proper positioning of its substrate specificity loop. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289(5):3094-103.
37. Lahiri SD, Zhang G, Dai J, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Analysis of the substrate specificity loop of the HAD superfamily cap domain. *Biochemistry.* 2004;43(10):2812-20.
38. Seifried A, Knobloch G, Duraphe PS, Segerer G, Manhard J, Schindelin H, et al. Evolutionary and structural analyses of mammalian haloacid dehalogenase-type phosphatases AUM and chronophin provide insight into the basis of their different substrate specificities. *J Biol Chem.* 2014;289(6):3416-31.
39. Percudani R, Peracchi A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.* 2003;4(9):850-4.
40. Jansonius JN. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 1998;8(6):759-69.
41. Rassow J. Abbau von Proteinen und Aminosäuren. Duale Reihe Biochemie. 3. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. 146-7.
42. Bras NF, Fernandes PA, Ramos MJ. Understanding the Rate-Limiting Step of Glycogenolysis by Using QM/MM Calculations on Human Glycogen Phosphorylase. *ChemMedChem.* 2018;13(15):1608-16.
43. John RA. Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1248(2):81-96.
44. Keil C, Sabrow M. Blut und Immunsystem. MEDI-LEARN Skriptenreihe Biochemie. 4. Marburg: MEDI-LEARN Verlag GbR; 2011.
45. Adam M. Hormone, Vitamine und Coenzyme. MEDI-LEARN Skriptenreihe Biochemie. 4. Marburg: MEDI-LEARN Verlag GbR; 2011.
46. Mooney S, Leuendorf JE, Hendrickson C, Hellmann H. Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity. *Molecules.* 2009;14(1):329-51.
47. Jeanclos E, Albersen M, Ramos RJJ, Raab A, Wilhelm C, Hommers L, et al. Improved cognition, mild anxiety-like behavior and decreased motor performance in pyridoxal phosphatase-deficient mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(1):193-205.

48. Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cellular Signalling*. 2013;25(2):457-69.
49. Ostrowska Z, Moraczewska J. Cofilin - a protein controlling dynamics of actin filaments. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71(0):339-51.
50. Shishkin S, Eremina L, Pashintseva N, Kovalev L, Kovaleva M. Cofilin-1 and Other ADF/Cofilin Superfamily Members in Human Malignant Cells. *Int J Mol Sci*. 2016;18(1).
51. Hauser K. *Zytoskelett. Duale Reihe Biochemie*. 3. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. 376-7.
52. Andrianantoandro E, Pollard TD. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell*. 2006;24(1):13-23.
53. Bailly M, Jones GE. Polarised Migration: Cofilin Holds the Front. *Current Biology*. 2003;13(4):R128-R30.
54. Ambach A, Saunus J, Konstandin M, Wesselborg S, Meuer SC, Samstag Y. The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2000;30(12):3422-31.
55. Tomasella A, Blangy A, Brancolini C. A receptor-interacting protein 1 (RIP1)-independent necrotic death under the control of protein phosphatase PP2A that involves the reorganization of actin cytoskeleton and the action of cofilin-1. *J Biol Chem*. 2014;289(37):25699-710.
56. Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T. Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T.. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108: 233-246. *Cell*. 2002;108:233-46.
57. Ma G, Ren Y, Wang K, He J. SRC-3 has a role in cancer other than as a nuclear receptor coactivator. *Int J Biol Sci*. 2011;7(5):664-72.
58. Deutzmann R. *Mechanismen der Signaltransduktion. duale Reihe biochemie*. 3. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. 553-4.
59. Li C, Liang YY, Feng XH, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover. *Mol Cell*. 2008;31(6):835-49.
60. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*. 2005;446(5):475-82.
61. Wu RC, Qin J, Hashimoto Y, Wong J, Xu J, Tsai SY, et al. Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol*. 2002;22(10):3549-61.
62. Coste A, Antal MC, Chan S, Kastner P, Mark M, O'Malley BW, et al. Absence of the steroid receptor coactivator-3 induces B-cell lymphoma. *Embo j*. 2006;25(11):2453-64.

63. di Salvo ML, Contestabile R, Safo MK. Vitamin B(6) salvage enzymes: mechanism, structure and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1814(11):1597-608.
64. Ink SL, Henderson LM. Vitamin B6 metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1984;4:455-70.
65. Clayton PT. B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(2-3):317-26.
66. Drewke C, Klein M, Clade D, Arenz A, Muller R, Leistner E. 4-O-phosphoryl-L-threonine, a substrate of the pdxC(serC) gene product involved in vitamin B6 biosynthesis. *FEBS Lett*. 1996;390(2):179-82.
67. Tambasco-Studart M, Tews I, Amrhein N, Fitzpatrick TB. Functional analysis of PDX2 from Arabidopsis, a glutaminase involved in vitamin B6 biosynthesis. *Plant Physiol*. 2007;144(2):915-25.
68. Tambasco-Studart M, Titiz O, Raschle T, Forster G, Amrhein N, Fitzpatrick TB. Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13687-92.
69. Albersen M, Bosma M, Knoers NV, de Ruiter BH, Diekman EF, de Ruijter J, et al. The intestine plays a substantial role in human vitamin B6 metabolism: a Caco-2 cell model. *PLoS One*. 2013;8(1):e54113.
70. Booth CC, Brain MC. The absorption of tritium-labelled pyridoxine hydrochloride in the rat. *J Physiol*. 1962;164:282-94.
71. Hamm MW, Mehansho H, Henderson LM. Transport and metabolism of pyridoxamine and pyridoxamine phosphate in the small intestine of the rat. *J Nutr*. 1979;109(9):1552-9.
72. Said HM, Ortiz A, Ma TY. A carrier-mediated mechanism for pyridoxine uptake by human intestinal epithelial Caco-2 cells: regulation by a PKA-mediated pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(5):C1219-25.
73. Said ZM, Subramanian VS, Vaziri ND, Said HM. Pyridoxine uptake by colonocytes: a specific and regulated carrier-mediated process. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294(5):C1192-7.
74. Mehansho H, Buss DD, Hamm MW, Henderson LM. Transport and metabolism of pyridoxine in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1980;631(1):112-23.
75. Fonda ML, Trauss C, Guempel UM. The binding of pyridoxal 5'-phosphate to human serum albumin. *Arch Biochem Biophys*. 1991;288(1):79-86.
76. Ink SL, Henderson LM. Effect of binding to hemoglobin and albumin on pyridoxal transport and metabolism. *J Biol Chem*. 1984;259(9):5833-7.
77. Fonda ML, Eggers DK, Auerbach S, Fritsch L. Vitamin B-6 metabolism in the brains of young adult and senescent mice. *Exp Gerontol*. 1980;15(5):473-9.
78. Spector R, Greenwald LL. Transport and metabolism of vitamin B6 in rabbit brain and choroid plexus. *J Biol Chem*. 1978;253(7):2373-9.

79. Tiselius HG. Metabolism of tritium-labelled pyridoxine and pyridoxine 5'-phosphate in the central nervous system. *J Neurochem.* 1973;20(4):937-46.
80. Ebadi M. Regulation and function of pyridoxal phosphate in CNS. *Neurochem Int.* 1981;3(3-4):181-205.
81. Lyon JB, Jr., Bain JA, Williams HL. The distribution of vitamin B6 in the tissues of two inbred strains of mice fed complete and vitamin B6-deficient rations. *J Biol Chem.* 1962;237:1989-91.
82. Anderson BB, Fulford-Jones CE, Child JA, Beard ME, Bateman CJ. Conversion of vitamin B 6 compounds to active forms in the red blood cell. *J Clin Invest.* 1971;50(9):1901-9.
83. Whyte MP, Mahuren JD, Fedde KN, Cole FS, McCabe ER, Coburn SP. Perinatal hypophosphatasia: tissue levels of vitamin B6 are unremarkable despite markedly increased circulating concentrations of pyridoxal-5'-phosphate. Evidence for an ectoenzyme role for tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Clin Invest.* 1988;81(4):1234-9.
84. Gao GJ, Fonda ML. Kinetic analysis and chemical modification of vitamin B6 phosphatase from human erythrocytes. *J Biol Chem.* 1994;269(10):7163-8.
85. Whyte MP, Mahuren JD, Vrabell LA, Coburn SP. Markedly increased circulating pyridoxal-5'-phosphate levels in hypophosphatasia. Alkaline phosphatase acts in vitamin B6 metabolism. *The Journal of clinical investigation.* 1985;76(2):752-6.
86. Fujimoto S, Urata Y, Nakagawa T, Ohara A. Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex. *J Biochem.* 1984;96(4):1079-88.
87. Panara F, Angiolillo A, Pascolini R. Acid phosphatases from liver of *Rana esculenta*. Subcellular localization and partial characterization of multiple forms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry.* 1989;93(4):877-82.
88. Murakami K, Fujimoto S, Ohara A. Subcellular localization and some properties of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from rat liver. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1986;34(8):3320-7.
89. Saraswathi S, Bachhawat BK. Phosphatases from human brain. I. Purification and properties of pyridoxal phosphate phosphatase. *J Neurochem.* 1963;10:127-33.
90. Mills PB, Camuzeaux SSM, Footitt EJ, Mills KA, Gissen P, Fisher L, et al. Epilepsy due to PNPO mutations: genotype, environment and treatment affect presentation and outcome. *Brain : a journal of neurology.* 2014;137(Pt 5):1350-60.

91. Mills PB, Surtees RAH, Champion MP, Beesley CE, Dalton N, Scambler PJ, et al. Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(8):1077-86.
92. Farrant RD, Walker V, Mills GA, Mellor JM, Langley GJ. Pyridoxal phosphate de-activation by pyrroline-5-carboxylic acid. Increased risk of vitamin B6 deficiency and seizures in hyperprolinemia type II. *J Biol Chem*. 2001;276(18):15107-16.
93. Tapia R, Sandoval ME, Contreras P. Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J Neurochem*. 1975;24(6):1283-5.
94. Wiechert P, Herbst A. Provocation of cerebral seizures by derangement of the natural balance between glutamic acid and gamma-aminobutyric acid. *J Neurochem*. 1966;13(2):59-64.
95. Salazar P, Tapia R. Seizures induced by intracerebral administration of pyridoxal-5'-phosphate: effect of GABAergic drugs and glutamate receptor antagonists. *Neuropharmacology*. 2001;41(5):546-53.
96. Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci*. 2007;30(1):1-8.
97. Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(40):14515-20.
98. Lieberwirth C, Pan Y, Liu Y, Zhang Z, Wang Z. Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory. *Brain Res*. 2016;1644:127-40.
99. Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, McDonald MP. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)*. 2006;13(6):809-19.
100. Rudolph U, Möhler H. Analysis of GABAA Receptor Function and Dissection of the Pharmacology of Benzodiazepines and General Anesthetics Through Mouse Genetics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2004;44(1):475-98.
101. Kim JE, Kim YJ, Lee DS, Kim JY, Ko AR, Hyun HW, et al. PLPP/CIN regulates bidirectional synaptic plasticity via GluN2A interaction with postsynaptic proteins. *Sci Rep*. 2016;6:26576.
102. McQuail JA, Frazier CJ, Bizon JL. Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling. *Trends Mol Med*. 2015;21(7):450-60.
103. Gallagher M, Burwell R, Burchinal M. Severity of spatial learning impairment in aging: Development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci*. 2015;129(4):540-8.

104. Bizon JL, LaSarge CL, Montgomery KS, McDermott AN, Setlow B, Griffith WH. Spatial reference and working memory across the lifespan of male Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging*. 2009;30(4):646-55.
105. Rapp PR, Gallagher M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9926-30.
106. Rasmussen T, Schliemann T, Sorensen JC, Zimmer J, West MJ. Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol Aging*. 1996;17(1):143-7.
107. Rozycka A, Liguz-Leczna M. The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse. *Aging Cell*. 2017;16(4):634-43.
108. Stanley DP, Shetty AK. Aging in the rat hippocampus is associated with widespread reductions in the number of glutamate decarboxylase-67 positive interneurons but not interneuron degeneration. *J Neurochem*. 2004;89(1):204-16.
109. Spiegel AM, Koh MT, Vogt NM, Rapp PR, Gallagher M. Hilar interneuron vulnerability distinguishes aged rats with memory impairment. *J Comp Neurol*. 2013;521(15):3508-23.
110. Wilson IA, Ikonen S, Gallagher M, Eichenbaum H, Tanila H. Age-associated alterations of hippocampal place cells are subregion specific. *J Neurosci*. 2005;25(29):6877-86.
111. Miller JW, Green R, Mungas DM, Reed BR, Jagust WJ. Homocysteine, vitamin B6, and vascular disease in AD patients. *Neurology*. 2002;58(10):1471-5.
112. de Jager CA, Oulhaj A, Jacoby R, Refsum H, Smith AD. Cognitive and clinical outcomes of homocysteine-lowering B-vitamin treatment in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2012;27(6):592-600.
113. Macpherson H, Ellis KA, Sali A, Pipingas A. Memory improvements in elderly women following 16 weeks treatment with a combined multivitamin, mineral and herbal supplement: A randomized controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;220(2):351-65.
114. Harris E, Macpherson H, Vitetta L, Kirk J, Sali A, Pipingas A. Effects of a multivitamin, mineral and herbal supplement on cognition and blood biomarkers in older men: a randomised, placebo-controlled trial. *Hum Psychopharmacol*. 2012;27(4):370-7.
115. Harris E, Macpherson H, Pipingas A. Improved blood biomarkers but no cognitive effects from 16 weeks of multivitamin supplementation in healthy older adults. *Nutrients*. 2015;7(5):3796-812.
116. Jannusch K, Jockwitz C, Bidmon HJ, Moebus S, Amunts K, Caspers S. A Complex Interplay of Vitamin B1 and B6 Metabolism with Cognition, Brain Structure, and Functional Connectivity in Older Adults. *Front Neurosci*. 2017;11:596.

117. Minetti G, Egee S, Morsdorf D, Steffen P, Makhro A, Achilli C, et al. Red cell investigations: art and artefacts. *Blood Rev.* 2013;27(2):91-101.
118. Achilli C, Ciana A, Balduini C, Risso A, Minetti G. Application of gelatin zymography for evaluating low levels of contaminating neutrophils in red blood cell samples. *Anal Biochem.* 2011;409(2):296-7.
119. Srivastava SK, Beutler E. A new fluorometric method for the determination of pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim Biophys Acta.* 1973;304(3):765-73.
120. Talwar D, Quasim T, McMillan DC, Kinsella J, Williamson C, O'Reilly DSJ. Optimisation and validation of a sensitive high-performance liquid chromatography assay for routine measurement of pyridoxal 5-phosphate in human plasma and red cells using pre-column semicarbazide derivatisation. *Journal of Chromatography B.* 2003;792(2):333-43.
121. Meyer VR. The chromatographic process. *Practical High-Performance Liquid Chromatography.* 5. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.; 2010. 17-9
122. Meyer VR. Qualitative analysis. *Practical High-Performance Liquid Chromatography.* 5. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.; 2010. 285-6.
123. Meyer VR. Liquid chromatographic separation modes. *Practical High-Performance Liquid Chromatography.* 5. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.; 2010. 8-9.
124. Meyer VR. Reversed-phase chromatography. *Practical High-Performance Liquid Chromatography.* 5. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.; 2010. 173-5.
125. Meyer VR. Solvent selectivity. *Practical High-Performance Liquid Chromatography.* 5. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd. ; 2010. 83.
126. Meyer VR. Precolumns. *Practical High-Performance Liquid Chromatography.* 5. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.; 2010. 119-20.
127. Meyer VR. The HPLC instrument. *Practical High-Performance Liquid Chromatography.* 5. United Kingdom: John wiley & Sons Ltd.; 2010. 9-10.
128. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics : integrated biometal science.* 2014;6(5):1068-78.
129. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 *Nature Publishing Group* 1970;227.
130. Goetz H, Kuschel M, Wulff T, Sauber C, Miller C, Fisher S, et al. Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 2004;60(3):281-93.

131. Rehm H, Letzel T. SDS-Gele. In: Rehm H, Letzel T, editors. Der Experimentator Proteinbiochemie / Proteinbiochemics. 6: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
132. Zeeck C. Western Blot Eine Einführung zu den Prinzipien mit hilfreichen Tipps: abcam; 2013 [25.06.2019]. Available from: <http://docs.abcam.com/pdf/events/German-WB-Webinar-15-Jan.pdf>.
133. Sigma-Aldrich. Sicherheitsdatenblatt Ponceau S. Sigma-Aldrich Co.; 2018.
134. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. Biotechnology. 1992;24:145-9.
135. Western Blot: LUMITOS AG; [25.06.2019]. Available from: https://www.chemie.de/lexikon/Western_Blot.html.
136. Ludwig Boltzmann Institut. Western Blot 2014 [28.08.2019]. Available from: https://heart.lbg.ac.at/sites/files/heart/handoutlbihf_westernblot.pdf.
137. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Immunoblotting in the clinical laboratory. J Clin Chem Clin Biochem. 1989;27(8):495-501.
138. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Biochemie des Blutes. In: Rassow J, editor. Duale Reihe Biochemie. 3: Thieme; 2012. 737.
139. Winter CG, Christensen HN. Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte. J Biol Chem. 1964;239:872-8.
140. Ellinger JJ, Lewis IA, Markley JL. Role of aminotransferases in glutamate metabolism of human erythrocytes. J Biomol NMR. 2011;49(3-4):221-9.
141. Cayman Chemical Company. Glutathione Assay Kit: Cayman Chemical Company; 2016 [25.06.2019]. Available from: <https://www.caymanchem.com/pdfs/703002.pdf>.
142. Baker M, Cerniglia G, Zaman A. Microtiter Plate Assay for the Measurement of Glutathione and Glutathione Disulfide in Large Numbers of Biological Samples. Analytical biochemistry. 1990;190:360-5.
143. Eyer P, Podhradsky D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. Anal Biochem. 1986;153(1):57-66.
144. Raftos JE, Dwarte TM, Luty A, Willcock CJ. Direct measurement of the rate of glutathione synthesis in 1-chloro-2,4-dinitrobenzene treated human erythrocytes. Redox Rep. 2006;11(1):9-14.
145. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Biochemie des Blutes, Transport von O₂ und CO₂ im Blut. In: Rassow J, editor. Duale Reihe Biochemie. 3: Thieme; 2012. 736-7.
146. Goc Z, Szaroma W, Kapusta E, Dziubek K. Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP. Chin J Physiol. 2017;60(1):1-10.

147. Giustarini D, Dalle-Donne I, Milzani A, Fanti P, Rossi R. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nat Protoc.* 2013;8(9):1660-9.
148. Lumeng L, Li TK. Vitamin B6 metabolism in chronic alcohol abuse. Pyridoxal phosphate levels in plasma and the effects of acetaldehyde on pyridoxal phosphate synthesis and degradation in human erythrocytes. *J Clin Invest.* 1974;53(3):693-704.
149. Raabe BM, Artwohl JE, Purcell JE, Lovaglio J, Fortman JD. Effects of weekly blood collection in C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011;50(5):680-5.
150. Whittaker JW. Intracellular trafficking of the pyridoxal cofactor. Implications for health and metabolic disease. *Arch Biochem Biophys.* 2016;592:20-6.
151. Mehansho H, Henderson LM. Transport and accumulation of pyridoxine and pyridoxal by erythrocytes. *J Biol Chem.* 1980;255(24):11901-7.
152. Westheimer FH. Why nature chose phosphates. *Science.* 1987;235(4793):1173-8.
153. Kastner U, Hallmen C, Wiese M, Leistner E, Drewke C. The human pyridoxal kinase, a plausible target for ginkgotoxin from *Ginkgo biloba*. *FEBS J.* 2007;274(4):1036-45.
154. Leistner E, Drewke C. *Ginkgo biloba* and ginkgotoxin. *J Nat Prod.* 2010;73(1):86-92.
155. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Triebkraft und Geschwindigkeit biochemischer Reaktionen. In: Rassow J, editor. *Duale Reihe Biochemie.* 3: Thieme; 2012. 24-5.
156. McCormick DB, Gregory ME, Snell EE. Pyridoxal phosphokinases. I. Assay, distribution, I. Assay, distribution, purification, and properties. *J Biol Chem.* 1961;236:2076-84.
157. Ngo EO, LePage GR, Thanassi JW, Meisler N, Nutter LM. Absence of pyridoxine-5'-phosphate oxidase (PNPO) activity in neoplastic cells: isolation, characterization, and expression of PNPO cDNA. *Biochemistry.* 1998;37(21):7741-8.
158. Kang JH, Hong ML, Kim DW, Park J, Kang TC, Won MH, et al. Genomic organization, tissue distribution and deletion mutation of human pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Eur J Biochem.* 2004;271(12):2452-61.
159. Darin N, Reid E, Prunetti L, Samuelsson L, Husain RA, Wilson M, et al. Mutations in PROSC Disrupt Cellular Pyridoxal Phosphate Homeostasis and Cause Vitamin-B6-Dependent Epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2016;99(6):1325-37.
160. Fonda ML, Zhang YN. Kinetic mechanism and divalent metal activation of human erythrocyte pyridoxal phosphatase. *Arch Biochem Biophys.* 1995;320(2):345-52.

161. Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry*. 2011;50(39):8264-9.
162. Curth H. Enzymkinetik. MEDI-LEARN Skriptenreihe Biochemie. 4. Marburg: Medi-Learn Verlag; 2011.
163. Knobloch G. Biochemical and structural characterization of chronophin. [Dissertation] Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2014.
164. Göhring J. Studie über den Einfluss von Zentrifugation auf die Hämolyserate bestrahlter Erythrozyten [Dissertation]. Erlangen Nürnberg: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen Nürnberg; 2015.
165. Vörös E, Piety NZ, Strachan BC, Lu M, Shevkoplyas SS. Centrifugation-free washing: A novel approach for removing immunoglobulin A from stored red blood cells. *American journal of hematology*. 2018;93(4):518-26.
166. Smith GP, Sharp G, Peters TJ. Isolation and characterization of alkaline phosphatase-containing granules (phosphasomes) from human polymorphonuclear leucocytes. *J Cell Sci*. 1985;76:167-78.
167. Kyaw A. A nuclear phosphatase that specifically hydrolyzes pyridoxal 5'-phosphate in mouse liver. *Biochem Med*. 1980;24(1):27-32.
168. Richard JP, Amyes TL, Crugeiras J, Rios A. Pyridoxal 5'-phosphate: electrophilic catalyst extraordinaire. *Curr Opin Chem Biol*. 2009;13(4):475-83.
169. Fonda ML, Harker CW. Metabolism of pyridoxine and protein binding of the metabolites in human erythrocytes. *Am J Clin Nutr*. 1982;35(6):1391-9.
170. Fux A, Sieber SA. Biochemical and Proteomic Studies of Human Pyridoxal 5'-Phosphate-Binding Protein (PLPBP). *ACS Chem Biol*. 2020;15(1):254-61.
171. Flanagan JM, Beutler E. The genetic basis of human erythrocyte pyridoxal kinase activity variation. *Haematologica*. 2006;91(6):801-4.
172. Conversion of vitamin B 6 compounds in human red blood cells. *Nutr Rev*. 1972;30(5):119-21.
173. Cinar E, Zhou S, DeCoursey J, Wang Y, Waugh RE, Wan J. Piezo1 regulates mechanotransductive release of ATP from human RBCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(38):11783-8.
174. Cahalan SM, Lukacs V, Ranade SS, Chien S, Bandell M, Patapoutian A. Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *eLife*. 2015;4:e07370.
175. Hamfelt A. Pyridoxal kinase activity in blood cells. *Clin Chim Acta*. 1967;16(1):7-18.
176. Carter TC, Pangilinan F, Molloy AM, Fan R, Wang Y, Shane B, et al. Common Variants at Putative Regulatory Sites of the Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Gene Influence Circulating Pyridoxal 5'-Phosphate Concentration in Healthy Adults. *J Nutr*. 2015;145(7):1386-93.

177. Lumeng L, Lui A, Li TK. Plasma content of B6 vitamers and its relationship to hepatic vitamin B6 metabolism. *J Clin Invest.* 1980;66(4):688-95.
178. di Salvo ML, Safo MK, Contestabile R. Biomedical aspects of pyridoxal 5'-phosphate availability. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;4:897-913.
179. Atkins CG, Buckley K, Blades MW, Turner RFB. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components. *Appl Spectrosc.* 2017;71(5):767-93.
180. AMBOSS GmbH. Blut und Blutzellen - Wissen für Mediziner: AMBOSS GmbH; 2019 [11.01.2020]. Available from: https://www.amboss.com/de/wissen/blut_und_blutzellen.
181. Danielczok JG, Terriac E, Hertz L, Petkova-Kirova P, Lautenschlager F, Laschke MW, et al. Red Blood Cell Passage of Small Capillaries Is Associated with Transient Ca(2+)-mediated Adaptations. *Front Physiol.* 2017;8:979.
182. Sun C, Migliorini C, Munn LL. Red blood cells initiate leukocyte rolling in postcapillary expansions: a lattice Boltzmann analysis. *Biophys J.* 2003;85(1):208-22.
183. Fukuwatari T, Wada H, Shibata K. Age-related alterations of B-group vitamin contents in urine, blood and liver from rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2008;54(5):357-62.
184. Hamfelt A. Age variation of vitamin B6 metabolism in man. *Clin Chim Acta.* 1964;10:48-54.
185. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet.* 1995;11(1):45-51.
186. Rose CS, Gyorgy P, Butler M, Andres R, Norris AH, Shock NW, et al. Age differences in vitamin B6 status of 617 men. *Am J Clin Nutr.* 1976;29(8):847-53.
187. Miguez JM, Aldegunde M, Paz-Valinas L, Recio J, Sanchez-Barcelo E. Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J Neural Transm (Vienna).* 1999;106(11-12):1089-98.
188. Santiago M, Machado A, Reinoso-Suarez F, Cano J. Changes in biogenic amines in rat hippocampus during development and aging. *Life Sci.* 1988;42(24):2503-8.
189. Knobloch G, Jabari N, Stadlbauer S, Schindelin H, Kohn M, Gohla A. Synthesis of hydrolysis-resistant pyridoxal 5'-phosphate analogs and their biochemical and X-ray crystallographic characterization with the pyridoxal phosphatase chronophin. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(12):2819-27.

10 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an Frau Prof. Dr. Antje Gohla aussprechen, die mir die Möglichkeit eröffnet hat, an diesem Thema zu arbeiten. Vielen Dank für Ihre stetige Unterstützung und die vielen hilfreichen Anregungen und Tipps. Zu jeder Zeit stand mir ihre Tür offen und ich konnte immer auf ihre Unterstützung zählen. Danke, dass Sie mich durch dieses Projekt von Anfang bis Ende begleitet haben. Es ist einfach spitze, wie sie Ihre unglaubliche fachliche Kompetenz mit einer so menschlich warmherzigen Art vereinen. Ich bin froh, eine so tolle Doktormama haben zu dürfen 😊

Frau Dr. Elisabeth Jeanclos danke ich besonders für Ihre außerordentliche Betreuung während des ganzen Projekts! Sie waren mir eine unglaubliche Lehrerin in sämtlichen Bereichen, von der Themeneinarbeitung, über theoretische und praktische Grundlagen im Labor bis hin zur Diskussion über Ergebnisse. Sie standen mir immer mit ihrem fachlichen Rat und Tat zur Seite, auch wenn mal etwas nicht so lief, wie geplant. Danke für ihre große Geduld mit mir, gerade in der Einarbeitungsphase, in der man als Zahnmediziner zunächst fachfremd ist. J'ai eu le plaisir de collaborer avec vous. Merci beaucoup!

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Harald Schulze für die Mitbetreuung meiner Promotion. Von Beginn zeigten Sie großes Interesse an dem Projekt und verfolgten stets die Fortschritte. Auch zur abschließenden Vorstellung meiner Ergebnisse haben Sie sich Zeit genommen und gaben mir hilfreiche Ideen und Ratschläge an die Hand. Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Kolleginnen Angelika Keller, Kerstin Hadamek und Martina Fischer aus der AG Gohla. Ihr habt mich zu jeder Zeit im Laboralltag unterstützt und in die grundlegenden Methoden eingearbeitet. Eure mentale Unterstützung durch die gemeinsamen Kaffee und Mittagspausen haben mich gerade in den Schreibphasen wahnsinnig getragen. Seit dem ersten Tag wurde ich von allen in die Arbeitsgruppe integriert, sodass ich immer das Gefühl hatte dazuzugehören. Ich glaube es ist nicht zu viel, zu sagen, dass ich in meinen Betreuern und Kollegen Freunde gefunden habe. **VIELEN HERZLICHEN DANK ♥**

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Eduard und Hildegard sowie meinen Geschwistern Andreas und Marion bedanken, die mich während meines ganzen Studiums und dieser Arbeit stetig unterstützt und mir Halt gegeben haben. Ein herzlicher Dank geht auch an meine Freundin Sarah, die mir immer zur Seite stand. **DANKE**

11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG / AFFIDAVIT

11.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

„Rolle der Pyridoxal 5´-Phosphat Phosphatase PDXP im Vitamin B6-Metabolismus muriner Erythrozyten und Hippocampi“

eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, _____

Datum

Unterschrift

11.2 Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled

”Role of the pyridoxal 5´-phosphate phosphatase PDXP in the vitamin B6-metabolism of murine erythrocytes and hippocampi“

is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted a part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, _____

Date

Signature