

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

Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Kristina Lorenz

**Biochemische und strukturbiochemische Charakterisierung der Inhibition der
Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase durch 7,8-Dihydroxyflavon**



Inauguraldissertation

**Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christoph Zink

aus Rosenheim

Würzburg, Juli 2021

Referentin: Prof. Dr. Antje Gohla

Korreferent: Prof. Dr. Hermann Schindelin

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2021

Der Promovend ist Zahnarzt

Meinen Eltern & Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. HAD-Phosphatasen	1
1.1.1. Struktureller Aufbau	1
1.1.2. Reaktionsmechanismus.....	3
1.1.3. Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase (PDXP).....	4
1.2. Substrate von PDXP	5
1.2.1. Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP)	5
1.2.2. Phospho-Cofilin	8
1.2.3. Steroid-Rezeptor-Koaktivator-3 (SRC-3) und weitere putative PDXP- Proteinsubstrate.....	9
1.3. Rolle von PDXP im Vitamin B6-Metabolismus als Grundlage für die pharmakologische Inhibition von PDXP.....	10
1.4. Hochdurchsatz-Screening zur Ermittlung eines PDXP-Inhibitors.....	12
1.5. Literaturrecherche zu 7,8-Dihydroxyflavon.....	13
1.6. Fragestellung	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Oligonukleotide	17
2.1.3 Plasmide.....	18
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.5 Technische Geräte.....	18
2.1.6 Enzyme, Substrate und Inhibitoren.....	20
2.1.7 Kristallisationsscreens	21
2.1.8 Software und Webseiten	21
2.1.9 Sonstiges	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 SDS-PAGE	22
2.2.2 PCR und Klonierung der PDXP-Mutanten.....	23
2.2.3 Transformation.....	26
2.2.4 Proteinexpression.....	26

2.2.5	Proteinreinigung.....	27
2.2.6	Messung der Proteinkonzentration	29
2.2.7	Messung der Aktivität der Phosphatasen.....	29
2.2.8	Grundlagen der Proteinkristallisation	33
2.2.9	Statistik	36
3.	Ergebnisse.....	37
3.1.	<i>In-vitro</i> Aktivitäts-Assays zur Charakterisierung der 7,8-DHF-vermittelten PDXP-Inhibition.....	37
3.1.1.	Enzymkinetische Aktivitätsbestimmung	37
3.1.2.	Inhibition der PDXP-Aktivität durch 7,8-DHF	38
3.1.3.	Untersuchung der Selektivität von 7,8-DHF als PDXP-Inhibitor	41
3.2.	Ergebnisse der Proteinkristallisation.....	44
3.2.1.	Analyse des aktiven Zentrums von PDXP.....	48
3.2.2.	Analyse der Koordinierung von 7,8-DHF	51
3.2.3.	Validierung der Kristallisationsergebnisse mittels PDXP-Mutanten	56
4.	Diskussion.....	59
4.1.	Inhibition der PDXP-Aktivität durch 7,8-DHF <i>in-vitro</i>	59
4.2.	Einfluss der Koordinierung von 7,8-DHF auf die inhibitorische Wirkstärke	61
4.3.	Modus der Inhibition.....	62
4.4.	Selektivität der Inhibition.....	63
4.5.	Erklärungsmodell für das Ausbleiben der 7,8-DHF-Bindung am zweiten Protomer des Homodimers PDXP in DS6	64
4.6.	Das Wechselspiel zwischen dem BDNF-Signalweg und dem GABAergen System	68
4.7.	Einordnung der Ergebnisse und Ausblick.....	69
5.	Zusammenfassung	71
6.	Summary	73
7.	Literaturverzeichnis	74
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	83
9.	Abbildungsverzeichnis.....	85
10.	Tabellenverzeichnis	87
11.	Anhang.....	88

Danksagung	90
Eidesstattliche Erklärung / Affidavit	91
Lebenslauf	92

1. Einleitung

1.1. HAD-Phosphatasen

Ein gemeinsames Merkmal aller Lebewesen ist der Stoffwechsel. An dem Ablauf und der Regulation von Stoffwechselreaktionen sind Enzyme als Biokatalysatoren essenziell beteiligt. Es ist bekannt, dass Enzyme chemische Reaktionen um das 10^{17} -fache beschleunigen können [1]. In der EC-Klassifikation der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)* sind derzeit mehr als 5000 Enzyme klassifiziert, die in verschiedene Enzymfamilien und Unterkategorien unterteilt sind [2]. Eine große Enzymklasse, der mehr als 450.000 Sequenzen und 33 Unterfamilien zugeschrieben werden, ist die Halogensäuredehalogenase (*Haloacid Dehalogenase*, HAD) -Superfamilie der Hydrolasen [3]. Vertreter dieser Enzymklasse kommen in jeder Zelle und in allen drei Domänen des Lebens vor [4]. Im menschlichen Genom konnten 183 DNA-Sequenzen mit Zugehörigkeit zur HAD-Familie nachgewiesen werden [4]. Diese Enzyme katalysieren den Transfer von Kohlenstoff oder Phosphorylgruppen [5], wobei der Anteil der Phosphatasen (Phosphatmonoesterhydrolasen) zahlenmäßig mit Abstand der größte ist und bei circa 79 % liegt [4]. ATPasen (Phosphoanhydridhydrolasen), die ebenfalls den Transfer einer Phosphorylgruppe katalysieren, machen circa 20 % aller Enzyme der HAD-Familie aus. Reversible Phosphorylierungen spielen in der Zelle bei der Regulation von biologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Für diese fundamentale Erkenntnis erhielten Edmund Fischer und Edwin Krebs im Jahr 1992 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Phosphorylierungen funktionieren dabei als eine Art chemischer Griff für die Bindung von Metaboliten an ein Enzym oder können als Erkennungselement für die Interaktion von Proteinen untereinander wirken [4], wodurch diese aktiviert beziehungsweise deaktiviert werden. In diesem Kapitel soll der grundlegende strukturelle Aufbau von HAD-Phosphatasen und deren Reaktionsmechanismus näher beleuchtet werden, im Anschluss wird näher auf die HAD-Phosphatase Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase (PDXP) eingegangen.

1.1.1. Struktureller Aufbau

HAD-Phosphatasen zeigen generell stark unterschiedliche Gensequenzen. Dennoch konnte mithilfe kristallographischer Strukturdaten von pro- und eukaryontischen HAD-Phosphatasen gezeigt werden, dass alle die gleiche strukturelle Anordnung der aktiven

„core“-Domäne (engl. *core*: Kern) aufweisen [6]. Dabei besteht eine spezifische Reihenfolge von α -Helices und β -Faltblättern, die als modifizierte Rossmann-Faltung bezeichnet wird [7]. Hier bilden repetitive Einheiten aus α -Helices und β -Strängen eine dreilagige Schichtung, deren zentrales Blatt aus mindestens fünf parallelen β -Faltblättern besteht, die wiederum vier Schleifen räumlich orientieren [5]. Diese vier Schleifen enthalten die vier HAD-Motive, welche die katalytischen Reste enthalten und zusammen das aktive Zentrum des Enzyms bilden. Beim Vorliegen dieser vier kurzen, charakteristischen Aminosäureabfolgen können Enzyme anhand ihrer Primärstruktur der HAD-Superfamilie zugeordnet werden [5, 7].

Zusätzlich zur rosmannoiden Faltung der Kerndomäne verfügen HAD-Phosphatasen über drei weitere strukturelle Motive: „*squiggle*“ (engl. *squiggle*: Kringel), „*flap*“ (engl. *flap*: Klappe) und „*cap*“ (engl. *cap*: Kappe). Der *squiggle*, eine fast vollständige α -helicale Windung, kann zwischen einer engen und weiten Konformation alternieren und induziert dadurch eine Bewegung des *flap*, einer β -Haarnadelschleife, wodurch das aktive Zentrum teilweise abgeschirmt werden kann [5, 7]. Dieselbe Funktion kann auch in größerem Umfang durch die *cap*-Domäne vermittelt werden, die ebenfalls je nach Konformation den Zugang zum aktiven Zentrum gewährt beziehungsweise verhindert [7-10]. Die *cap*-Domäne ist in HAD-Phosphatasen sehr verschiedenartig ausgebildet und reicht von großen C1- oder C2-Typ *caps* bis hin zu nur minimal ausgeprägten C0-Typ *caps* [5]. Bei ‚kappenlosen‘ C0-Typ Phosphatasen wird angenommen, dass der Zugang zum aktiven Zentrum entweder durch das makromolekulare Substrat selbst oder durch die Oligomerisierung der Untereinheiten abgeschirmt wird [11-13]. Die Möglichkeit der Abschirmung des aktiven Zentrums ist entscheidend für die katalytische Reaktion, da die erste Teilreaktion durch einen Ausschluss, die zweite Teilreaktion aber durch das Vorhandensein von Lösungsmittel begünstigt wird [5, 7]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass größere *cap*-Domänen auch zur exakten Positionierung der Substrate im aktiven Zentrum beitragen und dadurch die Spezifität der Phosphatase erhöhen [14-16].

Das Mg^{2+} -Ion ist ein essenzieller Cofaktor aller HAD-Phosphotransferasen [7, 17]. Es wird im aktiven Zentrum der Phosphatasen koordiniert und spielt eine entscheidende Rolle im Katalysemechanismus: Mg^{2+} trägt zur genauen Positionierung der Phosphatgruppe des Substrates in Relation zum nukleophilen Aspartat (siehe unten) bei. Es stabilisiert elektrostatisch die Annäherung des negativ geladenen Aspartats an den zweifach

negativ geladenen Phosphomonoester. Darüber hinaus gleicht das Mg^{2+} -Ion im Reaktionsverlauf auch den zweifach negativ geladenen Phosphoaspartyl-Übergangszustand elektrostatisch aus [7, 18].

Das aktive Zentrum von HAD-Phosphatasen wird durch die vier HAD-Motive gebildet. Motiv I hat als erweiterte Konsensus-Aminosäuresequenz hhhDxDx(T/V)(L/V)h, wobei h hier für eine hydrophobe Aminosäure, x für eine beliebige Aminosäure, und D,T,V, L für die jeweilige Aminosäure im Einbuchstabencode steht [7]. Die Funktion dieser Aminosäuren im katalytischen Prozess wird im Abschnitt 1.1.2 näher erläutert. Wie oben bereits beschrieben, wird der Cofaktor Mg^{2+} im aktiven Zentrum des Enzyms durch die Carboxylgruppe des ersten Aspartats von Motiv I zusammen mit der Carbonylgruppe der Peptidbindung des zweiten Aspartats von Motiv I koordiniert [5]. Motiv II mit der Konsensus-Aminosäuresequenz hhhhhh(S/T) unterstützt die Substratkoordination im aktiven Zentrum und stabilisiert zusammen mit dem Lysin von Motiv III und dem Mg^{2+} -Ion die negative Ladung des im katalytischen Prozess entstehenden Phosphoaspartyl-Übergangszustandes [5, 7]. Motiv IV zeigt typischerweise die Konsensussequenzabfolge (G/S)(D/S)_{x3-4}(D/E)hhhh, wobei auch Abweichungen nachgewiesen wurden [7, 19, 20]. Die beiden Aspartate beziehungsweise das Aspartat und das Glutamat dieses Motivs tragen ebenfalls zur Koordinierung des Mg^{2+} -Ions bei.

1.1.2. Reaktionsmechanismus

Der Reaktionsmechanismus bei HAD-Phosphatasen ist gekennzeichnet durch einen zweistufigen Transfer der Phosphatgruppe (siehe Abbildung 1). Im Gegensatz zu alkalischen Phosphatasen oder Tyrosin-spezifischen Phosphatasen, bei denen der nukleophile Angriff auf die Phosphatgruppe des Substrates durch ein Serin oder Cystein ausgelöst wird, geht der nukleophile Angriff bei HAD-Phosphatasen von einem Aspartat des aktiven Zentrums aus [7, 21]. Dieses nukleophile Aspartat gehört zu Motiv I, es bindet die Phosphatgruppe des Substrates und bildet somit den Phosphoaspartyl-Übergangszustand [22-24]. Zu Motiv I zählt zusätzlich ein zweites Aspartat, das sich zwei Plätze C-terminal des ersten Aspartats befindet und mit seiner Carboxylgruppe die Funktion eines generellen Protonendonators beziehungsweise -akzeptors übernimmt [7]. Dieses zweite Aspartat protoniert die Abgangsgruppe, die daraufhin das aktive Zentrum verlässt und deprotoniert wiederum ein Wassermolekül, das in einem zweiten Reaktionsschritt einen nukleophilen Angriff auf den Phosphoaspartyl-Übergangszustand induziert [7, 22]. Das Orthophosphat

wird hydrolytisch freigesetzt. Somit ist das katalytische Zentrum regeneriert und steht für den nächsten Reaktionszyklus zur Verfügung.

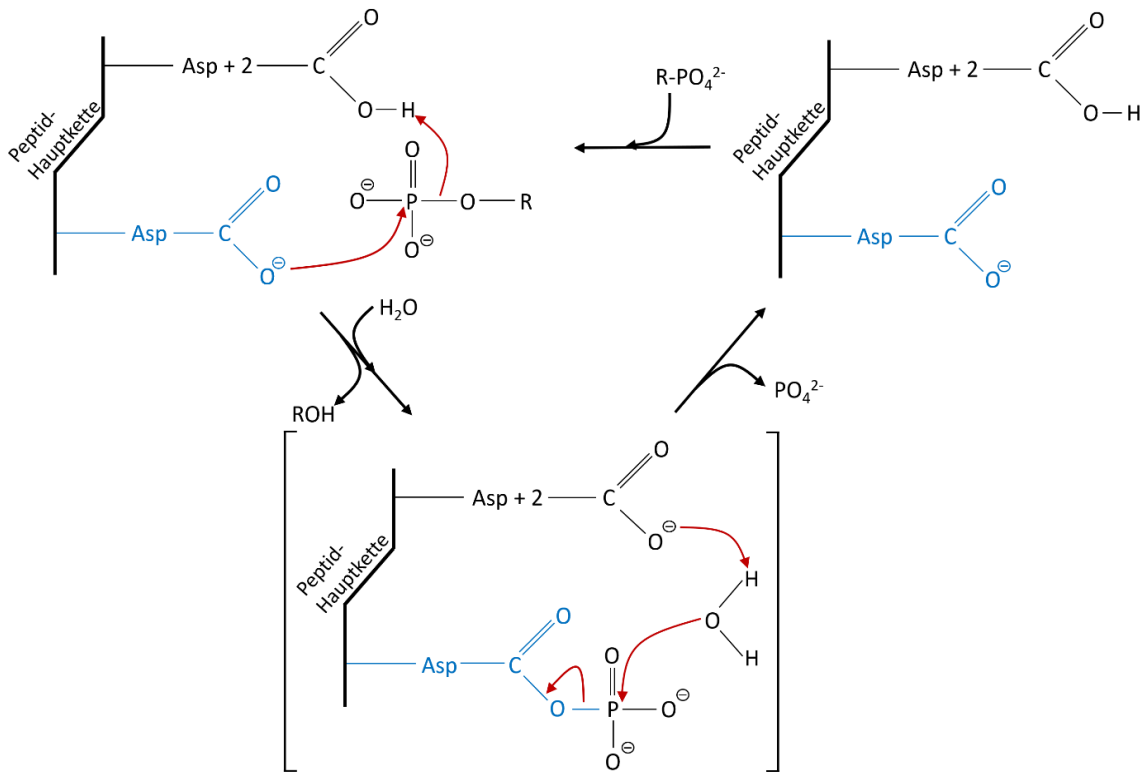


Abbildung 1: Reaktionsmechanismus von HAD-Phosphatasen

Schematische Darstellung des zweiteiligen Reaktionsmechanismus von HAD-Phosphatasen. Das katalytische Aspartat (blau) induziert den nukleophilen Angriff auf die Phosphatgruppe des Substrates (R-PO₄²⁻). Das zweite Aspartat (Asp + 2) von HAD-Motiv I wirkt als allgemeiner Säure-Base-Katalysator. Im Verlauf des katalytischen Prozesses bildet sich der Phosphoaspartyl-Übergangszustand (in eckigen Klammern dargestellt). Details siehe Abschnitt 1.1.2. Abbildung angelehnt an [7].

1.1.3. Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase (PDXP)

Die Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase (PDXP) ist auch unter dem Namen Chronophin (CIN) bekannt und gehört zur HAD-Familie vom *cap*-Typ C2 [5]. PDXP dephosphoryliert Vitamin B6 (Pyridoxalphosphat, Pyridoxinphosphat, Pyridoxaminphosphat), außerdem wurde die Dephosphorylierung von Phospho-Cofilin und des Steroidrezeptor-Koaktivators SRC-3 beschrieben [25, 26]. PDXP wird beim Menschen ubiquitär exprimiert, wobei die höchsten Expressionsspiegel in Gehirn, Leber, Skelettmuskeln und im Hoden verzeichnet wurden [25, 27]. Humanes (murines) PDXP setzt sich aus 296 (292) Aminosäuren zusammen und hat eine molekulare Masse von 31,7 (31,5) kDa [27]. Die Aminosäuresequenzen von humanem und murinem PDXP sind zu 91,2 % identisch [28]. Eine

Phosphatase mit katalytischer Aktivität hinsichtlich phosphorylierter B6-Vitamer wurde erstmals 1992 aus Erythrozyten identifiziert und aufgereinigt [29]. Nach der Entschlüsselung der Sequenz des Enzyms wurden im Jahr 2007 die ersten röntgenkristallographischen Strukturen von humanem PDXP veröffentlicht [27, 30]. Diese zeigten, dass PDXP eine HAD Phosphatase vom *cap*-Typ C2 ist und dass das Enzym als stabiles Homodimer vorliegt [15, 27, 29]. Im Folgenden werden die Substrate von PDXP näher vorgestellt, um im Anschluss auf die physiologischen Funktionen des Enzyms einzugehen.

1.2. Substrate von PDXP

1.2.1. Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP)

Pyridoxal 5'-phosphat (PLP), die biologisch aktive Form von Vitamin B6, ist als essenzieller Cofaktor in der Katalyse an über 140 verschiedenen enzymatischen Reaktionen wie Desaminierungen, Decarboxylierungen, Eliminierungen und Aldolspaltungen beteiligt [31, 32]. PLP-abhängige Enzyme sind in fünf der sechs der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)* definierten Enzymklassen anzutreffen [33]. Sie katalysieren einzelne Reaktionsschritte des Glykogenabbaus, des Aminosäurestoffwechsels [31] oder der Biosynthese von Häm und verschiedenen Neurotransmittern [34]. PLP entfaltet seine Wirkung als Cofaktor, indem sich die Carbonylgruppe der Aldehydgruppe mit einer ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes am aktiven Zentrum des Enzyms verbindet und dadurch eine intermediäre, kovalente Schiff-Base bildet [32]. Das protonierte PLP wirkt dabei als elektrophiler Katalysator, indem negativ geladene Zwischenprodukte der Katalyse überschüssige Elektronen auf den Pyridinring von PLP übertragen und dadurch stabilisiert werden [32].

Zu den B6-Vitameren zählen sechs chemisch verwandte Stoffe, die alle über eine 2-Methyl-3-hydroxy-Pyridinstruktur verfügen und sich in den Resten der C4 und C5-Atome unterscheiden: Pyridoxin (PN), Pyridoxal (PL) und Pyridoxamin (PM) sowie deren 5'-phosphorylierte Formen Pyridoxinphosphat (PNP), Pyridoxalphosphat (PLP) und Pyridoxaminphosphat (vergleiche Abbildung 2). Diese Vitamere können durch die Enzyme Pyridoxinkinase (PDXK), Pyridoxalphosphatphosphatase (PDXP) und Pyridox(am)inoxidase (PNPO) ineinander umgewandelt werden [35].

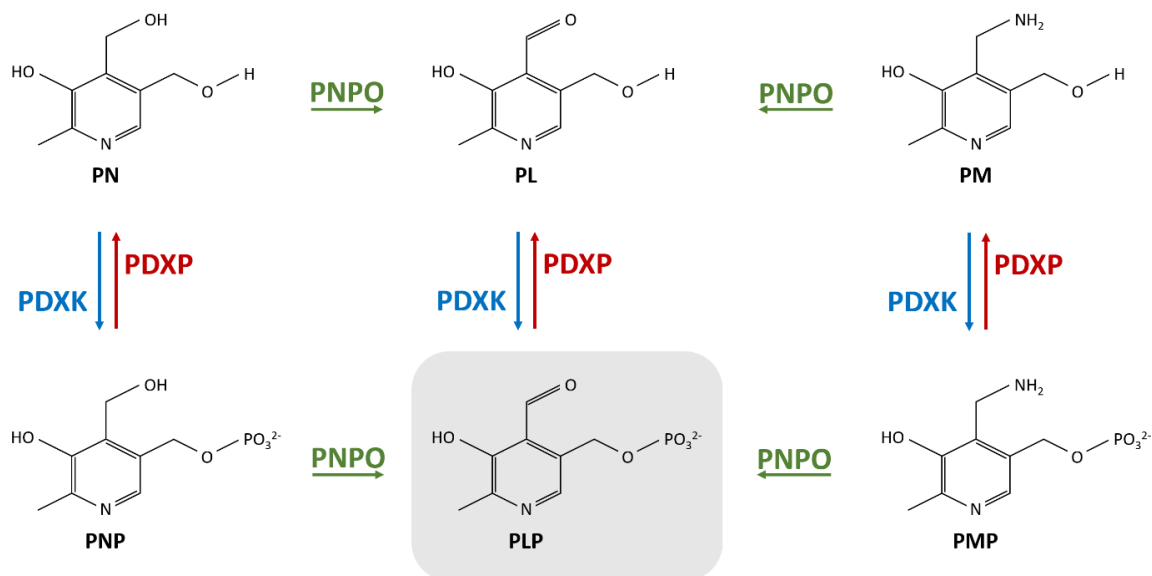


Abbildung 2: Chemische Struktur der Vitamin B6 Vitamere und deren enzymatische Umwandlung
 Dargestellt sind die Strukturformeln der Vitamin B6-Vitamere: Pyridoxin (PN), Pyridoxal (PL) und Pyridoxamin (PM) sowie deren phosphorylierte Formen Pyridoxinphosphat (PNP), Pyridoxalphosphat (PLP) und Pyridoxaminphosphat (PMP). Die Phosphatreste werden über eine Esterbindung an die 5-Hydroxymethylgruppe des Pyridinrings von der Pyridoxinkinase (PDXK) und der Pyridoxalphosphatphosphatase (PDXP) angefügt beziehungsweise entfernt. Die Pyridox(am)inoxidase (PNPO) katalysiert die Umwandlung von PN und PM zu PL beziehungsweise PNP und PMP zu PLP. Abbildung angelehnt an [36].

Menschen und auch die meisten Tiere sind zur Deckung ihres Vitamin B6-Spiegels auf eine externe Zufuhr angewiesen [33]. Die verschiedenen B6-Vitamere werden aus der Nahrung aufgenommen und in die biologisch aktive Form PLP umgewandelt. Tierische Produkte enthalten hauptsächlich PLP und PMP, während pflanzliche Lebensmittel überwiegend PN und PNP enthalten [37]. Im Lumen des Dünndarms dephosphoryliert die intestinale Phosphatase die phosphorylierten B6-Vitamere, die anschließend vom Dünndarmepithel resorbiert werden [35]. Der Leber kommt eine zentrale Rolle im Vitamin B6-Metabolismus zu. Sie verfügt über die nötigen Enzyme für die Umwandlung der Vitamere in PLP und den Abbau von PLP zu Pyridoxinsäure, die über den Urin ausgeschieden wird [35, 37, 38]. Die Rolle des intestinalen Epithels im Vitamin B6-Metabolismus ist in der Literatur nicht abschließend geklärt. *In-vitro*-Studien deuten darauf hin, dass die Vitamere nach der Resorption durch PDXK und gegebenenfalls PNPO zu PLP und im Anschluss durch PDXP zu PL überführt werden können [37]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die dafür benötigten Enzyme auf mRNA-Ebene auch im Darm exprimiert werden [39]. PL wird ins Blutserum abgegeben, in Erythrozyten aufgenommen und dort zu PLP phosphoryliert [37]. Dieses kann nach erneuter Umwandlung durch PDXP in PL die

Erythrozyten wieder verlassen [40]. In Erythrozyten liegt PLP dabei größtenteils gebunden an Hämoglobin vor [29]. Außerdem wurde beschrieben, dass PLP an ein Lysin von Albumin bindet und so über die Blutbahn transportiert wird [41, 42]. Da die Zellmembran für PLP impermeabel ist, wird PLP vor dem Transport ins Gewebe durch unspezifische, extrazellulär vorkommende, alkalische Phosphatasen zuerst in PL konvertiert [38, 43]. PL ist gut gewebeängig, kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und wird am Zielort PDXK-vermittelt in aktives PLP zurückgewandelt [38, 44]. Es wird allerdings angenommen, dass in eukaryontischen Zellen die freie intrazelluläre PLP-Konzentration auf einem Wert von nur 1 μM gehalten wird, um eine unspezifische Iminbildung von PLP mit Aminogruppen zellulärer Aminosäuren oder anderer Nukleophile zu verhindern [43, 45, 46]. Die Phosphoesterbindung von ungebundenem PLP kann unter niedrigen pH-Bedingungen oder enzymatisch mittels PDXP hydrolysiert werden [43]. Außerdem gibt es Hinweise, dass der Cofaktor PLP nach dessen Bildung durch PDXK beziehungsweise PNPO direkt auf die Apo-Zielenzyme transferiert wird [35, 43, 47, 48].

Neben der Rolle von PLP als Cofaktor werden den B6-Vitaminen noch andere Funktionen zugeschrieben: die Vitamine können antioxidativ wirken und sind in der Lage reaktive Sauerstoffradikale in einem ähnlichen Umfang wie die Vitamine C und E zu inaktivieren [49]. Zusätzlich wurde beschrieben, dass der intrazelluläre PLP-Spiegel einen Einfluss auf die Expression und Wirkung von Steroidhormonrezeptoren ausübt [50] und die allgemeine Genregulation durch Modulation von Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann [51, 52].

Gründe für einen erniedrigten Plasma-PLP-Spiegel sind vielfältig und können kongenitale, medikamenteninduzierte oder ernährungsbedingte Ursachen haben [46]. Ein ernährungsbedingter Mangel ist glücklicherweise aufgrund der großen Verfügbarkeit der B6-Vitamine in vielen Lebensmitteln selten [35]. Es sind verschiedene genetische Fehler bekannt, die beispielsweise durch eine reduzierte katalytische Effizienz von PNPO oder der unspezifischen alkalischen Phosphatase im Gewebe (Hypophosphatasie) den PLP-Spiegel verändern [46]. Auch ein vermehrtes Auftreten von PLP-bindenden Molekülen kann den PLP-Spiegel verändern und ist im Zusammenhang mit Mutationen des ALDH7A1 Gens beschrieben. In Folge der mutationsbedingt eingeschränkten Funktion von Antiquitin reichert sich ein nukleophiles Stoffwechselprodukt, das freies PLP bindet und inaktiviert an, was deutliche phänotypische Auswirkungen nach sich zieht [53, 54].

Die unmittelbarsten Auswirkungen einer unzureichenden PLP-Versorgung sind im zentralen Nervensystem zu beobachten. Ein erniedrigter PLP-Spiegel im Gehirn ist mit dem Auftreten von Epilepsie, neuromuskulären oder neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert [46]. Der Zusammenhang mit Epilepsie ist wissenschaftlich umfangreich beschrieben, der zugrunde liegende Pathomechanismus ist allerdings nicht abschließend geklärt und höchstwahrscheinlich multifaktorieller Natur [55]. Die Biosynthese zahlreicher Neurotransmitters, darunter γ -Aminobuttersäure (GABA), ist PLP-abhängig [56]. GABA wird aus Glutamat mit Hilfe der Glutamat-Decarboxylase synthetisiert und wirkt als inhibitorischer Neurotransmitter, der die neuronale Erregbarkeit maßgeblich beeinflusst [57]. Bei angeborenen Störungen im Vitamin-B6-Metabolismus, die zu einem erniedrigten PLP-Spiegel führen, zeigt sich meist schon im Kleinkindesalter eine Vitamin-B6-abhängige Epilepsie [38, 53, 54]. Der Zusammenhang eines niedrigen PLP-Spiegels mit dem Auftreten von epileptischen Anfällen konnte *in-vivo* experimentell bestätigt werden [58]. Die kontinuierliche Supplementierung von PLP oder PN verspricht eine deutliche Verbesserung des Krankheitsgeschehens, wobei die Nebenwirkungen dieser Therapie nicht außer Acht gelassen werden dürfen [59, 60].

1.2.2. Phospho-Cofilin

Proteine der Cofilin-/ ADF (engl. *actin-depolymerizing factor*) -Familie sind in der Lage die Organisation und Dynamik der Aktinfilamente in eukaryontischen Zelle zu regulieren [61, 62]. Die Filamentsysteme des Zytoskeletts beeinflussen maßgeblich Festigkeit, Form und Bewegungsfähigkeit einer Zelle. Aktinfilamente (F-Aktin) sind doppelsträngige, helikal gewundene Makromoleküle, die durch Polymerisation von globulären Aktinmolekülen (G-Aktin) entstehen. Die flexiblen und polaren Filamente verfügen über ein schnell polymerisierendes Plus-Ende und ein langsam polymerisierendes Minus-Ende. Da Aktin in der Lage ist ATP zu hydrolysieren und dieses im Molekül eingeschlossen bleibt, kann man zwei Formen von Aktin unterscheiden: die T-Form und die D-Form. In der T-Form ist im Aktin ATP gebunden, in der D-Form ist das ATP bereits zu ADP hydrolysiert [63]. Die Bindung von Cofilin an F-Aktin drängt das helikale Aktinfilament in eine engere Windung, wodurch das Filament brüchiger wird und leichter fragmentiert [63, 64]. Dabei beschleunigt Cofilin, das bevorzugt an der D-Form von Aktin bindet, den Abbau von überwiegend älteren Filamenten und ist somit wesentlich für das gerichtete Wachstum

des Aktinnetzwerks verantwortlich [63, 65]. Gleichzeitig wird auch eine mögliche Beteiligung von Cofilin beim Aufbau neuer Aktinstrukturen diskutiert [66, 67]. Die Aktivität von Cofilin wird durch Phosphorylierung, der Bindung an Phospholipiden der Zellmembran, dem lokalen pH-Wert und oxidativem Stress moduliert [61, 62]. Die Phosphorylierung des Serins in Position 3 von Cofilin inhibiert dessen Aktivität und wird durch die Enzyme LIM-Kinase und testikuläre Proteinkinase vermittelt [68, 69]. Andererseits wurde gezeigt, dass neben Enzymen der Familie der Serin/Threonin-Phosphatasen und der Slingshot Phosphatasen (SSH) auch PDXP in der Lage ist Ser3-Phosphocofilin zu dephosphorylieren und reaktivieren [25, 70-72]. Chronophin (CIN) wurde 2005 basierend auf seiner Aktivität gegenüber Ser3-Phosphocofilin aus dem Zytosol von Rinderhirnen isoliert, später stellte sich heraus, dass CIN mit PDXP identisch ist [25]. Ergebnisse von Zellversuchen legen nahe, dass CIN Cofilin direkt dephosphoryliert und bei der Regulation des Zytoskeletts im Rahmen der Zytokinese, der Zellmotilität oder Membrandynamiken beteiligt ist [25]. In Anbetracht der gewonnenen Erkenntnisse über die dreidimensionale Struktur und den Reaktionsmechanismus von HAD-Phosphatasen fällt es allerdings schwer anzunehmen, dass PDXP mit seinem C2 *cap*-Typ tatsächlich ein Makromolekül wie Cofilin direkt dephosphorylieren kann [28]. Vor diesem Hintergrund sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Phospho-Cofilin stattdessen indirekt durch PDXP über PLP-abhängige Enzyme moduliert wird [28].

1.2.3. Steroid-Rezeptor-Koaktivator-3 (SRC-3) und weitere putative PDXP-Proteinsubstrate

Der Steroid-Rezeptor-Koaktivator-3 (SRC-3) gehört zur Steroid-Rezeptor-Koaktivator-(SRC)/ p160-Familie. SRCs wurden ursprünglich als Koregulatoren von Steroidhormonrezeptoren beschrieben, welche als Transkriptionsfaktoren tätig sind und zur Familie der nukleären Rezeptoren zählen [73]. Seitdem haben mehrere Studien gezeigt, dass SRCs auch als Koregulatoren für ein breites Spektrum von Transkriptionsfaktoren fungieren, die ihre Wirkung unabhängig vom nukleären Rezeptor entfalten [74]. Aufgrund dieser Pleiotropie spielen SRCs eine entscheidende Rolle in vielen Aspekten der Organphysiologie und Pathophysiologie, die nicht unbedingt auf den Steroidhormonsignalweg zurückgeführt werden können [75]. Der Zusammenhang zwischen einer SRC-3 Überexpression

und dem gehäuftem Auftreten von Mamma- und Ovarialkarzinomen ist hinreichend beschrieben [76]. Nach neueren Erkenntnissen wird SRC-3 als Proto-Onkogen beziehungsweise als prometastatischer Faktor in der frühen Phase der Invasions-/Metastasierungskaskade der Tumorentwicklung eine zentrale Rolle zugeschrieben [75]. Die Aktivität von SRC-3 kann dabei durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Methylierungen sowie durch mikro-RNAs moduliert werden [77, 78]. Im Zellversuch konnte gezeigt werden, dass PDXP wie auch die Serin/Threonin Phosphatasen PP1 und PP2 an der Dephosphorylierung von SRC-3 beteiligt sind und dadurch die transkriptionelle Koregulationsaktivität von SRC-3 im Steroidrezeptorsignalweg herunterregulieren [26].

Die Arbeitsgruppe von Kim et al. konnte zeigen, dass PDXP im Gehirn zahlreiche weitere Proteinsubstrate dephosphoryliert: z.B. NEDD4-2 (*neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated 4-2*), Mdm2 (*murine double minute-2*) und Calsenilin. NEDD4-2 und Mdm2 sind E3 Ubiquitin-Ligasen, die auf unterschiedliche Weise die neuronale Erregbarkeit beeinflussen. Die PDXP-vermittelte Dephosphorylierung von Calsenilin beeinflusst die Bindung an dessen nachgeschalteten Rezeptoren und beeinflusste im Tierversuch ebenfalls die Neigung und Dauer von epileptischen Anfällen [79-81].

1.3. Rolle von PDXP im Vitamin B6-Metabolismus als Grundlage für die pharmakologische Inhibition von PDXP

PDXP kommt eine wichtige Bedeutung im Stoffwechsel von Vitamin B6 zu: es ist in der Lage intrazelluläres PLP zu dephosphorylieren und senkt dadurch den zellulären PLP-Spiegel [27, 29]. Die extrazelluläre Dephosphorylierung von PLP wird durch das Ektoenzym *tissue non-specific alkaline phosphatase* (TNAP) katalysiert [82]. Neben TNAP wurden in Leber und Niere noch weitere unspezifische Phosphatasen identifiziert, die unter anderem auch PLP dephosphorylieren können [83, 84]. Die Forschungsgruppe Gohla konnte mit einem PDXP-defizienten Mausmodell (ubiquitärer PDXP *knockout*, PDXP-KO) zeigen, dass die PLP-Spiegel in PDXP-KO-Mäusen im Vergleich zu PDXP-Wildtyp (PDXP-WT) -Mäusen in Gehirn und Erythrozyten um mehr als 270 % und in Skelettmuskeln um mehr als 40 % erhöht sind, während im Blutplasma und der Leber

keine veränderten PLP-Spiegel gefunden werden konnten [36]. Die Ergebnisse bestätigen, dass PDXP nicht an der Regulation extrazellulärer PLP Spiegel beteiligt ist. Besonders im Gehirn ist die Expression von PDXP hoch [27]. Mit PDXP-KO-Mäusen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die GABA-Spiegel im Gehirn dieser Mäuse um circa 20 % erhöht waren und die Mäuse verglichen zum WT phänotypisch ein verbessertes räumliches Lernen und Gedächtnis zeigten [36]. Der erhöhte GABA-Spiegel wird auf den erhöhten PLP-Spiegel im Gehirn der PDXP-defizienten Mäusen zurückgeführt, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GABA-Biosynthese PLP-abhängig ist [56, 57]. GABA wird von inhibitorischen Interneuronen synthetisiert, die im Cortex die Exzitation von Pyramidenzellen und die Synchronizität in neuronalen Netzwerken regulieren und somit zu dem komplexen dynamischen Netzwerk beitragen, das das Denken ermöglicht [85, 86]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des GABA-Neurotransmittersystems zudem die adulte hippocampale Neurogenese beeinflusst: einerseits reguliert ein aktiviertes GABA-System die Zellproliferation herunter, andererseits beschleunigt es die synaptische Integration neu geschaffener hippocampaler Neuronen [87, 88]. Lieberwirth et al. sehen eine Verbindung zwischen einer vermehrten adulten hippocampalen Neurogenese und einem verbesserten räumlichen Lernen und Gedächtnis [88]. Es ist weitere Evidenz notwendig, um die verbesserten kognitiven Leistungen der PDXP-defizienten Mäuse auf eine vermehrte hippocampale Neurogenese infolge der Aktivierung des GABA-ergen Systems zurückzuführen. Dysfunktionale GABAerge Systeme stehen im Zusammenhang mit verschiedenartigen Erkrankungen: eine Meta-Analyse verschiedener neuropsychiatrischer Erkrankungen konnte nachweisen, dass der GABA-Spiegel bei Erkrankungen des Autismus-Spektrums und bei Depressionen signifikant reduziert war [89]. Zusätzlich ist die Dysregulation der GABAergen Signalübertragung im Alter ein allgemein akzeptiertes Phänomen: der zunehmende Abbau der GABAergen Neuronen und deren synaptischer Kontakte kann zu einem Verlust des exzitatorischen/inhibitorischen Gleichgewichtes führen [90]. Dies beeinträchtigt die neuronale Plastizität und kann zu kognitiven Einschränkungen beziehungsweise der Entstehung pathophysiologischer Krankheiten beitragen [90]. Vor diesem Hintergrund erscheint für Rozycka et al. die Verstärkung des GABA-Neurotransmittersystems ein vielversprechendes therapeutisches Ziel zu sein [90], das über eine pharmakologische Inhibition von PDXP erreicht werden könnte.

Zweitens gibt es vielversprechende Hinweise, dass sich die pharmakologische Inhibition von PDXP in der Therapie von Hirntumoren als Vorteil erweisen kann. Die Forschungsgruppe Gohla untersuchte 2016 den Einfluss von PDXP auf Wachstum und Invasivität von Glioblastomen. Das Glioblastom ist der häufigste maligne Hirntumor beim Menschen, die 5-Jahres-Überlebensrate zählt zu den niedrigsten aller menschlichen Tumore und liegt bei 5,1 % [91]. Dabei zeichnet sich die schlechte Prognose durch das schnelle Tumorstadium mit diffuser intrakranieller Ausbreitung bei gleichzeitig geringem Ansprechen auf derzeit verfügbare Therapien aus [92, 93]. Analysen von exzidierten Tumorpräparaten konnten zeigen, dass die Expression von PDXP verglichen mit tumorfreien Kontrollpräparaten signifikant reduziert war [94]. Als mögliche Erklärung für das Herunterregulieren des PDXP-Gens konnte ein veränderter Methylierungsgrad des PDXP-Promoters festgestellt werden [94]. Des Weiteren wurden *in-vivo* Experimente mit humanen Glioblastom-Zelllinien durchgeführt, deren PDXP-Expression mittels stabiler RNA-Interferenz reduziert wurde. Diese Zellen wurden in das Gehirn immunkompromittierter Mäuse transplantiert und das Tumorstadium mit Hilfe von biolumineszenter Bildgebung über mehrere Wochen gemessen. Die Mäuse mit Implantaten dieser PDXP-depletierten Tumorzelllinien zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant geringeres Tumorstadium [94]. Die Re-Expression von RNA-Interferenz-insensitivem PDXP in den Tumorzelllinien konnte den PDXP-spezifischen Effekt bestätigen [94]. Es ist allerdings unbekannt, ob dieser beobachtete Phänotyp auf eine erhöhte Konzentration von PLP, Ser3-Phosphocofilin oder ein noch unbekanntes Proteinsubstrat von PDXP zurückzuführen ist [94]. Allerdings stellen zahlreiche andere Studien einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Vitamin B6-Spiegel und einer geringeren Häufigkeit und Progression von neoplastischen Veränderungen wie beispielsweise Lungenkrebs [95], Ovarialkrebs [96] oder Darmkrebs [97] fest [98]. Auch epidemiologische Studien deuten auf einen inversen Zusammenhang zwischen dem allgemeinem Krebsrisiko und der diätetischen Vitamin B6-Zufuhr sowie dem PLP-Spiegel im Blutplasma hin [99]. Ein pharmakologischer Inhibitor von PDXP könnte zu neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen zur Rolle von Vitamin B6 in der Tumorentstehung und -ausbreitung beitragen.

1.4. Hochdurchsatz-Screening zur Ermittlung eines PDXP-Inhibitors

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein aktivitätsbasiertes Hochdurchsatz-Screening-Verfahren zur Ermittlung einer Leitstruktur eines potenziellen PDXP-Inhibitors durchgeführt.

Dazu wurde der Einfluss von circa 41.000 niedermolekularen Verbindungen des Leibniz Forschungsinstituts für Molekulare Pharmakologie (FMP) auf die Aktivität von rekombinantem PDXP automatisiert untersucht. Als Substrat wurde die synthetisch hergestellte Verbindung 6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferylphosphat (DiFMUP) verwendet, die ursprünglich für die Aktivitätsmessung von Phosphoserin/Threonin-Phosphatasen entwickelt wurde [100]. Die enzymatische Hydrolyse von DiFMUP durch eine Phosphatase führt zur Freisetzung von fluoreszierendem DiFMU, das von einem Fluoreszenzleser im kontinuierlichen Modus einfach verfolgt werden kann. Ein weiterer Vorteil dieses Substrats ist der niedrige pKa-Wert von 4,7, der ohne vorherige Alkalisierung mit dem pH-Wert der Reaktion von 7,0 kompatibel ist [101]. Um die Selektivität der gefundenen Treffer des Hochdurchsatz-Screening-Verfahren gegen PDXP zu erhöhen, wurde anschließend ein zweiter Screen im gleichen Verfahren gegen Phosphoglykolat-Phosphatase (PGP), dem nächsten Verwandten von PDXP, durchgeführt. Abschließend wurde die inhibitorische Aktivität der gefundenen Substanzen in Assays mit PLP als physiologischem Substrat bestätigt. Es wurden zwei Substanzen identifiziert, die die PDXP-Aktivität, aber nicht die PGP-Aktivität inhibieren: 7,8-Dihydroxyflavon (7,8-DHF) und eine weitere Substanz, deren Name und Struktur aus Gründen des Patentschutzes vorerst unbekannt bleibt.

1.5. Literaturrecherche zu 7,8-Dihydroxyflavon

7,8-Dihydroxyflavon (7,8-DHF; chemische Struktur siehe Abbildung 3) ist ein Polyphenol und zählt zur Gruppe der Flavonoide. Diese Naturstoffe umfassen über 4000 verschiedene Substanzen und sind ubiquitär in Pflanzen vertreten [102]. Flavonoide sind in der menschlichen Ernährung hauptsächlich in Obst, Gemüse, Tee und Wein aufzufinden und zahlreiche Studien deuten auf verschiedene gesundheitsförderliche Aspekte hin

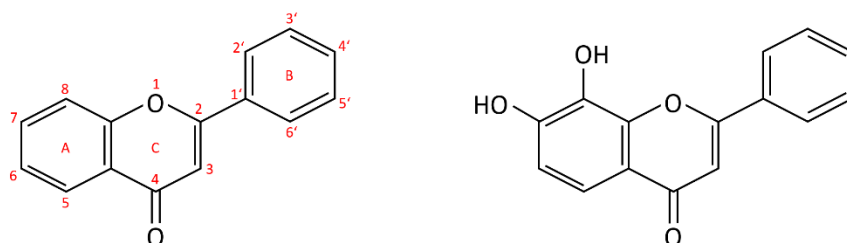


Abbildung 3: Chemische Struktur des Flavon-Grundgerüsts und von 7,8-Dihydroxyflavon

Links ist das Flavon-Grundgerüst (2-phenyl-1,4-benzopyron) mit den nummerierten Positionen für mögliche Substituenten und den Ringen A – C abgebildet. Rechts ist die chemische Struktur von 7,8-Dihydroxyflavon dargestellt.

[102]. 7,8-DHF kann aus der Pflanze *Godmania aesculifolia* oder synthetisch gewonnen werden [103]. Interessanterweise ist 7,8-DHF seit einigen Jahren ein Schwerpunkt der Hirnforschung: Im Jahr 2010 fanden Jang et al. in einem zellbasierten TrkB-abhängigen apoptotischen Screeningtest, dass 7,8-DHF in der Lage ist den Tropomyosin-Rezeptor Kinase B (TrkB) zu aktivieren [104]. TrkB ist ein membrangebundener Rezeptor im Gehirn, der durch die Neurotrophine *brain-derived neurotrophin factor* (BDNF), Neurotrophin-3 und -4 aktiviert wird und wiederum zahlreiche nachgelagerte Signalwege aktiviert [105]. Somit stellt der BDNF-TrkB-Signalweg einen zentralen Regulator der Neuroplastizität bei der Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems dar [105]. Neue wissenschaftliche Studien legen nahe, dass das Gehirn im späteren Erwachsenenalter noch wesentlich plastischer und reaktionsfähiger ist als früher angenommen [106]. Dabei wird dem BDNF-TrkB-Signalweg eine bedeutende Rolle zugeschrieben. BDNF fördert die Neurogenese verschiedener Zelltypen, die Synaptogenese und synaptische Plastizität, die alle dazu beitragen das Gedächtnis und die kognitiven Fähigkeiten zu verbessern [107, 108]. Veränderungen des BDNF-Systems stehen in direktem Zusammenhang mit verschiedenen neuropsychiatrischen und -degenerativen Erkrankungen [106, 109] und haben die Suche nach einem BDNF-Mimetikum oder TrkB-Agonisten zu einem bedeutenden Forschungsziel erhoben. Dieses Ziel schien erreicht zu sein als Jang et al. zeigten, dass 7,8-DHF nach systemischer Verabreichung die Blut-Hirn-Schranke passiert und spezifisch eine TrkB-Dimerisierung, -Autophosphorylierung und -Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege bewirken kann [104]. Liu et al. konnten die 7,8-DHF-abhängige Aktivierung von TrkB mittels ELISA-basierenden Aktivitätsmessungen eines nachgeschalteten Signalwegs bestätigen [110]. Darüber hinaus soll 7,8-DHF bessere pharmakokinetische Eigenschaften und eine höhere TrkB-Bindungsaffinität als BDNF zeigen [104]. Diese und andere Forschergruppen konnten darüber hinaus zahlreiche positive neurologische Effekte nach Administration von 7,8-DHF *in-vivo* beobachten: 7,8-DHF verhindert deklarative Langzeitgedächtnisdefizite, depressive Symptome und strukturelle Veränderungen im Gehirn, die im Tiermodell durch eine akute oder chronische Stresserfahrungen hervorgerufen werden [111, 112]. Außerdem konnte in einem Alzheimer-Mausmodell gezeigt werden, dass der BDNF-Spiegel im Gehirn dieser Mäuse verglichen zum Wildtyp signifikant reduziert ist [113]. Des Weiteren wurde der Nachweis erbracht,

dass 7,8-DHF hippocampale TrkB-Rezeptoren aktivieren kann. Hierdurch wird der Gedächtnisverlust dieser Mäuse aufgehoben und die Entstehung von Beta-Amyloid reduziert [113]. 7,8-DHF wird neben Depressions- und Alzheimererkrankungen auch vielversprechende therapeutische Wirksamkeit bei Morbus Parkinson, der Huntington-Krankheit, amyotropher Lateralsklerose, posttraumatische Belastungsstörungen und dem Rett-Syndrom zugesprochen [114]. Daher ist davon auszugehen, dass 7,8-DHF in der Lage ist, die physiologischen Funktionen von BDNF zu imitieren [114]. Ob diese beobachteten positiven Effekte tatsächlich in der direkten Aktivierung des TrkB-Rezeptors durch 7,8-DHF begründet liegen, ist wissenschaftlich umstritten, nachdem im Jahr 2017 Nachweise veröffentlicht wurden, dass 7,8-DHF *keine* Phosphorylierung von TrkB oder nachgeschalteter Signalkaskaden induziert [115, 116].

1.6. Fragestellung

PDXP ist eine Phosphatase, der eine bedeutende Rolle in der Regulation des Vitamin B6-Metabolismus zugeschrieben wird. Die Inhibition dieser Phosphatase mittels gentechnischer Methoden hat in ersten Studien vielversprechende Ergebnisse auf den Gebieten der Krebs- und Hirnforschung erbracht, die zu weiterer Forschung auf diesem Gebiet Anlass geben. Dazu wäre ein niedermolekularer Inhibitor, der spezifisch die Enzymaktivität von PDXP inhibiert, von hohem wissenschaftlichem Wert. Auf der Suche nach einem solchen Inhibitor wurde 7,8-DHF in einem Hochdurchsatz-Screening-Verfahren als ein Kandidat identifiziert. 7,8-DHF zeigte im Tiermodell medizinische Wirksamkeit gegenüber zahlreichen neurologischen Erkrankungen, aber der genaue Wirkmechanismus ist wissenschaftlich umstritten. Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung von 7,8-DHF auf die Enzymaktivität von PDXP biochemisch und strukturell zu charakterisieren. Dazu sollen mittels enzymkinetischer Untersuchungen die Art und die Wirkstärke des inhibitorischen Effektes *in-vitro* ermittelt werden. Außerdem soll die Selektivität des Inhibitors gegenüber verwandten Phosphatasen und gegenüber strukturähnlichen Flavonen untersucht werden. Um anschließend mehr über den Mechanismus der Inhibition auf struktureller Ebene zu lernen, soll eine Co-Kristallisation des Enzyms mit 7,8-DHF durchgeführt werden. Mithilfe dieser Strategie soll ein Beitrag zur Beantwortung der Frage geleistet werden, ob PDXP an den zahlreichen nachgewiesenen Effekten von 7,8-DHF beteiligt ist. Außerdem können die so gewonnenen Erkenntnisse eine Grundlage für die Weiterentwicklung niedermolekularer PDXP-Inhibitoren bilden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Biomol Green	Enzo Life Sciences, Lörrach
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
BSA (Bovines Serumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Flüssiger Stickstoff	TIG, Tyczka Industrie-Gase, Würzburg
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Imidazol	Fluka Chemica, Neu-Ulm
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	AppliChem, Darmstadt
LB-Medium-Pulver (Luria/Miller)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe

Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NEBuffer 2.1	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
PCR Nukleotide Mix	Roche, Mannheim
Rotiophorese Gel 30 (37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Triethanolamin (TEA)	AppliChem, Darmstadt
Tris HCl	AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt

2.1.2 Oligonukleotide

Tabelle 1: Erworbene Oligonukleotide

Primer Name (Orientierung)	Basensequenz (in 5' – 3'-Richtung)
PDXP universeller Klonierungsprimer (forward)	TCG ACC ATG GCG CGC TGC GAG CGG
PDXP universeller Klonierungsprimer (reverse)	AAA AGT GAA TTC TCA GTC CTC CAG CCC CTC
N60A (forward)	TTC GTG AGC AAC GCC AGC CGG CGC GCG
N60A (reverse)	CGC GCG CCG GCT GGC GTT GCT CAC GAA
N60S (forward)	TTC GTG AGC AAC AGC AGC CGG CGC GCG
N60S (reverse)	CGC GCG CCG GCT GCT GTT GCT CAC GAA
R62A (forward)	AGC AAC AAC AGC GCG CGC GCG CGG CCC
R62A (reverse)	GGG CCG CGC GCG CGC GCT GTT GTT GCT
Y146A (forward)	GTG CTC GTA GGC GCC GAC GAG CAG TTT
Y146A (reverse)	AAA CTG CTC GTC GGC GCC TAC GAG CAC
E148A (forward)	GTA GGC TAC GAC GCG CAG TTT TCC TTC
E148A (reverse)	GAA GGA AAA CTG CGC GTC GTA GCC TAC
H178A (forward)	CGC GAC CCT TGG GCC CCG CTC AGC GAC
H178A (reverse)	GTC GCT GAG CGG GGC CCA AGG GTC GCG

Alle Primer wurden bei Eurofins Genomics erworben.

2.1.3 Plasmide

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Name	Länge	Antibiotikaresistenz	Hersteller
pETM-11	6029 bp	Kanamycin	EMBL, Heidelberg
pG-Tf2	~8300 bp	Chloramphenicol	Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, JP

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device	Merck Millipore, Darmstadt
CrystalMation Intelli-Plate 96-3	Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA
Einmalküvette	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalplastikspritzen 2ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Falcon Conical Tube (15ml, 50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Neoject Einmalkanülen	Dispomed, Gelnhausen
Nunc 96-well Mikroplatte	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5ml, 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 10k MWCO	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SurPhob Spitzen	Biozym, Oldendorf
TBC Einmalspritzen 1ml	Dispomed, Gelnhausen
TC-Schale 100	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.5 Technische Geräte

ÄKTApurifier (P-900, UV-900, pH/C-900, Frac-950)	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Crystallization Hotel Rock Imager 1000	Formulatrix, Bedford, MA, USA
Crystallization Robot NT8	Formulatrix, Bedford, MA, USA
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
EnVision 2104 multilabel reader	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Galaxy 14 S Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Heidolph MR Hei-Mix L Mixer Magnet	Heidolph Instruments, Schwabach
Heidolph Unimax 1010 Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach
HisTrap HP 1ml Säule	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE
ISF-1-V Schüttler	Adolf Kühner AG, Birsfelden, CH
Lissy 2002 Automated Liquid Handling Platform	Zinsser NA, Northridge, CA, USA
Mastercycler EP Gradient S 5341	Eppendorf, Hamburg
Mini-PROTEAN TetraCell Elektrophoresesystem	Bio-Rad, München
Mixing Block MB-102	Biozym, Oldendorf
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
OmniaPure Reinstwassersystem	Stakpure, Niederahr
pH-Meter Lab 850 mit pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott, Mainz
Pipetus standard	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pac HC Spannungsquelle	Bio-Rad, München
Reaktionsgefäße	Schott, Mainz
RoboSeal	HJ-Bioanalytik, Erkelenz
Scanjet 8300	Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA
Sonopuls HD 200 Ultraschall Homogenisator	Bandelin, Berlin
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE
Test-Tube-Rotator L29	Labinco, Breda, NL
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
VORTEX-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage ABJ-NM/ABS-N	Kern, Balingen
Waage SBA 52	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA

2.1.6 Enzyme, Substrate und Inhibitoren

3,5,7-Trihydroxyflavon (Galangin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
3,5-Dihydroxyflavon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
3,7,8-Trihydroxyflavon-4'-hydroxyphe- nyl	Ambinter, Orléans, Frankreich
3,7-Dihydroxyflavon Hydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
5,6,7-Trihydroxyflavon (Baicalein)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
5,7-Dihydroxyflavon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
7,8-Dihydroxyflavon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Tabletten	Roche, Mannheim
DNase 1	AppliChem, Darmstadt
D-Ribose-5-phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
EcoRI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Lysozyme	Roth, Karlsruhe
Magnesium-abhängige Phosphatase* (MDP1)	AG Gohla, Institut für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
NcoI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
O-Phospho-L-serin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Phosphatase Orphan 2* (PHOSPHO2)	AG Gohla, Institut für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Phosphoglykolat Phosphatase* (PGP)	AG Gohla, Institut für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Phosphoglykolat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Lysin-Histidin-Pyrophosphat Phospha- tase* (LHPP)	AG Gohla, Institut für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Phosphoserin Phosphatase* (PSPH)	AG Gohla, Institut für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Pyridoxal-5'-phosphat Hydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Pyridoxalphosphatase* (PDXP)	AG Gohla, Institut für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Pyrophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Q5 High fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Quick CIP	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Tobacco Etch Virus (TEV) Protease*	AG Gohla, Institut für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

* rekombinant hergestelltes, chromatographisch gereinigtes Enzym

2.1.7 Kristallisationsscreens

Index HT	Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA
JCSG plus	Molecular Dimensions, Sheffield, UK
PEG Suite I	Qiagen, Hilden
Wizard I & II	Rigaku, Bainbridge Island, WA, USA

2.1.8 Software und Webseiten

Excel 365	Microsoft, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Pubmed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
PyMOL 2.4	Schrödinger, LCC, Portland, OR, USA
The Protein Data Bank	https://www.rcsb.org
UniProt	https://www.uniprot.org

2.1.9 Sonstiges

<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pG-Tf2) Kompetente Zellen	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Precision Plus Protein Standards Dual Core	Bio-Rad, München
Qiagen Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
XL1-Blue Kompetente Zellen	Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist eine etablierte biochemische Methode, mit der Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. Um die Proteinstruktur zu denaturieren, wurde den Proteinproben zunächst Lämmli-Puffer zugegeben [117]. Anschließend wurden diese Proben für wenige Minuten bei 95 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und im Anschluss auf ein 12%iges Polyacrylamidgel gegeben. Lämmli-Puffer enthält neben SDS auch β -Mercaptoethanol, wodurch inter- und intramolekulare Disulfidbrückenbindungen reduziert werden. SDS lagert sich in großem Umfang mit seiner hydrophoben Alkylkette an die Proteine an und überlagert deren Eigenladung mit seinem hydrophilen, anionischen Sulfatrest. Dadurch erlangen die Proteine eine negative Ladung proportional zu ihrer Masse und wandern somit in einem angelegten elektrischen Feld zur Anode. Das Polyacrylamid-Trenngel bewirkt die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, da kleine Proteine schneller durch die Poren des Gels wandern können. Es wurden kommerziell erhältliche Elektrophoresesysteme mit den zugehörigen Spannungsquellen verwendet. Die Coomassie-Färbung dient dazu die Proteinbanden in Polyacrylamidgelen für das Auge sichtbar zu machen [118]. Dazu wurde das Gel zunächst für 20 Minuten unter kontinuierlicher Bewegung in Coomassie-Färbelösung gelegt und anschließend für weitere 12 Stunden in Coomassie-Entfärbelösung. Der *Precision Plus Protein Dual Core Standard* diente als Referenz, um die in der Coomassie-Färbung sichtbar gewordenen Banden einer bekannten molekularen Masse zuzuordnen. Die Zusammensetzung der Gele, Puffer, Färbe- und Entfärbelösungen ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Gele, Puffer, Färbe- und Entfärbelösungen für SDS-PAGE

Sammelgel (4 %)	Trenngel (12 %)	Laufpuffer (10x)
Aqua dest.	Aqua dest.	Aqua dest.
13 % (v/v) Rotiophorese Gel 30	40 % (v/v) Rotiophorese Gel 30	250 mM Tris
0,75 % (v/v) APS 10 %	0,75 % (v/v) APS 10 %	2 M Glycin
0,18 % TEMED	0,075 % (v/v) TEMED	1,25 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS	
125 mM Tris (pH 6,8)	375 mM Tris (pH 8,8)	

Lämmli-Puffer (4x)	Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Entfärbelösung
Aqua dest.	Aqua dest.	Aqua dest.
0,005 % (w/v) Bromphenolblau	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250	10 % (v/v) Essigsäure
40 % (v/v) Glycerol	10 % (v/v) Essigsäure	20 % (v/v) Methanol
8 % (w/v) SDS	45 % (v/v) Methanol	
4 % (v/v) β -Mercaptoethanol		
250 mM Tris-HCl		

2.2.2 PCR und Klonierung der PDXP-Mutanten

Die Methode der ortsspezifischen Mutagenese erlaubt es, ein Genprodukt mit Hilfe rekombinanter DNA-Techniken gezielt zu verändern. Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutationen beschränken sich auf wenige oder einzelne Punktmutationen in der Basensequenz von PDXP und verfolgen das Ziel, einzelne Aminosäuren der PDXP-Sequenz gezielt auszutauschen. Die Mutationen für den gewünschten Aminosäureaustausch sind auf zwei zueinander komplementären Primer-Nukleotiden enthalten. Auf diesen Oligonukleotiden befinden sich neben der veränderten Basensequenz auf beiden Seiten noch circa 15 weitere unveränderte Basen, die das Anheften des Primers an die Zielsequenz der DNA-Matrize gewährleisten. Als Matrize wurde die murine, nichtmutierte PDXP-DNA in pETM-11 verwendet. Zusätzlich wurden zwei weitere Primer verwendet: es handelt sich hierbei um zwei Primer ohne veränderte Basensequenz, die für die Generierung aller PDXP-Mutanten zum Einsatz kamen, da sie das 3'- und 5'-Ende des PDXP-Gens markieren und gleichzeitig über eine Schnittstelle mit den Restriktionsenzymen NcoI und EcoRI verfügen. Die Mutationen wurden mittels *nested* (engl. verschachtelt) PCR in die murine PDXP-Sequenz eingefügt. Das Prinzip der *nested* PCR ist in Abbildung 4 beschrieben.

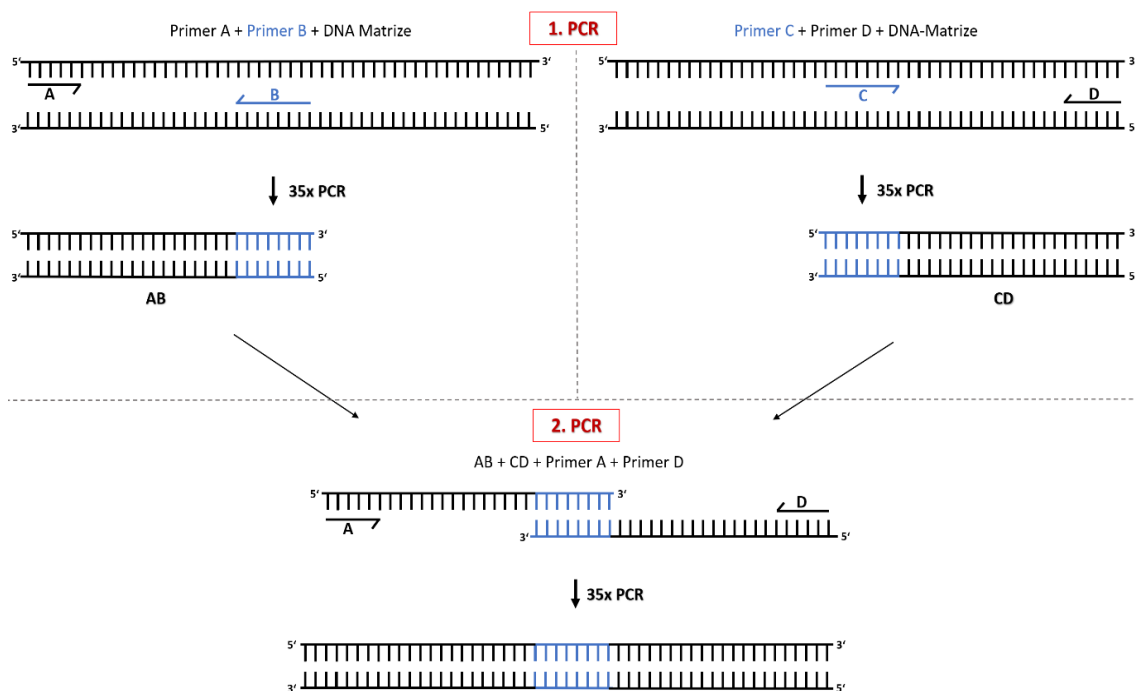


Abbildung 4: Nested PCR der PDXP-Mutanten

Bei der *nested* PCR werden zwei PCR-Durchläufe mit unterschiedlichen Versuchsansätzen nacheinander durchgeführt, um das mutierte PDXP-Gen zu amplifizieren. Primer B und C (blau) sind komplementär zueinander und enthalten die gewünschten Mutationen. Primer A und D (schwarz) enthalten keine Mutationen und binden am 5'- und 3'-Ende des PDXP-Gens. Als DNA-Matrize (schwarz) dient die in pETM-11 klonierte, nichtmutierte PDXP-DNA. In der ersten PCR werden doppelsträngige PDXP-Sequenzen, die die Mutation enthalten, allerdings noch unvollständig sind, synthetisiert und amplifiziert. Dazu wird ein PCR-Durchlauf mit 35 Zyklen mit der DNA-Matrize, Primer A und B und in einem getrennten Versuchsansatz ein weiterer PCR-Durchlauf mit der DNA-Matrize und den Primern C und D durchgeführt. Die gewünschten Fragmente (Template AB respektive Template CD) werden mithilfe eines 1%igen Agarosegels entnommen und zusammen mit den Primern A und D einem zweiten PCR-Durchlauf hinzugefügt. Das Ergebnis dieser PCR ist nun eine amplifizierte, vollständige, doppelsträngige PDXP-Sequenz, die die gewünschten Mutationen enthält.

Das Designen der Primer, die PCR und die anschließende Ligation und Transformation wurden von Frau Kerstin Hadamek in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Der erste PCR-Durchlauf wurde dabei mit einer Konzentration von 10 ng Plasmid-DNA je 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Im zweiten PCR-Durchlauf wurden dann je 10 ng der Templates AB und CD des ersten PCR-Durchlaufs in 50 µl Reaktionsvolumen verdünnt. Dem Reaktionsgemisch wurden außerdem 0,5 µM der entsprechenden Primer, 0,2 µM dNTPs und die DNA-Polymerase mit zugehörigem Puffer und Enhancer gemäß Herstellerangaben hinzugefügt. Die DMSO-Endkonzentration des Versuchsansatzes lag bei hohen 10 %, da die Basensequenz von PDXP über einen hohen GC-Gehalt verfügt. Die Polymerasekettenreaktionen wurden mithilfe eines PCR Thermocyclers in 35 Zyklusdurchläufen vollzogen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Thermozyklen der PCR

Temperatur [°C]	Zeit [Sek]	Funktion
95	15	Denaturierung
68	30	Primer-Hybridisierung
72	30	Amplifikation

Die DNA-Stränge des PCR-Produktes wurden mittels Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden danach mithilfe des *Qiaquick Gel Extraction Kits* entsprechend den Herstellerangaben aus dem 1%igen Agarosegel geschnitten, gereinigt und deren Konzentration mittels Nanodrop 2000c Spectrometer gemessen.

Die mutierte PDXP-Sequenz wurde anschließend in das Plasmid pETM-11 kloniert. Dazu wurden die Restriktionsschnittstellen für NcoI und EcoRI genutzt, die im PCR-Produkt und in der *Multiple Cloning Site* von pETM-11 vorhandenen sind. Die Restriktionsenzyme sind in der Lage den DNA-Doppelstrang an definierten Erkennungssequenzen zu schneiden und können dadurch kompatible DNA-Enden erzeugen. Für den Restriktionsverdau wurden 43 µl der mutierten PDXP-Sequenz des PCR-Produktes mit 5 µl NEBuffer 2.1, 20 U EcoRI und 10 U NcoI versetzt und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. In einem separaten Versuchsansatz wurden 5 µg des leeren pETM-11-Vektors ebenfalls mit 5 µl NEBuffer 2.1, 20 U EcoRI und 10 U NcoI versetzt und zusätzlich noch 5 U *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP) hinzugefügt, um einer Religation des nun linear vorliegenden Vektors vorzubeugen. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C wurde der Erfolg des Verdau durch die Restriktionsendonukleasen mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert und anschließend die DNA mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit* aufgereinigt. Als letzter Schritt erfolgte die Ligation des mutierten PDXP-Inserts in den nun linear vorliegenden pETM-11-Vektor. Der Ligationsansatz setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen: 1 µl Vektor, 4 µl Insert, 1 µl Ligase, 1,5 µl Ligationspuffer 10x sowie 7,5 µl destilliertem Wasser. Nach 2,5 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur war die Ligation abgeschlossen und es folgte die Transformation in XL1. Im Anschluss daran wurde eine Mini-DNA-Plasmid-Präparation (wie in [119] beschrieben) durchgeführt und nach erfolgreicher Restriktionsanalyse die Klone zur Sequenzierung übermittelt. Die DNA-Sequenzierung des entstandenen Genproduktes durch Microsynth Seqlab, Göttingen bestätigte den Erfolg der ortsspezifischen Mutagenese.

2.2.3 Transformation

Kompetente Zellen sind in der Lage ihre Genetik zu verändern, indem sie die Fähigkeit besitzen freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Dieser Prozess wird in der Genetik als Transformation bezeichnet. Der Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) wurde durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe mittels CaCl_2 -Vorbehandlung (wie in [120] beschrieben) kompetent gemacht und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die kompetenten Bakterien wurden dann im Zuge der Transformation in einem Probevolumen von circa $100\text{ }\mu\text{l}$ auf Eis aufgetaut und für 10 Minuten mit $100\text{-}200\text{ ng}$ DNA inkubiert. Im Anschluss daran wurde ein Hitzeschock in $42\text{ }^\circ\text{C}$ warmen Wasser für 45 Sekunden durchgeführt. Der Hitzeschock ermöglicht die Aufnahme der DNA ins Zytosol der Bakterienzellen [121]. Danach wurde die Bakterienprobe erneut 10 Minuten auf Eis gelegt und daraufhin 1 ml LB-Medium hinzugefügt. In der anschließenden 45-minütigen Inkubationszeit bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Schüttler mit 180 rpm kommt es zur einer Vermehrung der Bakterien unter Expression der antibiotikaresistenten Gene des Plasmids. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien für 3 Minuten bei $1844 \times g$ zentrifugiert, der Großteil des hier entstandenen Überstandes verworfen und das Pellet mit dem verbliebenen Überstand resuspendiert. Diese Suspension wurde auf eine Agarplatte, der zuvor entsprechende Antibiotika (siehe Tabelle 2) beigemischt wurden, ausgebracht und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden vor Austrocknung geschützt bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank gelagert.

2.2.4 Proteinexpression

Die Proteinexpression beginnt mit dem Ansetzen einer Vorkultur. Dazu wurden 20 ml LB Medium mit $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Kanamycin und $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol versetzt und mit einer vorher transformierten Bakterienkolonie inokuliert. Die *E. coli* BL21 (DE3) Bakterien trugen das Expressions-Plasmid pETM-11 mit dem PDXP-Gen als auch das Chaperon-Plasmid pG-tf2, welches neben den Chaperonen GroES, GroEL und Tig zusätzlich für die Chloramphenicol-Resistenz kodiert. Diese Bakteriensuspension wurde bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ unter kontinuierlicher Rotation mit 180 rpm über Nacht inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann in dem Medium für die Expressionskultur verdünnt. Die Expressionskultur bestand zudem aus 800 ml LB-Medium mit $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol und

10 ng/ml Tetrazyklin. Tetrazyklin aktiviert den Promoter des pG-tf2 Plasmids und induziert somit die Expression der Chaperone in den Bakterien. Die Expressionskultur wurde anschließend bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation mit 180 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,6-0,8 bei 600 nm erreicht wurde. Die Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert die Expression von PDXP. Die Transkription des lac-Operons in pETM-11 wird durch einen Repressor verhindert. IPTG inaktiviert diesen Repressor und ermöglicht dadurch der mRNA-Polymerase den Zugang zum Promotor, wodurch die Expression beginnen kann. Nach 18 Stunden Expression bei 20 °C unter kontinuierlicher Rotation mit 180 rpm wurde die Bakterienlösung bei 4 °C mit $5000 \times g$ für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Proteinreinigung

Ziel der Proteinreinigung ist es, aus dem Zell-Lysat der Bakterien, das viele verschiedene Biomoleküle enthält, nur das überexprimierte PDXP anzureichern. Als Erstes wurde eine Tablette *EDTA-free Protease Inhibitor* in 50 ml TMN-Puffer gelöst. Diese Mischung verschiedener Protease-Inhibitoren soll verhindern, dass bakterielle Proteasen des Zell-Lysats das überexprimierte PDXP abbauen. Pro Gramm Pellet wurden 5 ml der Protease-Inhibitor-TMN-Lösung verwendet und das gefrorene Pellet damit resuspendiert. Dann wurde 1 mg/ml Lysozym hinzugefügt und die Zellsuspension unter konstanter Rotation bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden 0,05 mg/ml (150 U/ml) DNase I hinzugefügt, um die Viskosität des Bakterien-Lysats zu reduzieren. Zusätzlich zur enzymatischen Lyse der Bakterienzellen mit Lysozym wurde eine mechanische Lyse mit Ultraschall vollzogen. Dabei wurde die auf Eis gelegte Bakteriensuspension dreimal 40 Sekunden lang mit einer Pulslänge von 0,7 Sekunden und einer Intervalllänge von 1 Sekunde beschallt. Der Zelldebris des Zell-Lysats wurde durch einen 40-minütigen Zentrifugationsvorgang bei 4 °C mit $14000 \times g$ vom Überstand getrennt und verworfen. Dem Überstand wurde anschließend 20 mM Imidazol hinzugefügt und dem ÄKTApurifizier zugeführt. Die Proteinaufreinigung mithilfe des ÄKTApurifiziers erfolgte nach dem Prinzip der *Immobilized Metal Affinity Chromatography*. Dabei wird das bakterielle Lysat über eine HisTrap HP 1ml Säule gepumpt. Am N-terminalen Ende der PDXP-Sequenz folgt in dem pETM-11 Vektor eine Sequenz von sechs aufeinanderfol-

genden Histidinen. Dieser Hexahistidin-*tag* ist mit den Aminosäuren von PDXP verbunden und bindet an Nickel-Ionen des Säulenmaterials. Dadurch werden His-getaggte Proteine aus dem bakteriellen Lysat selektiv herausgefiltert. In einem nächsten Schritt verdrängen hohe Imidazol-Konzentrationen die His-getaggten Proteine aus ihren Bindungen an die Nickel-Ionen. Die gebundenen Proteine werden fraktioniert eluiert und die einzelnen Elutionsfraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese auf das gewünschte Protein untersucht. Die mit Waschpuffer äquilibrierte HisTrap HP Säule wurde manuell mit dem Zell-Lysat beladen. Dann wurden die gebundenen Proteine mit einem linear ansteigenden Mischungsverhältnis von Elutionspuffer zu Waschpuffer (siehe Tabelle 5) bei 0,5 ml/min eluiert. Alle PDXP-enhaltenden Elutionsfraktionen wurden zusammengeführt und auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Dem konzentrierten Proteineluat des PDXP-Wildtyps wurde anschließend eine *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease hinzugegeben. Dieses proteolytische Enzym ist in der Lage den His-*tag* am N-terminalen Ende der Aminosäuresequenz von PDXP abzuspalten. Der TEV-Verdau fand zeitgleich mit der Dialyse des Proteineluats gegen TMN-Puffer statt. Dazu wurde das Eluat mit der TEV-Protease in eine *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette* gefüllt und für 48 Stunden bei 4 °C gegen 5 Liter TMN-Puffer dialysiert. Mit der Dialyse kann die hohe Imidazolkonzentration im Proteineluat effektiv gesenkt werden. Bei der PDXP-Mutanten wurde der Prozess der Proteinaufreinigung nach der Dialyse ohne TEV-Verdau beendet. Hinsichtlich des PDXP-Wildtyps wurde wie folgt weiter verfahren: Die TEV-Protease trägt an einem Ende ihrer Aminosäuresequenz ebenfalls einen His-*tag*. Dadurch kann sie zusammen mit den abgetrennten His-*tags* aus dem Proteineluat entfernt werden. Dazu wurde ein zweiter Lauf über die HisTrap HP Säule mit dem ÄKTApurifizier durchgeführt. Wieder bindet der His-*tag* an das Säulenmaterial, diesmal befindet sich das gereinigte PDXP, das nach dem TEV-Verdau über keinen His-*tag* mehr verfügt, allerdings in den Durchflussfraktionen. Als letzter Schritt der Proteinaufreinigung schließt sich die Größenausschlusschromatographie an. Mit dieser Methode können Biomoleküle anhand ihrer Größe in Lösung chromatographisch getrennt werden. Poröse Polymere der stationären Phase der Säule bewirken, dass Moleküle, abhängig von ihrer Größe, in unterschiedlichem Ausmaß in die Poren hinein diffundieren können. Das somit vergrößerte Diffusionsvolumen für kleine Moleküle resultiert in einer verlängerten Retentionszeit und letztlich in einer späteren Elution. Sehr große Moleküle können nicht oder nur wenig in das gepackte Säulenbett eintauchen und

eluiert als Erstes. Das aufgereinigte und auf 1 ml konzentrierte Protein wurde mit einer TBC-Einmalspritze in die entsprechende Vorrichtung des ÄKTApurifier-Systems injiziert und nachfolgend auf die mit TMN-Puffer äquilibrierte Säule gegeben und fraktioniert eluiert. Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese auf PDXP-Gehalt und -Reinheit geprüft und, falls erforderlich, nochmal aufkonzentriert.

Tabelle 5: Puffer der Proteinaufreinigung

TMN-Puffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM TAE, pH 7,4	50 mM TAE, pH 7,4	50 mM TAE, pH 7,4
250 mM NaCl	250 mM NaCl	250 mM NaCl
5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂
	20 mM Imidazol	500 mM Imidazol

2.2.6 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem *Pierce Protein Assay Kit* bestimmt. Diese biochemische Methode nutzt die Eigenschaft von Bicinchoninsäure (BCA), welches zusammen mit einwertigen Kupfer-Ionen blau-violette Farbkomplexe bildet. Einwertige Kupfer-Ionen entstehen bei der Reduktion von zweiwertigen Kupfer-Ionen mit einer Peptidbindung des Proteins. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde der entstandene Farbstoff bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem *EnVision 2104 multilabel reader* photometrisch gemessen. Als Referenz wurde zeitgleich eine Verdünnungsreihe mit einem bovinen Serumalbumin (BSA)-Standard bekannter Konzentration herangezogen. Die Konzentration der zu untersuchenden Proteinlösung wurde anhand der Standardkurve des BSA-Standards berechnet.

2.2.7 Messung der Aktivität der Phosphatasen

2.2.7.1 Phosphat-Quantifizierung mit Biomol Green

Phosphatasen katalysieren die enzymatische Abspaltung eines Phosphatrestes von einem phosphorylierten Biomolekül. Das dabei freigesetzte Orthophosphat soll mit der hier beschriebenen Methode quantifiziert werden. Dazu wird Biomol Green dem Versuchsansatz hinzugegeben. Dieses Reagenz stoppt zum einen die enzymatische Reaktion, da dessen hohe Azidität die Denaturierung von Proteinen verursacht. Zum anderen ist Biomol Green als Einkomponentensystem eine Weiterentwicklung des klassischen Malachitgrüns. Das

zentration zurückgerechnet werden. Da experimentell keine OD-Werte größer als 0,3 vor- kamen, wurden Phosphat-Konzentrationen größer als 20 μM als Inputvariablen für die Berechnung der Funktion der Kurvenanpassung vernachlässigt. Somit ist das Fitting der Kurve in dem experimentell relevanten Bereich akkurater.

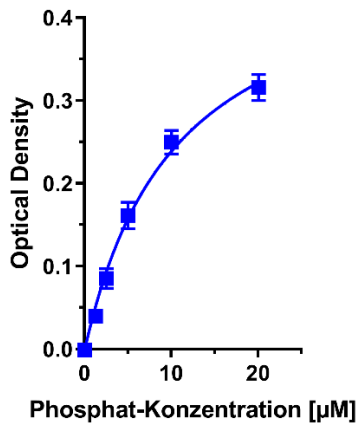


Abbildung 6: Phosphatstandardkurve

Messung der *Optical Density* (OD) bei 620 nm einer Phosphat-Konzentrationsreihe nach Zugabe von Bi-mol Green. Für Phosphatkonzentrationen kleiner als 5 μM besteht näherungsweise ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Phosphatkonzentration und der gemessenen OD. Die Funktion der mittels nicht-linearer Regression berechneten Kurvenanpassung lautet: $f(x) = 0,4919x/(10,51+x)$ (x : Phosphat-Konzentration in μM).

2.2.7.3 Durchführung der Aktivitätsmessungen

Für enzymkinetische Untersuchungen ist es entscheidend diese unter gleichbleibenden Bedingungen durchzuführen. Dazu wurde die Phosphatfreisetzung der untersuchten Phosphatasen in Abhängigkeit der Reaktionszeit überprüft. In den ersten Reaktionsminuten besteht typischerweise ein linearer Zusammenhang zwischen dem Anstieg der OD-Werte, respektive der umgesetzten Phosphatmoleküle, mit der Reaktionszeit. Mit weiter zunehmender Reaktionszeit fällt die Steigung dieser Kurve dann immer weiter ab, bis alle Substratmoleküle umgesetzt sind. Die für die folgenden Aktivitätstests festgelegten Parameter beruhen auf den linearen Bedingungen innerhalb der ersten Reaktionsminuten, da mit den Aktivitätstests die initiale Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms abgegriffen werden soll. Zusätzlich sollen Limitationen durch die Substratkonzentration möglichst vermieden werden. Beispielsweise ist es leicht möglich Stimulationen oder Inhibitionen der Enzymaktivität zu übersehen, wenn alle aktiven Zentren der Enzyme mit Substrat gesättigt sind. Als dritte Anforderung an die Parameter der Aktivitätsassays ist ein adäquater, möglichst unter 0,2 liegender OD-Wert zu nennen, da in diesem Bereich die Phos-

phatstandardkurve linear verläuft. Den oben genannten Forderungen kann durch die gegenseitige Abstimmung der Parameter Enzymkonzentration, Substratkonzentration und Reaktionszeit gerecht werden.

Für die Aktivitätsmessungen wurden rekombinant hergestelltes und gereinigtes Protein (siehe 2.2.4, 2.2.5) verwendet. Die Versuche wurden auf einer 96-well Platte und bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Reaktionsgesamtvolumen lag stets bei 50 μ l, dazu wurden alle Komponenten im Assay-Puffer der jeweiligen Phosphatase (siehe Tabelle 6) gelöst. Genauere Informationen bezüglich der verwendeten Enzymmenge pro Versuchsansatz, der Substratkonzentrationen und der Reaktionszeiten für die getesteten Phosphatasen können aus Tabelle 7 entnommen werden. Die verwendeten Flavone als Modulatoren der Enzymaktivität wurden zuerst in dem polaren Lösungsmittel DMSO auf eine Konzentration von 10 mM gelöst. Davon wurde im Anschluss die experimentell benötigte Menge in Assay-Puffer auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Falls die Enzymaktivität unter Anwesenheit eines Flavons gemessen wurde, wurde dieses vorab 10 Minuten mit dem Enzym inkubiert und erst danach die enzymatische Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. In Versuchsreihen mit verschiedenen Flavon-Konzentrationen lag die DMSO-Endkonzentration aller Versuchsansätze bei 1 %. Nach einer definierten Reaktionszeit wurden den Versuchsansätzen 100 μ l Biomol Green hinzugegeben. Daraufhin wurde der Versuchsansatz erneut 10 Minuten inkubiert und anschließend die Absorption bei 620 nm mit einem *EnVision2104 multilabel reader* gemessen. Bei Experimenten zur Bestimmung der Enzymaktivität für verschiedene Inhibitorkonzentrationen wurden zeitgleich zum eigentlichen Versuchsansatz auf der gleichen Platte weitere Versuchsansätze zur Messung des Hintergrundes des eigentlichen Versuchsansatzes durchgeführt. Diese Versuchsansätze mit identischer Zusammensetzung erhielten die gleiche Behandlung, allerdings wurde die Enzymlösung durch reinen Assay-Puffer ersetzt, so dass keine Reaktion stattfand. Die hier gemessenen OD-Werte wurden von denen der entsprechenden eigentlichen Reaktionsansätze abgezogen und im Anschluss bezüglich des Versuchsansatzes ohne Inhibitorzugabe normalisiert. Jedes Experiment wurde in Duplikaten dreimal durchgeführt und die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism 6 und Microsoft Excel. Gemäß der Michaelis-Menten-Enzymkinetik wurden mithilfe von nicht-linearer Regression die Michaelis-Konstante

(K_m), die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) und im Falle eines Inhibitorzusatzes die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) berechnet.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Assay-Puffer der jeweiligen Phosphatasen

Pyridoxal Phosphatase (PDXP), Phosphoserin Phosphatase (PSPH)	Lysin-Histidin-Pyrophosphat Phosphatase (LHPP), Magnesium-abhängige Phosphatase (MDP1), Phosphoglykolat Phosphatase (PGP)	Phosphatase Orphan 2 (PHOSPHO2)
30 mM TAE, pH 7,5 30 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,01 % (v/v) Triton X-100	30 mM TAE, pH 7,5 30 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,01 % (v/v) Triton X-100 5 mM DTT	50 mM Imidazol pH 7,0 5 mM MgCl ₂ 0,01 % (v/v) Triton X-100 5 % Glycerol

2.2.8 Grundlagen der Proteinkristallisation

Die Proteinkristallisation mit der anschließenden Röntgenstrukturanalyse verfolgt das Ziel, eine dreidimensionale Struktur eines gewünschten Proteins mit atomarer Auflösung zu erhalten. Dazu wird das Beugemuster von Röntgenstrahlen an einem Kristall des Proteins analysiert und interpretiert. Optische Methoden für die Bestimmung der Struktur von Proteinen versagen, da das Protein, in diesem Fall PDXP als Dimer, kleiner ist als die Wellenlänge von sichtbarem Licht. Röntgenstrahlung hat eine Wellenlänge unter 10 nm und wird dadurch auch an kleinsten Molekülen gebeugt. Die Kultivierung von Kristallen ausreichender Größe und Qualität stellt eine essenzielle Voraussetzung für die spätere Röntgenstrukturanalyse dar. Im Kristall liegen die Proteinmoleküle mit identischer räumlicher Orientierung in einer regelmäßigen dreidimensionalen Anordnung vor. Die kleinste Einheit des Kristalls ist eine Elementarzelle. Dieses Volumenelement unterteilt den Kristall in identische Komponenten und ist dadurch repräsentativ für den gesamten Kristall. Durch periodische Translation der Elementarzelle in allen drei Raumrichtungen lassen sich alle Eckpunkte des Kristallgitters beschreiben. Die gleichmäßige Anordnung des Proteins im Kristall bewirkt, dass jedes Molekül des Proteins unter Röntgenbestrahlung identische Beugestrahlen auslöst, die in Summe nachweisbar sind. Da Röntgenstrahlen nicht von Linsen fokussiert werden können, werden die Richtungen und die Intensitäten der gebeugten Strahlen mit Detektoren gemessen. Elektromagnetische Wellen

sind aber zusätzlich zu ihrer Amplitude noch durch ihre Frequenz und ihre Phase definiert. Die Frequenz der entstehenden Streustrahlen entspricht der der auslösenden Röntgenstrahlen, aber Informationen über die Phase einer Welle können experimentell nicht detektiert werden. Um diese dennoch zu erhalten wurde die Methode des molekularen Ersatzes [124, 125] angewandt: anhand einer gelösten Proteinstruktur eines ähnlichen Proteins können die unbekannt Phasen antizipiert werden. Die Summe der gestreuten Strahlen durch jedes Atom der Elementarzelle ergibt ein definiertes Diffraktionsmuster. Dieses kann zusammen mit den bekannten Phasen mithilfe der umgekehrten Fourier-Transformation zu einem Bild rekonstruiert werden. Dabei handelt es sich um Elektrodichtewolken, die die Moleküle der Elementarzelle umgeben. Auf Grundlage der Interpretation dieser Daten entwickelt der Kristallograph im Einklang mit der Aminosäuresequenz des Proteins und den etablierten Prinzipien zur Molekülstruktur und Stereochemie abschließend ein geeignetes dreidimensionales molekulares Modell des Proteins. Bei einer Co-Kristallisation wird der Proteinlösung zusätzlich noch ein Ligand hinzugefügt, mit dem Ziel, die Interaktion des Liganden mit dem Protein auf struktureller Ebene analysieren zu können.

Ein Kristall entsteht durch langsame, gezielte Präzipitation, indem die wässrige Proteinlösung langsam zur Übersättigung gebracht wird. Um die Präzipitation kontrolliert hervorzurufen, nutzt man Dampfdiffusion in Kombination mit der Zugabe von Fällmitteln. Fällmittel wie Polyethylenglykole oder Ammoniumsulfate [126] haben einen stark hygroskopischen Effekt, wodurch die Hydratation des Proteins eingeschränkt wird. In einem abgeschlossenen System streben zwei unterschiedlich konzentrierte Lösungen, die Proteinlösung und die Stammlösung, danach den bestehenden Konzentrationsgradienten auszugleichen. Nach dem *sitting-drop*-Verfahren befindet sich die Proteinlösung auf einem Podest oberhalb der Stammlösung (vergleiche Abbildung 7). Die Stammlösung besteht aus reinem Kristallisationspuffer, während die Proteinlösung eine definierte Mischung aus dem Protein in seinem Puffer mit der Stammlösung ist. Das Wasser der Proteinlösung diffundiert durch die Gasphase hindurch in die höher konzentrierte Stammlösung, solange bis sich die Konzentrationen der Fällmittel beider Lösungen angleichen. Als Folge davon steigt sowohl die Konzentration des Proteins als auch die des Fällmittels in der Proteinlösung an. Ab einem gewissen Schwellenwert der übersättigten Lösung bilden sich Kristallisationskeime, von denen ausgehend die Kristalle langsam wachsen. Die

Kristallisation von Proteinen hängt dabei von zahlreichen Parametern wie der Proteinkonzentration und -reinheit, pH-Wert, Fällungsmittel, Ionenstärke der Lösung und der Temperatur ab.

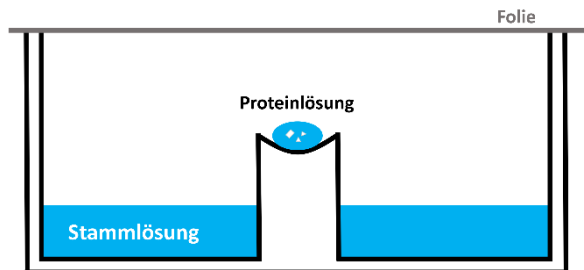


Abbildung 7: *Sitting-drop*-Technik der Proteinkristallisation

Bei der *Sitting-drop*-Technik ruht die Proteinlösung auf einer Vorrichtung oberhalb eines Reservoirs aus reinem Kristallisationspuffer (Stammlösung). Beide Lösungen stehen über Dampfdiffusion miteinander in Verbindung. Die Kristalle entstehen in der Proteinlösung, wenn diese langsam zur Übersättigung gebracht wird. Die Folie verschließt den Reaktionsraum luftdicht und schafft so ein abgeschlossenes Reaktionssystem.

Die Kristallisationsansätze wurden von Frau Nicole Bader aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Schindelin im Rudolf Virchow Zentrum Würzburg hergestellt. Die aufgereinigte und auf 10 mg/ml konzentrierte PDXP-Lösung in TMN-Puffer wurde mit 100 mM in DMSO gelöstem 7,8-DHF in den Verhältnissen 1:3, 1:2 und 1:1,5 vermischt und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um eventuell vorhandene Präzipitate zu entfernen. Die verwendeten Stammlösungen basieren auf kommerziell erhältlichen Kristallisationspuffersammlungen und wurden mithilfe eines Pipettierroboters hergestellt. Der Kristallisationsroboter pipettierte anschließend 0,1 µl der Proteinlösung mit 0,1 µl der Stammlösung auf die entsprechende Vorrichtung einer 96-well Platte, als Reservoir dienten dabei 50 µl der Stammlösung. Im Anschluss wurden die Platten mit Folie luftdicht abgeschlossen und im Kristallisationshotel bei 4 °C oder 20 °C gelagert. Das Kristallwachstum wurde täglich kontrolliert. Die entstandenen Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Datensätze wurden an der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) aufgenommen und durch Herrn Prof. Dr. Schindelin (Rudolf Virchow Zentrum, Würzburg) ausgewertet und weiterverarbeitet. Das Phasenproblem wurde dabei mittels molekularem Ersatz anhand der Struktur von murinem PDXP (PDB: 4BX3) gelöst.

Die grafische Wiedergabe der Strukturdaten und die Erstellung sämtlicher Abbildungen von Proteinstrukturen in dieser Arbeit wurde mit dem Programm Pymol 2.4 durchgeführt.

2.2.9 Statistik

Alle experimentellen Daten zur Untersuchung der Enzymkinetik wurden in Duplikaten in drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$) erhoben. Die Berechnungen von K_m , v_{max} und IC_{50} erfolgte mittels nichtlinearer Regression mit dem Programm GraphPad Prism 6.

3. Ergebnisse

3.1. *In-vitro* Aktivitäts-Assays zur Charakterisierung der 7,8-DHF-vermittelten PDXP-Inhibition

3.1.1. Enzymkinetische Aktivitätsbestimmung

Für die Aktivitätsuntersuchungen wurde rekombinant hergestelltes und gereinigtes Protein verwendet. Dabei wurde die Transformation, Expression und Aufreinigung des PDXP-Wildtyps und der PDXP-Mutanten wie in 2.2.3 - 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Für Aktivitätsassays mit den übrigen HAD-Phosphatasen wurde auf von ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Gohla exprimiertes und gereinigtes Protein zurückgegriffen. SDS-Gele des gereinigten PDXPs, die mit Coomassie Blue gefärbt wurden, können Abbildung 8 entnommen werden.

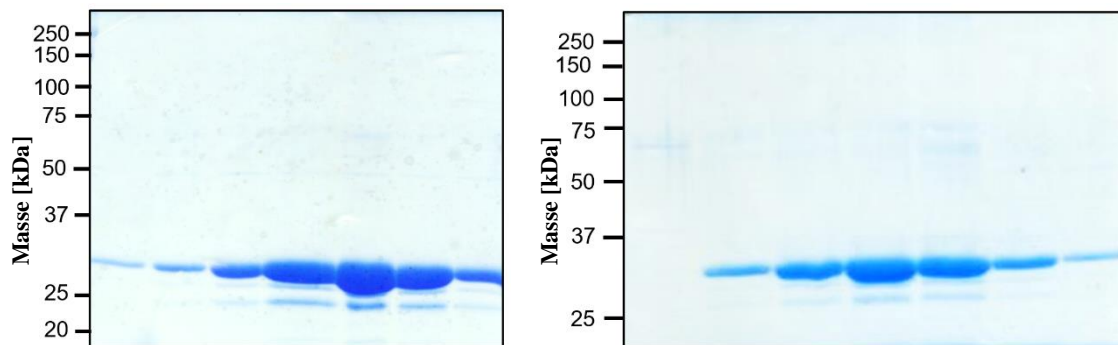


Abbildung 8: SDS-Gele des gereinigten PDXPs gefärbt mit Coomassie Blue

Die 12%igen SDS-Gele zeigen ausgewählte Elutionsfraktionen der Größenausschluss-Chromatographie, dem letzten Schritt in der PDXP-WT-Aufreinigung von zwei verschiedenen Reinigungsdurchläufen. Die einzelnen Spuren entsprechen ausgewählten Elutionsfraktionen. Monomeres PDXP hat eine Masse von 31 kDa.

Die Aktivitätsassays wurden mit den in Tabelle 7 definierten Reaktionsbedingungen umgesetzt. Die hier aufgeführten Werte der Parameter Enzymkonzentration, Substratkonzentration und Reaktionszeit erfüllen die in 2.2.7.3 beschriebenen Anforderungen für die Aktivitätsuntersuchungen der jeweiligen Phosphatasen.

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen der Aktivitätsassays der getesteten HAD-Phosphatasen

HAD-Phosphatase	Cap-Typ [7]	Enzymmenge [ng]	Enzymkonzentration [nM]	Substrat	Reaktionszeit [min]
Lysin-Histidin-Pyrophosphat Phosphatase (LHPP)	C2	250	171,6	Pyrophosphat (2 mM)	30
Phosphatase Orphan 2 (PHOSPHO2)	C1	1000	725,6	PLP (0,5 mM)	2
Phosphoserin Phosphatase (PSPH)	C1	10	8,0	O-phospho-L-serin (20 µM)	10
Magnesium-abhängige Phosphatase (MDP1)	C0	100	107,6	D-Ribose-5-phosphat (4 mM)	4
Phosphoglykolat Phosphatase (PGP)	C2	20	11,6	Phosphoglykolat (200 µM)	3
Pyridoxal Phosphatase (PDXP)	C2	100	63,5	PLP (50 µM)	8

Alle Versuche wurden unter Raumtemperatur durchgeführt.

Die Zusammensetzung des Puffers der jeweiligen Phosphatasen können aus Tabelle 6 entnommen werden.

3.1.2. Inhibition der PDXP-Aktivität durch 7,8-DHF

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurde auf der Suche nach einem PDXP-Inhibitor eine *High-Throughput Screening* Kampagne durchgeführt. Das vielversprechendste Ergebnis unter den herrschenden Testbedingungen stellte 7,8-DHF dar. Um die Inhibition der PDXP-Aktivität durch 7,8-DHF jetzt näher zu untersuchen, wurde die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration untersucht und der IC_{50} -Wert berechnet. IC_{50} bedeutet mittlere inhibitorische Konzentration und bezeichnet die Inhibitorkonzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Der Wert der IC_{50} ist damit ein Maß für die Fähigkeit eines Inhibitors eine gewünschte biologische Zielstruktur zu inhibieren [32]. Die Ergebnisse dieser Experimente sind Abbildung 9 zu entnehmen. Bis zu einer 7,8-DHF-Konzentration von circa 7,5 µM bewirken zunehmende 7,8-DHF-Konzentrationen eine Reduktion der Enzymaktivität, was zu der typisch sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve führt. Der mittels nichtlinearer Regression berechnete Wert der IC_{50} liegt für diesen Wertebereich bei 0,95 µM. Ab einer 7,8-DHF-Konzentration von 7,5 µM nimmt die scheinbare PDXP-Aktivität mit steigenden Flavonkonzentrationen entgegen aller Erwartungen wieder zu. Dies ist mutmaßlich auf Präzipitationen des Flavons bei

hohen Konzentrationen zurückzuführen. 7,8-DHF ist in wässrigen Puffern nur schwer löslich [127]. Es ist auch ersichtlich, dass die Enzymaktivität unabhängig von der Inhibitorkonzentration maximal zu circa 65 % inhibiert werden kann. Trotz Variationen im Versuchsaufbau ist es mit dieser Methode nicht gelungen eine volle Inhibition der PDXP-Aktivität durch 7,8-DHF nachzuweisen. Konkret wurde versucht das Flavon soweit wie möglich in reinem DMSO zu verdünnen und erst durch Zugabe zur Enzymlösung die Zielkonzentration im Assay-Puffer zu erreichen. Auch die Anwesenheit von 2 % DTT im Reaktionspuffer, das als Reduktionsmittels möglicherweise die Protein-Inhibitor-Interaktion beeinflusst, konnte keine veränderte Wirksamkeit von 7,8-DHF auf PDXP auslösen. DTT zeigte auch ohne Zusatz von 7,8-DHF keine Auswirkung auf die Aktivität von PDXP. Dennoch kann festgehalten werden, dass 7,8-DHF tatsächlich ein direkter Inhibitor der PDXP-Aktivität ist, mit einer IC_{50} im submikromolaren Bereich.

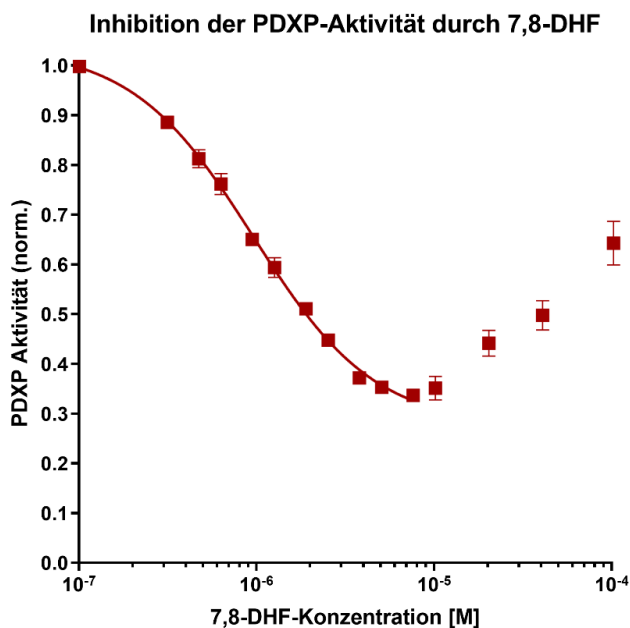


Abbildung 9: Direkte Inhibition der PDXP-Aktivität durch 7,8-DHF

Darstellung der PDXP-Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration von 7,8-DHF mit den jeweiligen Stichprobenfehlern (SEM). Die *in-vitro* Versuche zur Enzymkinetik wurden mit rekombinant hergestelltem und gereinigtem PDXP (murin) und mit PLP als Substrat durchgeführt. Die Ergebnisse der Absorptionmessungen der gebildeten Phosphomolybdatokomplexe als Ableitung der freien Phosphatkonzentration wurden anhand der Phosphatstandardkurve in die freigesetzte Phosphatmenge umgerechnet und anschließend bezüglich der Enzymaktivität ohne Zugabe des Inhibitors normalisiert. Für Inhibitorkonzentrationen unter 10 μ M beträgt der mittels nichtlinearer Regression berechnete Wert der IC_{50} 0,95 μ M. Die Messdaten wurden in Duplikaten aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten erhoben.

Um mehr über die Inhibition der Enzymaktivität durch 7,8-DHF zu erfahren, wurden die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) und die Michaelis-Konstante (K_m) der

Phosphatase mit und ohne Einfluss des Inhibitors bestimmt. Zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurde die Enzymaktivität wie in 2.2.7 beschrieben ermittelt. Die aus den Messergebnissen berechnete Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion entspricht zugleich der Aktivität des Enzyms. Die Ergebnisse (siehe Abbildung 10) stehen im Einklang mit der Michaelis-Menten-Theorie [128]: es besteht die charakteristische hyperbole Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration. Bei PLP-Konzentrationen von über 100 μM kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch Steigerung des Substratangebotes nicht mehr wesentlich ansteigen. Es stellt sich ein Sättigungszustand ein, sobald der Großteil aller katalytischen Zentren besetzt ist. Mittels nicht-linearer Regression konnten aus den experimentell gewonnenen Daten die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und die Michaelis-Konstante ermittelt werden. Die Michaelis-Konstante gibt diejenige Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird und kann annäherungsweise als ein Maß für die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat betrachtet werden [129]. Dasselbe experimentelle Vorgehen wurde ebenso unter Anwesenheit von 7,8-DHF durchgeführt. Abbildung 10 und Tabelle 8 zeigen, dass unter steigenden 7,8-DHF-Konzentrationen die enzymatische Aktivität von PDXP abnimmt, die Michaelis-Konstante steigt und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit sinkt. Der Anstieg der Michaelis-Konstante deutet auf einen kompetitiven Charakter der Enzymhemmung hin, allerdings lässt sich aus dem gleichzeitigen Abfall der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit schließen, dass ein gemischter und komplexer Hemmtyp vorliegt.

Michaelis-Menten-Enzymkinetik

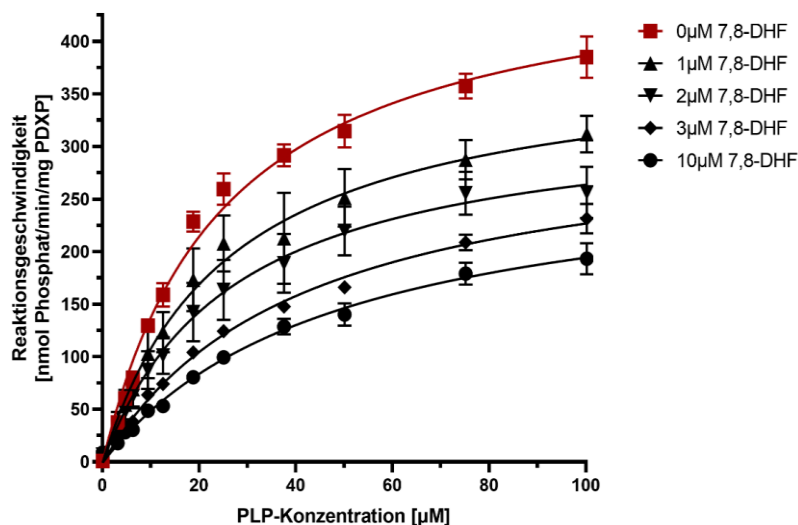


Tabelle 8: Enzymkinetische Parameter v_{\max} und K_m für PDXP mit 7,8-DHF

7,8-DHF [µM]	v_{\max} [nmol P _i /min /mg PDXP]	K_m [µM]
0	484	25
1	387,1	25,6
1,5	361,3	29,2
2	334,8	26,7
3	320,1	40,7
5	336,7	56,6
10	289,3	48,4

Abbildung 10: Michaelis-Menten-Enzymkinetik für PDXP mit 7,8-DHF

Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit v (nmol freigesetztes Phosphat \times min⁻¹ \times mg⁻¹) in Abhängigkeit der PLP-Konzentration für verschiedene 7,8-DHF-Konzentrationen mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittelwerts (SEM). Die *in-vitro* Versuche zur Enzymkinetik wurden mit rekombinant hergestelltem und gereinigtem PDXP (murin) und mit PLP als Substrat durchgeführt. Die gebildeten Phosphomolybdatokomplexe als Ableitung der freien Phosphatkonzentration wurden mittels photometrischer Absorptionsmessung bei 620 nm bestimmt und anhand der Phosphatstandardkurve in die Reaktionsgeschwindigkeit umgerechnet. Die enzymkinetischen Parameter maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) und Michaelis-Konstante (K_m) wurden mittels nicht-linearer Regression berechnet und sind Tabelle 8 zu entnehmen. Die Messdaten wurden in Duplikaten aus insgesamt 3 unabhängigen Experimenten erhoben.

3.1.3. Untersuchung der Selektivität von 7,8-DHF als PDXP-Inhibitor

3.1.3.1. Modulation der PDXP-Aktivität durch Strukturanaloga von 7,8-DHF

In 3.1.2 konnte gezeigt werden, dass 7,8-DHF einen direkten inhibitorischen Effekt auf die PDXP-Aktivität hinsichtlich der Hydrolyse von PLP ausübt. Also nächstes soll die Selektivität von 7,8-DHF als PDXP-Inhibitor untersucht werden. Dazu wurde zunächst der Einfluss von Substanzen mit ähnlicher chemischer Struktur wie 7,8-DHF auf die PDXP-Aktivität untersucht. Die getesteten Substanzen wurden käuflich erworben und können aus Abbildung 11 entnommen werden. Sie verfügen alle über das Flavon-Grundgerüst und variieren in der Anzahl und Positionierung der zusätzlichen Hydroxygruppen. Die Ergebnisse der Aktivitäts-Assays zeigen, dass nur eine der getesteten Substanzen in der Lage ist die PDXP-Aktivität zu modulieren, nämlich das 3,7,8-Trihydroxyflavon-4'-hydroxyphenyl. Dieses Flavon kann die PDXP-Aktivität signifikant inhibieren. Allerdings ist die inhibitorische Wirkstärke von 3,7,8-Trihydroxyflavon-4'-hydroxyphenyl

verglichen mit der von 7,8-DHF aus Abbildung 9 geringer, was an dem deutlich größeren IC_{50} -Wert von 2,3 μM versus 0,95 μM abgelesen werden kann.

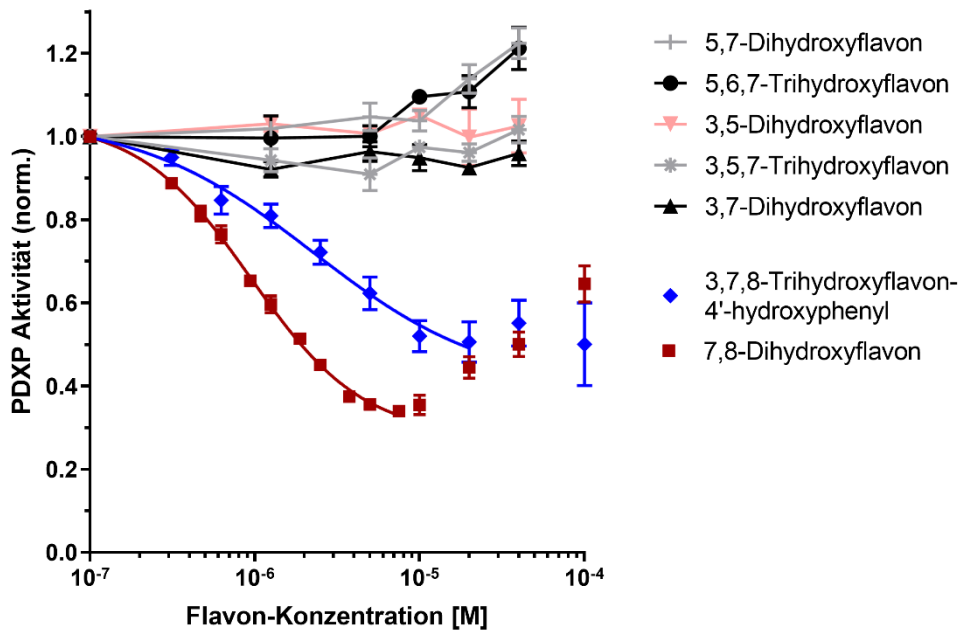


Abbildung 11: Inhibition der PDXP-Aktivität durch Strukturanaloga von 7,8-DHF

Darstellung der PDXP-Aktivität in Abhängigkeit der Flavon-Konzentration für verschiedene Strukturanaloga von 7,8-DHF im Vergleich zu 7,8-DHF (Ergebnisse aus Abbildung 9) mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittelwerts (SEM). Die *in-vitro* Versuche zur Enzymkinetik wurden mit rekombinant hergestelltem und gereinigtem PDXP (murin) und mit PLP als Substrat durchgeführt. Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen der gebildeten Phosphomolybdatkomplexe als Ableitung der freien Phosphatkonzentration wurden anhand der Phosphatstandardkurve in die freigesetzte Phosphatmenge umgerechnet und anschließend bezüglich der Enzymaktivität ohne Zugabe des Inhibitors normalisiert. Für 3,7,8-Trihydroxyflavon-4'-hydroxyphenyl beträgt der mittels nichtlinearer Regression berechnete Wert der IC_{50} 2,3 μM . Die Messdaten wurden in Duplikaten aus insgesamt 3 unabhängigen Experimenten erhoben.

3.1.3.2. Modulation der Enzymaktivität anderer HAD-Phosphatasen durch 7,8-DHF

Als Zweites wurde der Einfluss von 7,8-DHF auf die Enzymaktivität anderer HAD-Phosphatasen untersucht (siehe Abbildung 12). Dabei wurden Vertreter vom *cap*-Typ C0, C1 und C2 und somit aller strukturellen Subtypen der HAD-Phosphatasen untersucht. Die Pufferzusammensetzung der jeweiligen Phosphatase und die konkreten Versuchsbedingungen der Aktivitätsassays können aus Tabelle 6 und Tabelle 7 entnommen werden. Die Enzymaktivität von Lysin-Histidin-Pyrophosphat Phosphatase (LHPP), Phosphatase Orphan 2 (PHOSPHO2), Phosphoserin Phosphatase (PSPH) und der Magnesium-abhängigen Phosphatase (MDP1) wurden mit dem Substrat Pyrophosphat respektive PLP, O-phospho-L-serin und D-Ribose-5-phosphat untersucht und zeigen in Anwesenheit von 7,8-DHF keine veränderte Enzymaktivität. Im Gegensatz dazu verhält sich die Phosphoglykolat Phosphatase (PGP). Diese ist der nächste Paralog

von PDXP [130]. PGP zeigt unter Anwesenheit von 7,8-DHF eine verminderte Enzymaktivität hinsichtlich der Hydrolyse von Phosphoglykolat. Dabei ist der IC_{50} -Wert von 5,3 μ M deutlich größer als der in Abbildung 9 beschriebene Wert von PDXP von 0,95 μ M. 7,8-DHF ist also ein wirksamer Inhibitor für beide Phosphatasen, allerdings ist die Wirkstärke dieses Flavons bei PDXP größer.

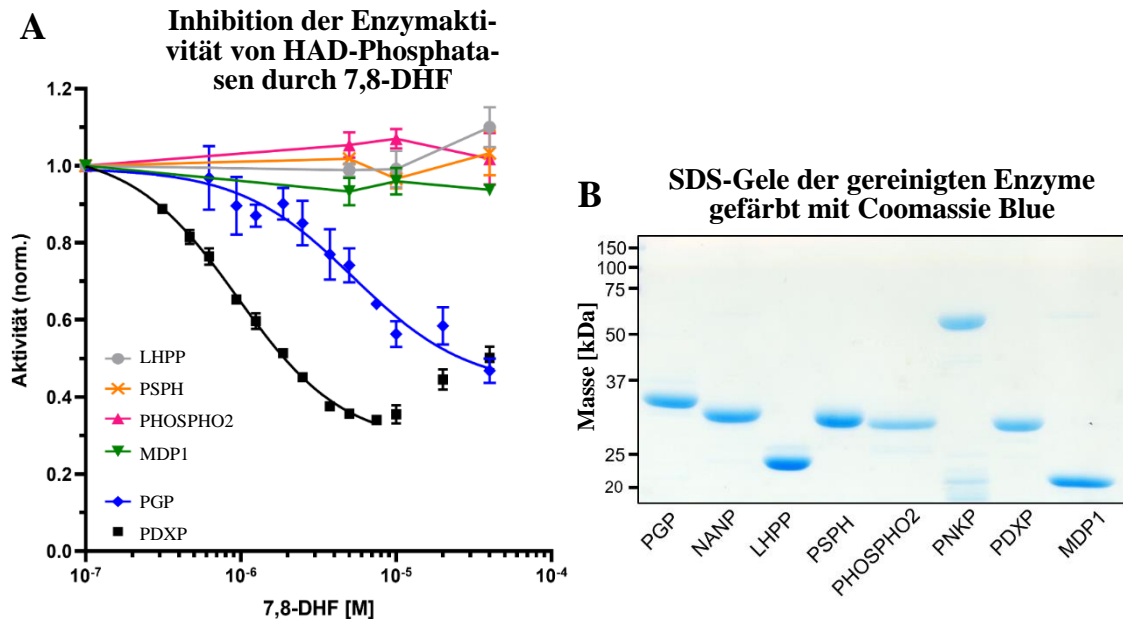


Abbildung 12: Inhibition der Enzymaktivität ausgewählter HAD-Phosphatasen durch 7,8-DHF

(A) Darstellung der Aktivität von Lysin-Histidin-Pyrophosphat Phosphatase (LHPP, Substrat Pyrophosphat), Phosphoserin Phosphatase (PSPH, Substrat O-phospho-L-serin), Phosphatase Orphan 2 (PHOSPHO2, Substrat PLP), Magnesium-abhängige Phosphatase (MDP1, Substrat D-Ribose-5-phosphat) und Phosphoglykolat Phosphatase (PGP, Substrat Phosphoglykolat) in Abhängigkeit der 7,8-DHF-Konzentration im Vergleich zu PDXP (Ergebnisse aus Abbildung 9) mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittelwerts (SEM). Die *in-vitro* Versuche zur Enzymkinetik wurden mit rekombinant hergestelltem und gereinigtem Protein durchgeführt. Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen der gebildeten Phosphomolybdatkomplexe als Ableitung der freien Phosphatkonzentration wurden anhand der Phosphatstandardkurve in die freigesetzte Phosphatmenge umgerechnet und anschließend bezüglich der Enzymaktivität ohne Zugabe des Inhibitors normalisiert. Für PGP beträgt der mittels nichtlinearer Regression berechnete Wert der IC_{50} 5,3 μ M. Die Messdaten wurden in Duplikaten aus insgesamt 3 unabhängigen Experimenten erhoben. (B) SDS-Gel ausgewählter gereinigter Phosphatasen, die von ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe kloniert, exprimiert und aufgereinigt wurden. Phosphoglykolat Phosphatase (PGP, 35 kDa), N-Acylneuraminat-9-Phosphatase (NANP, 28 kDa), Lysin-Histidin-Pyrophosphat Phosphatase (LHPP, 29 kDa), Phosphoserin Phosphatase (PSPH, 26 kDa), Phosphatase Orphan 2 (PHOSPHO2, 28 kDa), Bi-funktionelle Polynukleotid Phosphatase/Kinase (PNKP, 58 kDa), Pyridoxalphosphat Phosphatase (PDXP, 32 kDa), Magnesium-abhängige Phosphatase (MDP1, 20 kDa)

3.2. Ergebnisse der Proteinkristallisation

Um mehr über den Mechanismus der Inhibition und die Koordinierung von 7,8-DHF an PDXP zu erfahren, ist es hilfreich über Informationen zur räumlichen Struktur des Enzyms unter Anwesenheit des Inhibitors zu verfügen. Deshalb wurde eine Co-Kristallisation des Enzyms mit dem Inhibitor durchgeführt, die ein Modell der dreidimensionalen Struktur des Proteins inklusive des gebundenen Inhibitors liefert. In der Struktur DS6 co-kristallisierte muriner PDXP-WT zusammen mit 7,8-DHF im molaren Verhältnis 1:3 bei 20 °C in Anwesenheit von 0,1 M Phosphat-Citrat (pH 4,2) und 40 % Polyethylenglykol (PEG) 300. In der Struktur DS4 co-kristallisierte ebenfalls muriner PDXP-WT mit 7,8-DHF im Verhältnis 1:3 bei 20 °C in Anwesenheit von 0,1 M Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (pH 8,5) und 25 % Polyethylenglykolmonomethylether 550. Die beiden Kristallstrukturen wurden von Herrn Prof. Dr. Schindelin (Rudolf Virchow Zentrum, Würzburg) gelöst. In Abbildung 13 ist ein Kristall von PDXP mit 7,8-DHF abgebildet. DS6 konnte bis zu einer Auflösung von 2,0 Å und DS4 mit einer Auflösung von 2,25 Å verfeinert werden. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse entstammen den Untersuchungen beider Kristallstrukturen (DS6 und DS4). Abbildungen, Abstandsmessungen oder Ähnliches beziehen sich, wenn nicht anders beschrieben, auf die höher aufgelöste Struktur DS6. Detaillierte Informationen zur Datensammlung und Verfeinerungsstatistik von DS6 sind aus Tabelle 9 zu entnehmen. Mit Hilfe der *root mean square deviation* (r.m.s.d) kann die strukturelle Ähnlichkeit zweier Proteinstrukturen abgeschätzt werden. Dazu wird nach optimaler Überlagerung beider Proteine die Quadratwurzel der mittleren quadratischen Abweichungen zwischen äquivalenten Atomen berechnet. Für alle Atome der Proteinstruktur von DS4 und DS6 liegt die r.m.s.d. bei 0,84 Å.

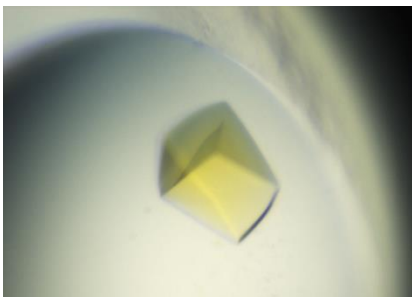


Abbildung 13: Foto eines Kristalls

Abgebildet ist ein Kristall, der bei 4 °C ausgehend von PDXP, 7,8-DHF und Kristallisationspuffer innerhalb weniger Tage mittels Dampfdiffusionsmethode im Sitting drop Verfahren gewachsen ist. Die gelbe Farbe des Kristalls ist ein Hinweis, dass das Flavon tatsächlich im Proteinkristall lokalisiert ist. Dieses Foto wurde mit sichtbarem Licht mithilfe des Rock Imager Systems aufgenommen.

Tabelle 9: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik von DS6

Datensammlung	
Raumgruppe	I23
Elementarzell-Parameter	
a, b, c (Å)	167,01, 167,01, 167,01
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Auflösung (Å)	47,21 – 2,00 (2,05-2,00)
R_{sym}^a	0,191 (4,725)
R_{pim}^b	0,030 (0,772)
$CC_{1/2}$	1,00 (0,439)
$\langle I/\sigma I \rangle^c$	18,9 (1,0)
Vollständigkeit (%)	0,998 (0,973)
Redundanz	41,0 (38,5)
Verfeinerungsstatistik	
Auflösung (Å)	20,00 – 2,00 (2,05-2,00)
R-work ^d	0,1791 (0,300)
R-free ^e	0,2174 (0,322)
r.m.s. Abweichungen bei	
Bindungslängen (Å)	0,013
Bindungswinkel (°)	1,85
Chirale Zentren (Å ³)	0,087
Planare Gruppen (Å)	0,009
Geschätzter Koordinatenfehler (Å)	0,145

^a $R_{\text{sym}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i$, wobei I_i die i -te Messung und $\langle I \rangle$ der gewichtete Durchschnitt aller Messungen von I ist.

^b $R_{\text{pim}} = \sum_{hkl} 1/(N-1)^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, wobei N für die Redundanz der Daten und $\overline{I(hkl)}$ für die durchschnittliche Intensität steht.

^c $\langle I/\sigma I \rangle$ gibt die durchschnittliche Intensität geteilt durch ihre Standardabweichung an.

^d $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} ||F_o| - |F_c|| / \sum_{hkl} |F_o|$, wobei F_o die beobachteten und F_c die berechneten Strukturfaktoramplituden sind.

^e R_{free} und R wurden unter zufälliger Auslassung von 5 % der Daten von der Verfeinerung berechnet. Die Anzahl der Reflektionen beinhaltet die Teilmenge von R_{free} .

Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Datenzelle mit der höchsten Auflösung.

Es ist bekannt, dass PDXP in Lösung ein stabiles Homodimers bildet [15, 29]. Abbildung 14 zeigt die Struktur DS6 in einer Übersicht. PDXP kristallisiert auch in Anwesenheit von 7,8-DHF als Homodimer. Es fällt zusätzlich auf, dass der Ligand 7,8-DHF nur in einem der beiden Protomere gebunden wird: lediglich Protomer A von DS6 (und DS4) bindet 7,8-DHF, in Protomer B wird kein 7,8-DHF koordiniert. Außerdem kann Abbildung 14 entnommen werden, dass 7,8-DHF in naher Umgebung des aktiven Zentrums von PDXP gebunden wird.

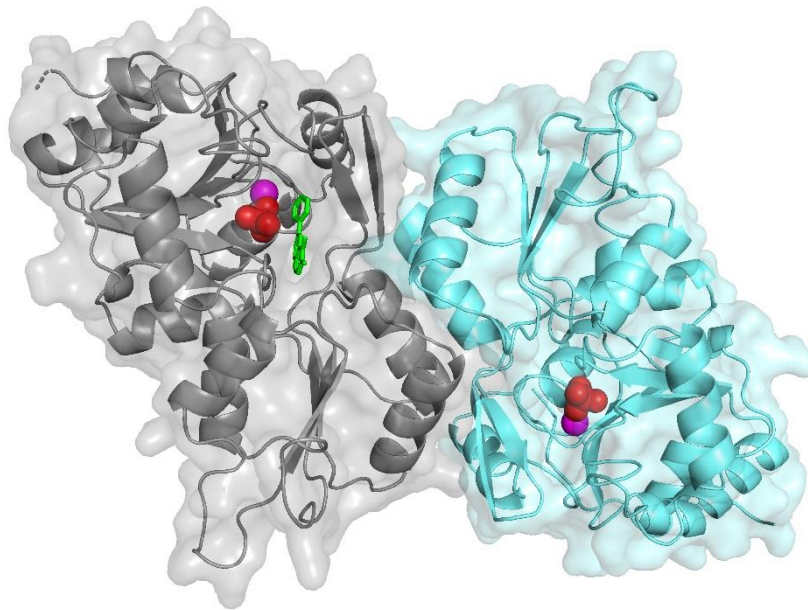


Abbildung 14: Übersicht des PDXP Dimers in DS6

Darstellung beider Protomere von PDXP mit 7,8-DHF (grün) in einer Kombination aus Oberflächendarstellung mit erhöhter Transparenz und Bändermodell in DS6. Protomer A (grau) und Protomer B (hellblau) bilden zusammen einen Homodimer. 7,8-DHF wird nur in Protomer A des PDXP Dimers gebunden. Die Position des aktiven Zentrums von PDXP kann anhand des Cofaktors Magnesium (magenta) und anorganischem Phosphat (rot) abgeschätzt werden.

4BX3 ist der PDB-Code der Kristallstruktur von murinem PDXP-WT, in dem ausschließlich das Enzym ohne einen zugesetzten Liganden kristallisiert wurde. Der Wert der r.m.s.d. berechnet aus allen Atomen der Proteinstruktur liegt für DS6 mit 4BX3 bei 0,84 Å und für DS4 mit 4BX3 bei 0,89 Å und deutet darauf hin, dass die globale Proteinstruktur von PDXP durch die Bindung von 7,8-DHF nicht verändert wird. Dies wird auch in Abbildung 15 veranschaulicht. Weiterhin zeigt die für die PLP-Positionierung bedeutende Substratspezifitätsschleife [15] von PDXP keine veränderte Position durch die Bindung von 7,8-DHF im gleichen Protomer.

Die im Rahmen der Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Daten münden in die Elektronendichtekarte der Moleküle der Elementarzelle. In Abbildung 16 ist die $2F_o - F_c$ Elektronendichtekarte mit 7,8-DHF überlagert und zeigt die Übereinstimmung des Modells mit den experimentell gewonnenen Daten und damit die Qualität der primären Daten.

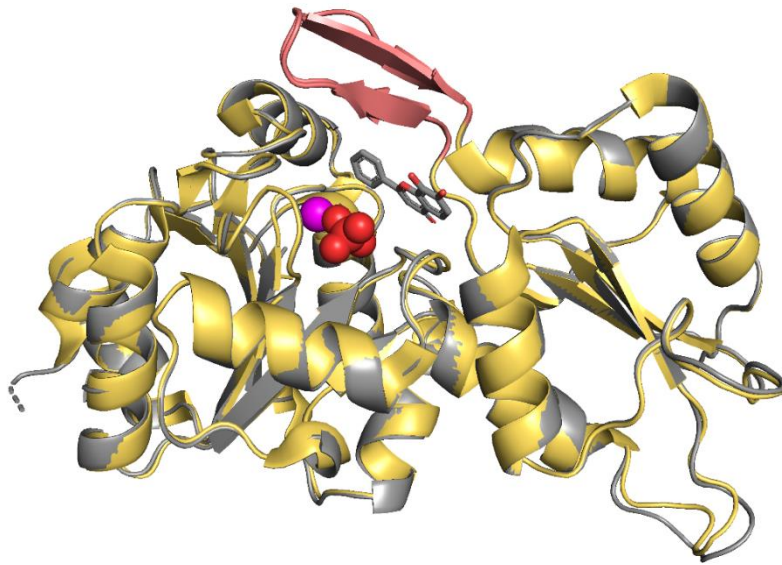


Abbildung 15: Überlagerungsdarstellung von DS6 Protomer A und 4BX3 Protomer A

DS6 Protomer A (grau) und 4BX3 Protomer A (gelb) sind als Bändermodell überlagert dargestellt, Mg^{2+} (magenta) und Orthophosphat (rot) sind als Kugelmodelle veranschaulicht, die Substratspezifitätsschleife beider Proteine ist hellrot markiert. Die Überlagerungsdarstellung verdeutlicht die annähernd identische räumliche Struktur beider Proteine. Der berechnete r.m.s.d.-Wert aller Atome beider Protomere beträgt $0,73 \text{ \AA}$.

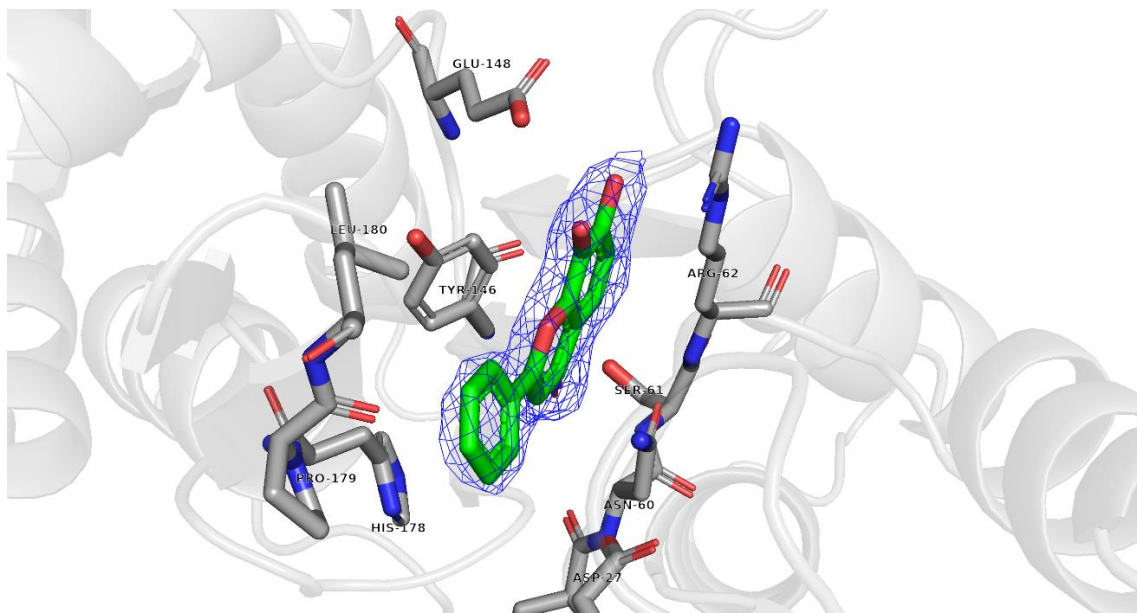


Abbildung 16: Elektronendichtekarte über 7,8-DHF in DS6

Darstellung der $2F_o - F_c$ Elektronendichtekarte um 7,8-DHF (grün) in blau in DS6. Das Konturniveau der Elektronendichtekarte beträgt eine Standardabweichung. DS6 ist als Bändermodell in grau mit erhöhter Transparenz zusammen mit den Seitenketten der 7,8-DHF-koordinierenden Aminosäuren dargestellt.

3.2.1. Analyse des aktiven Zentrums von PDXP

Im ersten Schritt soll das aktive Zentrum von PDXP näher untersucht werden, um die Frage zu klären, ob die Bindung von 7,8-DHF einen Einfluss auf die Strukturen des aktiven Zentrums ausübt und dadurch die Inhibition der Enzymaktivität begründet liegt. Das aktive Zentrum in HAD-Phosphatasen wird durch die Aminosäuren der Motive I-IV gebildet [7]. Die Seitenketten dieser Aminosäuren des 7,8-DHF-gebundenen Protomers überlagern sich ohne Abweichung mit den entsprechenden Aminosäuren in 4BX3 (siehe Abbildung 17). Außerdem sind in DS6 keine Abweichungen in der Positionierung dieser Aminosäuren zwischen dem 7,8-DHF-gebundenen Protomer A und dem 7,8-DHF-freien Protomer B festzustellen.

Alle HAD Phosphoaspartyltransferasen nutzen Mg^{2+} als obligatorischen Cofaktor [7]. Mg^{2+} wird im aktiven Zentrum von PDXP von zahlreichen Aminosäuren eng koordiniert. Nach Überlagerung der Mg^{2+} -koordinierenden Aminosäuren von 4BX3 mit den entsprechenden Aminosäuren von DS6 und DS4 sind in keinem Protomer signifikante Abweichungen in der Positionierung dieser Aminosäuren auszumachen (siehe Abbildung 18). Daraus ist abzuleiten, dass die strukturelle Integrität des aktiven Zentrums von PDXP durch die 7,8-DHF-Bindung nicht beeinträchtigt wird.

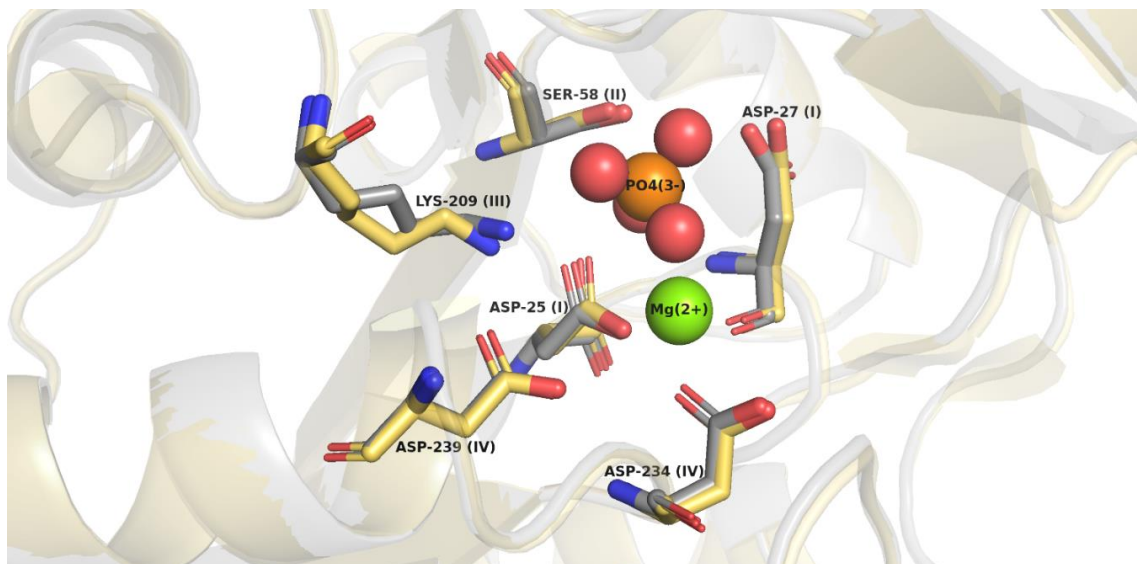


Abbildung 17: Untersuchung der aktiven Zentren in DS6 Protomer A und 4BX3 Protomer A

Die für die Katalyse bedeutenden Aminosäuren sind für DS6 Protomer A (grau) und für 4BX3 Protomer A (gelb) überlagert dargestellt. 7,8-DHF ist hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Die B-Protonere beider Proteine überlagern sich deckungsgleich zu den jeweiligen A-Protomeren und sind hier ebenfalls nicht dargestellt. In Klammern ist die Zugehörigkeit der Aminosäuren zu den HAD Motiven I-IV angegeben. Das Mg^{2+} -Ion (grün) und der anorganische Phosphatrest (rot) sind als Kugelmodell dargestellt und werden ebenfalls im aktiven Zentrum von PDXP positioniert.

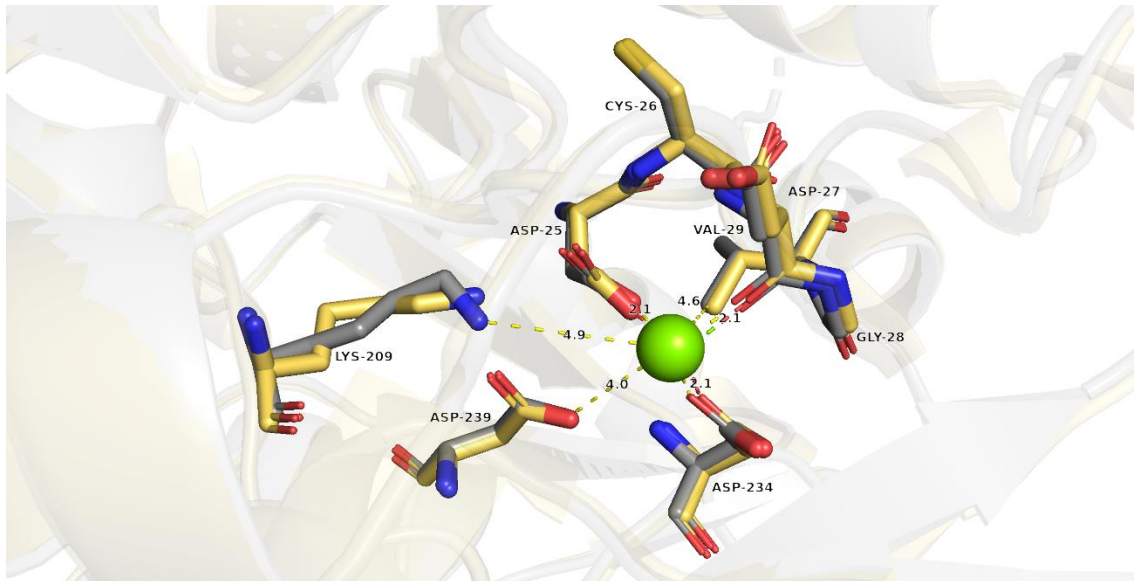


Abbildung 18: Untersuchung der Mg^{2+} -Koordinierung in DS6 Protomer A und 4BX3 Protomer A
 Die Aminosäuren der Mg^{2+} (grün)-koordinierenden Reste sind für DS6 Protomer A (grau) und für 4BX3 Protomer A (gelb) überlagert dargestellt. Die vermessenen Abstände wichtiger funktioneller Gruppen der Aminosäuren zum Mg^{2+} -Ion sind als gelbe, gestrichelte Linien angezeigt und in Ångström angegeben. Die genauen Abmessungen sind in Tabelle S1 (im Anhang) aufgeführt.

In der Kristallstruktur von DS6 wird in beiden Protomeren ein anorganischer Phosphatrest im aktiven Zentrum gebunden, da im Kristallisationspuffer dieser Struktur Phosphat enthalten war. Der Phosphatrest, der ein Bestandteil des jeweiligen Substrates von PDXP ist, wird durch das Enzym über zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen eng koordiniert. Die genauen Abstände von Mg^{2+} und Phosphat zu den jeweiligen koordinierenden Aminosäuren in DS6 und 4BX3 können der Tabelle S1 (im Anhang) entnommen werden. In DS6 lassen sich nach der Überlagerung von Protomer A und B keine Unterschiede in der Positionierung der Phosphat-koordinierenden Aminosäuren erkennen. Auch nach zusätzlicher Überlagerung beider Protomere von DS4 und 4BX3, welche beide kein Phosphat gebunden haben, gibt es keine strukturellen Unterschiede in den untersuchten Aminosäuren.

Zusammenfassend ist hier festzustellen, dass die Mg^{2+} - und Phosphat-koordinierenden Aminosäuren in DS6 und 4BX3 in An- und Abwesenheit von 7,8-DHF strukturell identisch positioniert sind. Die Ergebnisse der kristallographischen Untersuchungen des aktiven Zentrum mit der dort stattfindenden Koordinierung von Mg^{2+} und Phosphat liefern somit keine Anhaltspunkte für einen Eingriff von 7,8-DHF in den Katalysemechanismus von PDXP und können die Ursache der *in-vitro* gemessenen verminderten Aktivität von PDXP in Anwesenheit von 7,8-DHF nicht erklären.

In einem nächsten Schritt wird die Bindungsstelle von 7,8-DHF an PDXP mit der Bindungsstelle von PLP, dem physiologischen Substrat von PDXP verglichen, um die in 3.1.2 beschriebene kompetitive Komponente der 7,8-DHF-vermittelten Inhibition von PDXP strukturell zu untersuchen. 2CFT ist der PDB-Code für die Kristallstruktur von humanem PDXP, das zusammen mit gebundenem PLP im Jahr 2007 co-kristallisiert wurde. Um den Zustand des Enzym-Substrat-Komplexes im Kristall festzuhalten, wurde das Enzym inaktiviert, indem ein Calcium-Ion anstelle eines Magnesium-Ions als Cofaktor verwendet wurde. In der Primärstruktur von humanem und murinem PDXP besteht eine 91,2%ige Sequenzidentität [28]. In Tabelle S2 (im Anhang) sind die PLP-koordinierenden Aminosäuren aus 2CFT aufgelistet. Nach Überlagerung des Protomers A und B von DS6 mit dem Protomer von 2CFT ist in Abbildung 19 zu erkennen, dass die beiden anorganischen Phosphatreste von DS6, die Bestandteil des Kristallisationspuffers waren, an dem gleichen Ort zu liegen kommen wie der Phosphatrest von PLP in 2CFT. Die obigen Ergebnisse der Untersuchung zur Koordinierung des anorganischen Phosphats in DS6 können also auf die Situation mit gebundenem Substrat übertragen werden. Bei der Überlagerung von DS6 mit 2CFT wird außerdem deutlich, dass 7,8-DHF in enger räumlicher Nähe zu dem Bindungsort von PLP bindet und sich deren Bindungsorte teilweise überschneiden (vergleiche Abbildung 19). PLP wird sichtbar tiefer im aktiven Zentrum gebunden, während das größere 7,8-DHF mehr dessen Eingang verdeckt und mit seinem Pyridinring in das aktive Zentrum hineinragt. Trotzdem ist eine gleichzeitige Bindung von PLP und 7,8-DHF im gleichen Protomer anhand dieser Ergebnisse auszuschließen. Das erklärt den kompetitiven Charakter der Inhibition von PDXP durch 7,8-DHF, der in den *in-vitro* Versuchen zur Enzymaktivität festgestellt werden konnte.

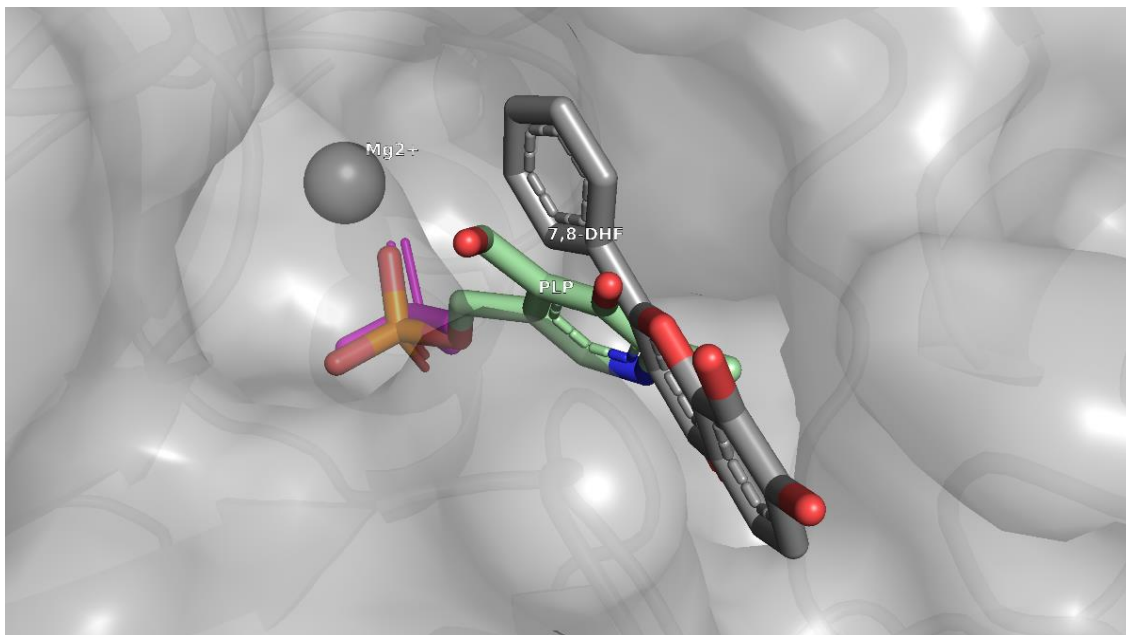


Abbildung 19: Überlagerung der Bindungsstelle von PLP aus 2CFT mit der von 7,8-DHF aus DS6 im aktiven Zentrum von PDXP

Blick auf das aktive Zentrum von Protomer A in DS6 mit dem dort gebundenen 7,8-DHF (grau). DS6 ist in grau als Bändermodell und als Oberflächendarstellung mit erhöhter Transparenz dargestellt. Dem ist das PLP (grün) von 2CFT überlagert. Es wird deutlich, dass sich die Bindungsstellen von PLP und 7,8-DHF im aktiven Zentrum von PDXP überlagern. Außerdem überlagert sich das freie anorganische Phosphat (magenta) aus DS6, das Bestandteil des Kristallisationspuffers war, nahezu deckungsgleich mit dem Phosphatrest von PLP aus 2CFT.

3.2.2. Analyse der Koordinierung von 7,8-DHF

Der Ligand 7,8-DHF bindet in den Kristallstrukturen DS6 und DS4 an nur einem Protomer des Homodimers PDXP. In beiden Kristallstrukturen, die unter verschiedenen Pufferbedingungen und pH-Werten gewonnen wurden, wird 7,8-DHF identisch koordiniert. Diese kongruente Koordinierung wird in Tabelle 10 ersichtlich, aus der die Abstände von 7,8-DHF zu den relevanten Aminosäuren in DS6 und DS4 entnommen werden können. Graphisch zeigt Abbildung 20 die Koordinierung von 7,8-DHF in DS6. Dabei wird deutlich, dass der Ligand von zahlreichen Aminosäuren von mehreren Seiten eng gebunden wird, allerdings bilden sich keine kovalenten Bindungen zwischen Enzym und Ligand. Da sich die Bindungsstellen von 7,8-DHF und PLP an PDXP überlagern, werden beide Moleküle teilweise von den gleichen Aminosäuren koordiniert: die Aminosäuren Asn60, Arg62 und His178 leisten bedeutende Beiträge für die Bindung von 7,8-DHF *und* PLP.

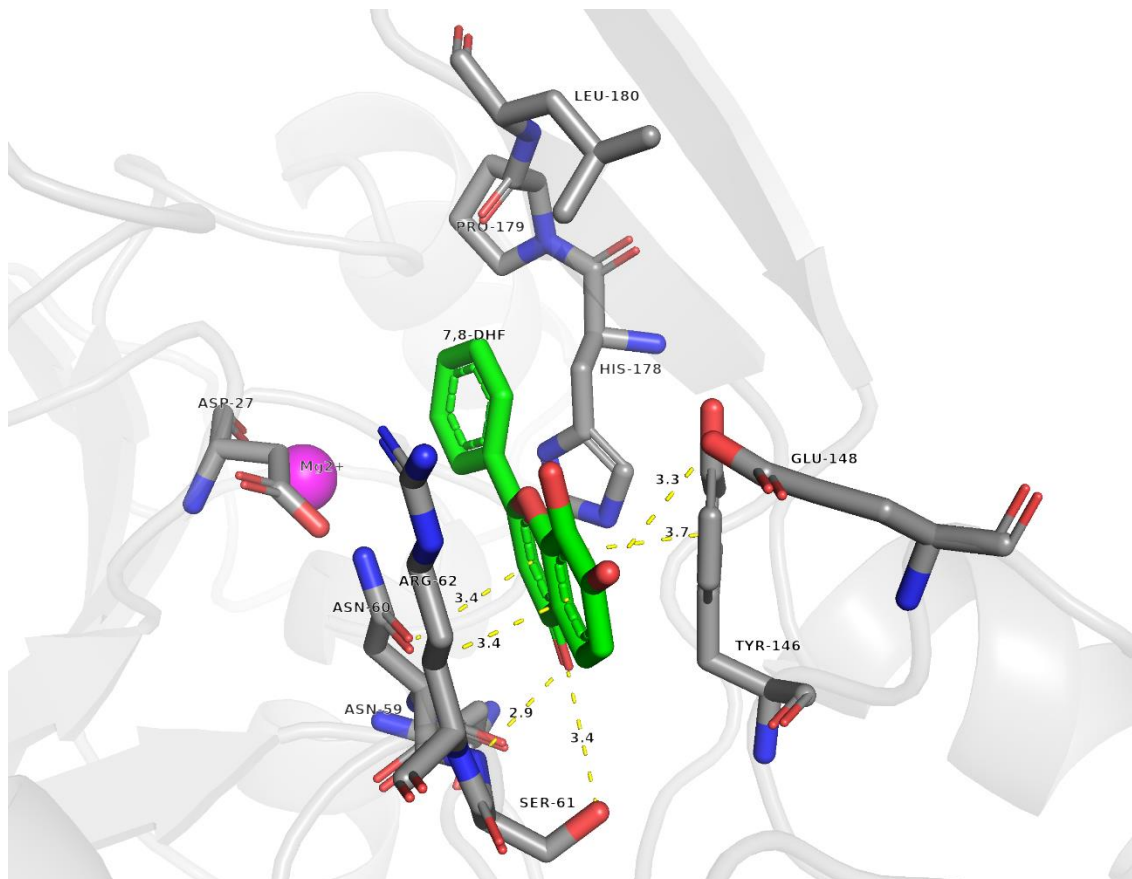


Abbildung 20: Koordinierung von 7,8-DHF in DS6

Darstellung der Aminosäuren (grau) im Abstand von 4 Å zu 7,8-DHF (grün) in Protomer A von DS6. Das Mg^{2+} -Ion (magenta) ist als Kugelmodell dargestellt. Der Ligand 7,8-DHF wird von zahlreichen Aminosäuren von mehreren Seiten eng koordiniert. Die vermessenen Abstände wichtiger funktioneller Gruppen der Aminosäuren zu 7,8-DHF sind als gelbe, gestrichelte Linien angezeigt und in Ångström angegeben. Die vollständigen Messungen zur Koordinierung von 7,8-DHF in DS6 und DS4 sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Als nächstes wurden die 7,8-DHF-koordinierenden Aminosäuren von DS6 Protomer A mit denen von Protomer B verglichen, um mögliche Hinweise für die fehlende 7,8-DHF-Bindung am Apoprotomer zu erhalten. DS6 Protomer A, welches 7,8-DHF bindet, zeigt im Vergleich zu Protomer B in drei Fällen eine unterschiedliche räumliche Anordnung in der Positionierung der Aminosäuren: dabei handelt es sich um die Aminosäuren Ser61, Arg62 und Glu148 (siehe Abbildung 21). Die Seitenkette von Arg62 macht dabei die deutlichste Veränderung: Durch 7,8-DHF-Bindung wird die Aminogruppe des Guanidinrests um 5,4 Å nach außen verlagert, der Winkel vom $C\alpha$ -Atom zu $C\gamma$ -Atom ist dabei im Protomer A verglichen zum Protomer B um $76,5^\circ$ verändert. Im 7,8-DHF gebundenen Protomer A von DS6 nimmt die Seitenkette von Arg62 eine Konformation ein, die weiter vom aktiven Zentrum des Enzyms entfernt ist. Außerdem ist der Hydroxylrest der Carboxylgruppe von Glu148 im Protomer A um 1,8 Å oder $29,7^\circ$ gemessen zu $C\beta$ -

Atom in Richtung des Liganden verlagert. Die Hydroxylgruppe von Serin 61 von Protomer A weicht verglichen mit der von Protomer B um 1,4 Å ab. Es ist anzunehmen, dass die 7,8-DHF Bindung diese Abweichungen induziert hat.

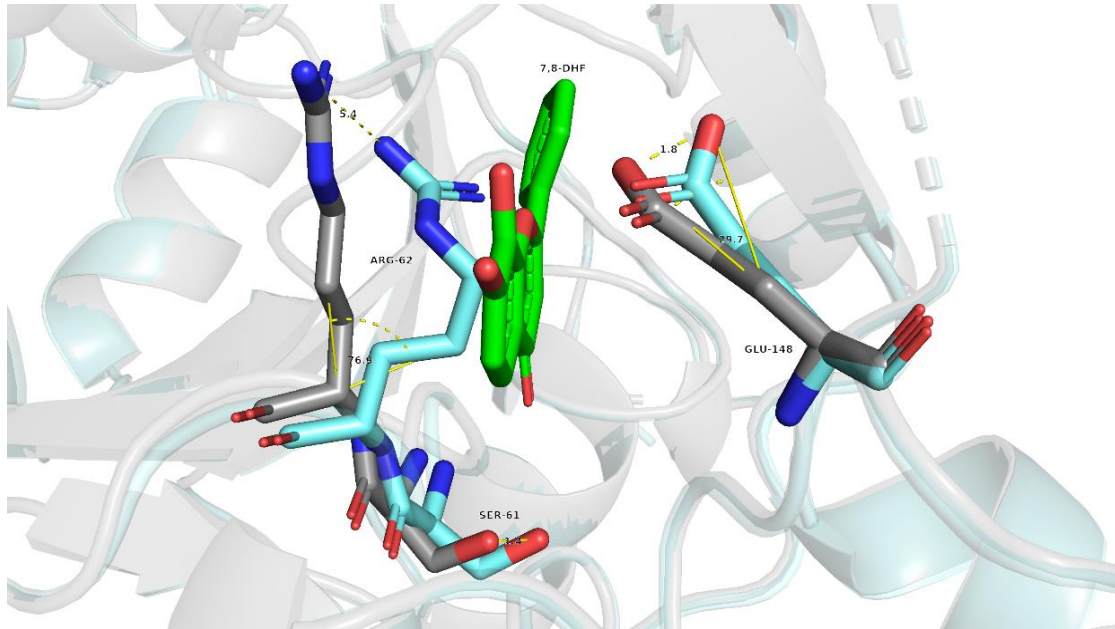


Abbildung 21: Überlagerung von Ser61, Arg62, Glu148 von Protomer A und Protomer B aus DS6
Darstellung der Seitenketten der Aminosäuren von Ser61, Arg62 und Glu148 im 7,8-DHF-gebundenen Protomer A (grau) und 7,8-DHF-freien (Apo-) Protomer B (hellblau) von DS6. 7,8-DHF ist in grün dargestellt. Messung der Abstände in Ångström und Winkel im Gradmaß. Erkennbar ist die deutliche, von 7,8-DHF induzierte veränderte Positionierung der Seitenkette von Arg62.

Um noch mögliche weitere Informationen über die Auswirkungen der 7,8-DHF-Bindung zu erhalten, erfolgte außerdem der Vergleich der 7,8-DHF koordinierenden Aminosäuren von DS6 mit den entsprechenden Aminosäuren von 4BX3. Unter allen Aminosäuren die 7,8-DHF koordinieren, überlagern sich die Seitenketten des DS6 Protomers B deckungsgleich mit beiden Protomeren von 4BX3. Das Arg62 von Protomer B von DS6 ist ähnlich positioniert wie in Protomer B von 4BX3. Allerdings ist auffällig, dass die Seitenketten von Arg62 in Protomer A und B in 4BX3 nicht identisch positioniert sind, sondern ab dem C γ -Atom divergieren. Die Aminogruppen der Guanidingruppe von Protomer A und B in 4BX3 haben dadurch einen Abstand von 5,4 Ångström. Nominell ist dieser Abstand genauso groß wie der der entsprechenden Reste in DS6, allerdings beginnt die Divergenz der Ausrichtung der Arginin-Seitenketten in 4BX3 im C γ -Atom der Aminosäure, während sie in DS6 bereits in C β -Atom beginnt. Abbildung 22 zeigt die Positionierung der Seitenkette von Arg62 von beiden Protomeren von 4BX3 und DS6. Es kann

abgeleitet werden, dass Arg62 über eine flexible Seitenkette verfügt, die mehrere verschiedene Konformationen annehmen kann und dass die Bindung von 7,8-DHF eine Rotation der Seitenkette von Arg62 induziert, wodurch dieses weiter aus dem aktiven Zentrum herausgedrückt wird. Diese Rotation beginnt wie oben beschrieben im 7,8-DHF-bindenden Protomer A von DS6 bereits im C β -Atom von Arg62, während die Konformationsabweichungen dieser Aminosäure in 4BX3 wie auch im 7,8-DHF-freien Protomer von DS6 erst ab dem C γ -Atom beginnt. Durch das Wegklappen der Seitenkette von Arg62 befindet sich an der Oberfläche des Enzyms nun eine positive Ladung, da die Guanidin-Gruppe von Arginin aufgrund des hohen pKa-Wertes unter physiologischen Bedingungen stets positiv geladen ist. Die gemessenen Abweichungen von Ser61, Arg62 und Glu148 zwischen Protomer A und Protomer B in DS6 liefern keine Hinweise für die fehlende Bindung des Liganden an Protomer B.

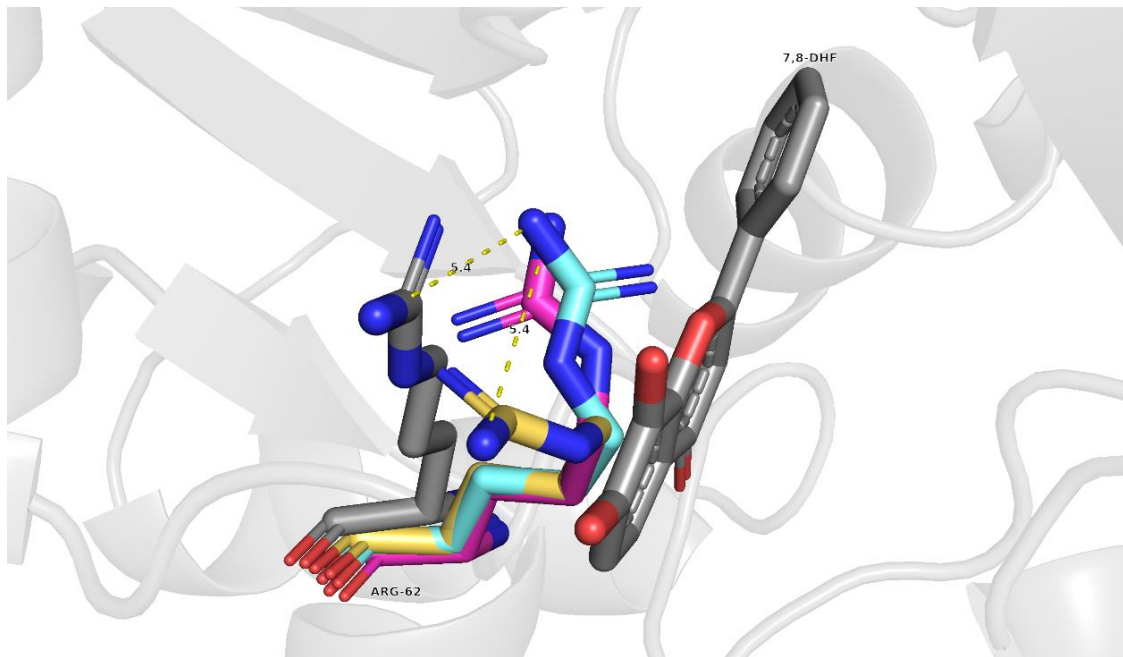


Abbildung 22: Arg62 in DS6 und 4BX3

Überlagerte Darstellung der Seitenkette von Arg62 aus DS6 Protomer A (grau), DS6 Protomer B (cyan), 4BX3 Protomer A (gelb) und 4BX3 Protomer B (magenta). Messung der Abstände zwischen den Aminogruppen der Guanidinreste in Ångström. Für die Seitenkette von Arg62 existieren mehrere Konformationen. Die Bindung von 7,8-DHF verändert dieses Gleichgewicht zugunsten eines Konformers mit erhöhtem Abstand zum aktiven Zentrum, in dem 7,8-DHF gebunden ist.

Tabelle 10: Koordinierung von 7,8-DHF in DS6 und DS4

Abstand	Asp27	Asn59	Asn60	Ser61	Arg62	Tyr146	Glu148	His178	Pro179
Keto- gruppe von 7,8-DHF		4,0 (4,0) Å zum Sauer- stoff der Peptidkette	3,7 (3,6) Å zum Sauerstoff der Carbamoylgruppe	2,9 (3,1) Å zum Stickstoff der Peptid- kette (WBB); 3,4 (3,4) Å zur OH- Gruppe	4,0 (4,3) Å zum Stickstoff der Peptidkette	4,4 (4,6) Å zum Phenylring; 4,8 (5,0) Å zum Stickstoff der Peptidkette		5,4 (5,2) Å zum Stick- stoff des Imidazol- rings	
7-Hydro- xylgruppe von 7,8- DHF					3,7 (3,2) Å zu sek. Amin der Guani- dingruppe	5,5 (5,2) Å zum Phenylring; 5,9 (5,6) Å zur OH-Gruppe	3,3 (4,3) Å zur OH- Gruppe (WBB)		
8-Hydro- xylgruppe von 7,8- DHF			5,7 (5,9) Å zum Sauerstoff der Carbamoylgruppe		3,9 (3,3) Å zum sek. Amin der Gu- anidingruppe	4,6 (4,6) Å zur OH-Gruppe; 5,0 (4,9) Å zum Phenylring	3,6 (4,3) Å zur OH- Gruppe		
Phenylring von 7,8- DHF	4,6 (4,9) Å zur OH- Gruppe		4,3 (4,7) Å zum Stickstoff der Carbamoylgruppe					4,4 (4,7) Å zum Imida- zolring; 5,8 (5,9) Å zum Sauer- stoff der Peptidkette	4,5 (4,7) Å zum Stick- stoff der Peptidkette; 5,9 (6,1) Å zum Azol- ring
Dihydroxy- benzylring von 7,8- DHF			4,3 (4,2) Å zum Sauerstoff der Carbamoylgruppe; 5,1 (5,0) Å zum C γ	5,4 (5,4) Å zum Sau- erstoff der Peptid- kette; 5,2 (5,7) Å zur OH- Gruppe	3,4 (3,2) Å zu C β ; 4,1 (4,2) Å zum Stickstoff der Peptidkette; 4,9 (4,5) Å zu sek. Amin der Guani- dingruppe	3,9 (3,9) Å zum Phenylring; 5,1 (5,1) Å zur OH-Gruppe	4,9 (5,8) Å zur OH- Gruppe		
Pyronring von 7,8- DHF			3,4 (3,8) Å zum Sauerstoff der Carbamoylgruppe; 3,7(4,0) Å zum C γ ; 3,9 (3,9) Å zum Stickstoff der Carbamoylgruppe	4,8 (5,1) Å zum Stickstoff der Peptid- kette	4,4 (4,6) Å zu C β ; 4,7 (5,1) Å zum Stickstoff der Peptidkette	3,7 (3,8) Å zum Phenylring; 4,9 (5,0) Å zur OH-Gruppe		5,8 (5,7) Å zum Imida- zolring	

(Gelistet sind die Abstände in Ångström (Å) von funktionellen Gruppen der angegebenen Aminosäuren in DS6 zu den jeweiligen Resten in 7,8-DHF. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Messungen in DS4. WBB: Wasserstoffbrückenbindungen)

3.2.3. Validierung der Kristallisationsergebnisse mittels PDXP-Mutanten

Proteine im kristallinen Zustand sind nicht starr und unbeweglich, sondern können trotz ihrer gepackten Anordnung im Kristall ihre Konformation verändern und behalten auch die Fähigkeit ihre Funktion auszuüben [126]. Aus diesem Grund kann bei Co-Kristallisationen nicht sicher angenommen werden, dass der Ligand im Kristall zum Zeitpunkt der Datenerfassung auch tatsächlich in seiner eigentlichen Bindungsstelle lokalisiert war. Deshalb wurden die in der Proteinkristallisation gewonnenen Informationen über die Bindungsstelle von 7,8-DHF in einem nächsten Schritt validiert. Dazu wurden die Aminosäuren gezielt verändert, die laut Kristallstruktur einen wichtigen Beitrag zur Koordinierung von 7,8-DHF leisten. Durch diese Mutationen, so die Annahme, soll die Bindung des Inhibitors an das Enzym erschwert werden, was in den Aktivitätsuntersuchungen zum Verlust oder der Reduktion des inhibitorischen Effektes führen sollte. Falls diese Annahme zutrifft, wäre die in der Kristallstruktur sichtbare Bindungsstelle von 7,8-DHF an PDXP funktionell bestätigt.

Die fünf Aminosäuren, die für diesen Zweck verändert wurden, waren: Asn60, Arg62, Glu148, Tyr146 und His178. Diese Aminosäuren wurden zu Alanin mutiert. Außerdem wurde Asn60 zusätzlich zu Serin mutiert, da Asn60 auch bei der Koordinierung von PLP involviert ist (siehe Tabelle S2) und eine basale Enzymaktivität der Mutanten für die späteren Aktivitätsassays unter Anwesenheit des Inhibitor notwendig ist. Die Mutanten wurden wie in 2.2.2 - 2.2.5 beschrieben generiert, exprimiert und aufgereinigt. Dabei wurde der Hexahistidin-*tag* nicht entfernt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde in diesen Experimenten auch eine His-getaggte Version des PDXP-WT verwendet. Zunächst wurde die Aktivität der PDXP-Mutanten ohne Zugabe des Inhibitors gemessen. Die Reaktionsbedingungen für diese Versuche sind in Tabelle 11 dargestellt. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass alle PDXP-Mutanten eine Aktivität hinsichtlich der Hydrolyse von PLP zeigen. N60S zeigt dabei eine deutlich höhere Aktivität als N60A, woraus man schließen kann, dass die Gegenwart einer polaren Seitengruppe wie der Amidgruppe von Asparagin oder der Hydroxygruppe von Serin wichtig für die Koordinierung von PLP ist. Außerdem ist bekannt, dass der Imidazolring von His178 den Pyridinring von PLP über hydrophobe Wechselwirkungen koordiniert [15]. Das erklärt die reduzierte Aktivität von H178A im Vergleich zum PDXP-WT. Dennoch ist die Aktivität aller generierten PDXP-Mutanten ausreichend hoch, um den inhibitorischen Effekt von 7,8-DHF auf die

Enzymaktivität untersuchen zu können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 graphisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die PDXP-Mutante Y146A unter Anwesenheit von 7,8-DHF keine verminderte Aktivität zeigt und bei hohen Flavon-Konzentrationen sogar eine Zunahme der Enzymaktivität verzeichnet. Auch die Mutanten E148A, R62A und H178A zeigen eine signifikant verminderte Inhibition der Enzymaktivität durch 7,8-DHF verglichen mit dem PDXP-WT. Für die PDXP-Mutante N60A ist der inhibitorische Effekt vergleichbar mit dem des Wildtyps von PDXP. Das spiegelt sich auch in dem berechneten Wert der IC_{50} wieder, der für beide Proteine $2,0 \mu\text{M}$ beträgt. Die Mutation von Asn60 zu Alanin hat also keinen Einfluss auf die Bindung von 7,8-DHF an PDXP. Wenn Asn60 allerdings zu Serin mutiert wird, kann der inhibitorische Effekt von 7,8-DHF auf die Enzymaktivität verglichen mit dem PDXP-WT deutlich gesteigert werden. Das zeigt auch der geringere Wert der IC_{50} der Mutante N60S ($0,9 \mu\text{M}$) im Vergleich zum PDXP-WT ($2,0 \mu\text{M}$). Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die Mutationen aller ausgewählten Aminosäuren eine Modulation der Enzymaktivität unter Anwesenheit von 7,8-DHF verglichen mit dem PDXP-WT hervorrufen. Diese experimentellen Ergebnisse bestätigen somit die in der Kristallstruktur identifizierte Bindungsstelle von 7,8-DHF an PDXP.

A Aktivität der PDXP-Mutanten

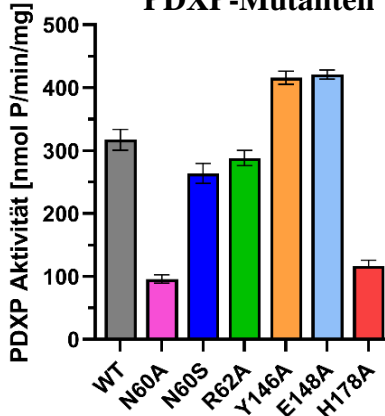
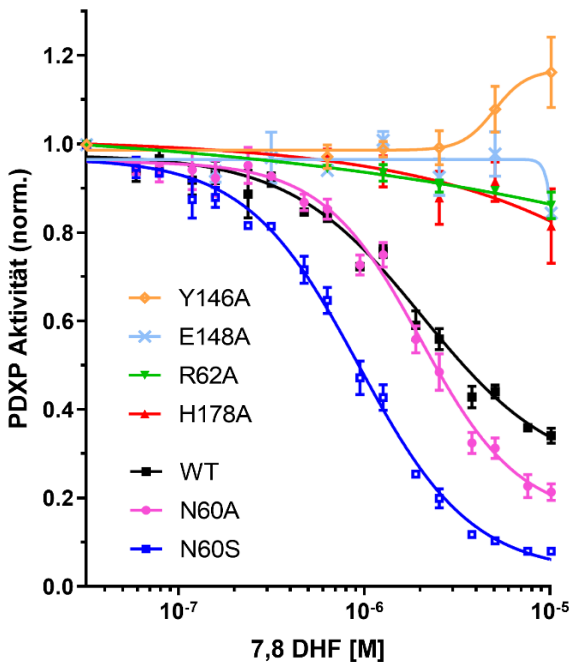


Tabelle 11: Reaktionsbedingungen der Aktivitätsassays der PDXP-Mutanten

PDXP	Enzymkonzentration [ng; nM]	Substrat	Reaktionszeit [min]	Puffer
WT	200; 127	50 μ M PLP	4	30 mM TAE, pH 7.5; 30 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 0,01% (v/v) Triton X-100
N60A	600; 381			
N60S	200; 127			
R62A	200; 127			
Y146A	150; 95			
E148A	200; 127			
H178A	500; 318			

B Inhibition der Aktivität der PDXP-Mutanten durch 7,8-DHF



C SDS-Gele der gereinigten Enzyme gefärbt mit Coomassie Blue

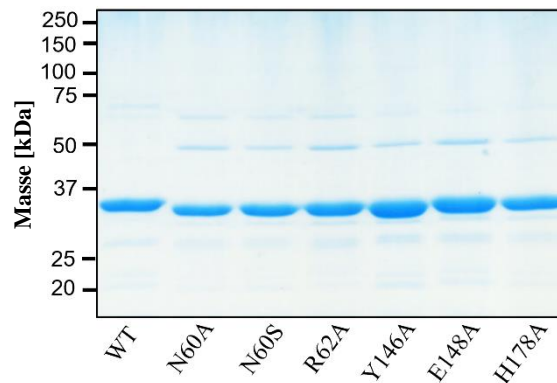


Abbildung 23: Enzymaktivität der PDXP-Mutanten im Vergleich zu PDXP-WT und deren Inhibition durch 7,8-DHF

(A) Darstellung der Enzymaktivität (in nmol freigesetztes Phosphat \times min⁻¹ \times mg⁻¹) der PDXP-Mutanten im Vergleich zum PDXP-WT als Balken mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittelwertes (SEM). Die Mutationen wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese in die PDXP-WT-Sequenz (murin) eingebracht und mittels DNA-Sequenzierung validiert. Das rekombinant hergestellte und säulenchromatographisch gereinigte Protein wurde zusammen mit PLP als Substrat für die *in-vitro* Versuche zur Enzymkinetik verwendet. Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen der gebildeten Phosphomolybdatokomplexe als Ableitung der freien Phosphatkonzentration wurden anhand der Phosphatstandardkurve in die freigesetzte Phosphatmenge umgerechnet und daraus die Enzymaktivität berechnet. (B) Darstellung der Enzymaktivität in Abhängigkeit der Konzentration von 7,8-DHF für PDXP-Mutanten im Vergleich zu PDXP-WT. Die Ergebnisse sind bezüglich der Enzymaktivität ohne Zugabe des Inhibitors normalisiert und mit dem Stichprobenfehler (SEM) abgebildet. Der mittels nichtlinearer Regression berechnete Wert der IC₅₀ liegt für PDXP-WT bei 2,0 μ M, für die PDXP-Mutanten N60A ebenfalls bei 2,0 μ M und für N60S bei 0,9 μ M. (C) 12%iges SDS-Gel der gereinigten, His-getaggten PDXP-Mutanten und dem His-getaggten PDXP-WT. Monomeres PDXP hat eine Masse von 31 kDa.

Die Messdaten wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten erhoben.

Beachte: die hier verwendeten Proteine verfügen an ihrem N-terminalen Ende über einen Hexahistidin-*tag*.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung von 7,8-DHF auf die Enzymaktivität von PDXP biochemisch und strukturell zu charakterisieren. Die Ergebnisse belegen, dass 7,8-DHF am aktiven Zentrum von PDXP bindet und infolgedessen die Enzymaktivität signifikant inhibiert wird.

4.1. Inhibition der PDXP-Aktivität durch 7,8-DHF *in-vitro*

Die *in-vitro* Aktivitätsuntersuchungen wurden mit rekombinant hergestelltem und gereinigtem PDXP durchgeführt. Die kinetischen Parameter v_{\max} und K_m der verwendeten Phosphatasen entsprachen dabei den in der Literatur publizierten Werten [15, 119]. Die Untersuchungen der Enzymkinetik von PDXP in Anwesenheit von 7,8-DHF kamen zu dem Ergebnis, dass 7,8-DHF in der Lage ist, die PDXP-Aktivität hinsichtlich der Hydrolyse von PLP zu inhibieren. Die IC_{50} als Maß der Wirkstärke der Inhibition liegt bei circa $1 \mu\text{M}$. Verglichen mit der IC_{50} des von Knobloch et al. synthetisiertem hydrolyse-resistentem PLP-Analogons von $79 \mu\text{M}$ [131], ist 7,8-DHF ein relativ potenter PDXP-Inhibitor. Parallel wurden von Herrn Sebastian Bothe (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sotriffer, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, JMU Würzburg) Bindungsstudien mittels Bio-Layer-Interferometrie durchgeführt, wobei die Dissoziationskonstante K_D des Enzym-Inhibitor-Komplexes bestimmt wurde. Sie gilt als Maß der Bindungsaffinität von 7,8-DHF zu PDXP und liegt ebenfalls im niedrigen mikromolaren Bereich.

Es ist allerdings auffallend, dass die Enzymaktivität unabhängig von der Inhibitorkonzentration nie vollständig inhibiert werden konnte. Die maximale Inhibition der Enzymaktivität des PDXP-WT liegt bei circa 65 % und wurde bei einer 7,8-DHF-Konzentration von circa $7,5 \mu\text{M}$ erreicht (siehe Abbildung 9). Außerdem nimmt der gemessene inhibitorische Effekt bei Inhibitorkonzentrationen über $10 \mu\text{M}$ wieder ab. Woran kann dieses untypische Verhalten liegen? Die Ergebnisse der direkten biochemischen Messung der Phosphatkonzentration suggerieren, dass ab einem gewissen Schwellenwert der 7,8-DHF-Konzentration bei weiter steigenden Flavon-Konzentrationen die freie Phosphatkonzentration im Versuchsansatz zunimmt, das heißt es muss wieder eine vermehrte Enzymaktivität stattgefunden haben. Die gemessenen Ergebnisse berücksichtigen dabei die deutliche gelbe Farbe der Reaktionsansätze bei hohen Flavon-Konzentrationen, indem

die OD-Werte des Hintergrunds (Substrat, Inhibitor, Biomol Green) in separaten Reaktionsansätzen gemessen und von den OD-Werten der eigentlichen Versuchsansätze (PDXP, Substrat, Inhibitor, Biomol Green) abgezogen wurden. Dabei verändern sich die gemessenen OD-Werte des Hintergrunds für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen nur unwesentlich, was daraufhin deutet, dass die Kombination von Substrat, Inhibitor und Biomol Green keine Präzipitate verursachen, die in der anschließenden Absorptionsmessung ebenfalls erfasst werden könnten. Es ist bekannt, dass 7,8-DHF in wässrigen Lösungen schwer löslich ist [127]. Möglicherweise verursachen Präzipitationen oder Aggregationen von 7,8-DHF bei hohen Konzentrationen eine Reduktion der wirksamen 7,8-DHF-Konzentration im Versuchsansatz und erklären den beobachteten Effekt. Dagegen spricht allerdings, dass die Phosphoglykolat-Phosphatase, die von 7,8-DHF nur teilweise inhibiert wird, bei hohen Flavon-Konzentrationen den apparenten Anstieg der Enzymaktivität im Gegensatz zu PDXP nicht zeigt (vergleiche Abbildung 12). Falls 7,8-DHF unter den getesteten Bedingungen Präzipitate bildet, die dazu führen, dass die inhibitorisch wirksame Konzentration im Reaktionsansatz sinkt, sollte davon die Enzymaktivität von PDXP und PGP in gleichem Maße betroffen sein. Es ist nicht auszuschließen, dass lediglich die Kombination aus PDXP und hohen 7,8-DHF-Konzentrationen Präzipitate verursacht, deren Absorptionen miterfasst werden und so den Effekt artifiziell verursachen. Außerdem muss beachtet werden, dass die PDXP-Mutante N60S im Vergleich zum PDXP-WT eine deutlich niedrigere IC_{50} und gleichzeitig eine höhere maximale Inhibition von circa 90 % zeigt, während der Wildtyp zu maximal ca. 65 % inhibiert wird (siehe Abbildung 23). Die niedrigere IC_{50} nach Mutation der Aminosäure N60 zu Serin liegt möglicherweise in einer engeren Koordinierung des Inhibitors an das Enzym begründet, die zu einer höheren Affinität des Inhibitors und zu einer größeren inhibitorischen Wirkstärke führt. Auch bei dieser Mutante war es nicht möglich eine 100%ige Inhibition der Enzymaktivität zu erreichen, was erneut auf den bisher noch nicht geklärten Effekt von 7,8-DHF hinweist. Als letztes muss noch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass sehr hohe 7,8-DHF-Konzentrationen PDXP auf eine unbekannt Weise aktivieren. Dafür lassen sich allerdings anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse keine Hinweise finden und auch in der Literatur ist keine Aktivierung von HAD-Phosphatasen beschrieben. Der genaue Grund für den beobachteten Effekt bleibt mit derzeitigem Wissensstand unbekannt.

4.2. Einfluss der Koordinierung von 7,8-DHF auf die inhibitorische Wirkstärke

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro* Untersuchungen der Enzymkinetik von PDXP in Anwesenheit von 7,8-DHF bestätigten den ersten Hinweis des Hochdurchsatz-Screening-Verfahrens, dass 7,8-DHF in der Lage ist die PDXP-Aktivität hinsichtlich der Hydrolyse von PLP zu inhibieren. Zusätzlich wurden strukturanaloge Flavone unter identischen Versuchsbedingungen auf ihre inhibitorische Wirksamkeit getestet, dabei konnte aber kein effektiverer Inhibitor als 7,8-DHF gefunden werden. Konkret getestet wurden: 3,5-Dihydroxyflavon, 3,7-Dihydroxyflavon, 5,7-Dihydroxyflavon, 3,5,7-Trihydroxyflavon, 5,6,7-Trihydroxyflavon und 3,7,8-Trihydroxyflavon-4'-hydroxyphenyl. Folglich ist die genaue Positionierung der Hydroxygruppen am Flavon-Grundgerüst entscheidend für die Bindung des Inhibitors an das Enzym und damit für den inhibitorischen Effekt. Damit ein Inhibitor seine Wirkung entfalten kann, muss er erstens seinen Bindungsort am Enzym erreichen und zweitens diesen mit ausreichender Affinität binden können. Dabei ist ein gewisses Maß an Bindungsenergie notwendig, um die Gleichgewichtsreaktion von Assoziation von Enzym und Inhibitor und Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes zugunsten des Enzym-Inhibitor-Komplexes zu verschieben. Sämtliche funktionelle Gruppen des Inhibitors, die Wechselwirkungen mit den Strukturelementen des Enzyms eingehen können, tragen zu seiner Bindungsenergie bei. Ein fehlender Zugang der Strukturanaloga von 7,8-DHF zum aktiven Zentrum erscheint nach Analyse der Kristallstruktur von DS6 unwahrscheinlich, da 7,8-DHF am Eingang des aktiven Zentrums bindet und die veränderten Positionen der Hydroxygruppen der Strukturanaloga die Größe, Struktur oder Ladung nicht maßgeblich verändern. Außerdem induziert 7,8-DHF die Konformationsänderung der Seitenkette von Arg62, ohne die der Inhibitor nicht an seine Bindungsstelle treten könnte. Der ausschlaggebende Grund für das Fehlen der Inhibition der Strukturanaloga liegt wahrscheinlicher in der unzureichenden Koordinierung dieser Verbindungen an das aktive Zentrum von PDXP. Aus den Ergebnissen der Experimente der PDXP-Aktivität unter Anwesenheit von 7,8-DHF und dessen Strukturanaloga kann abgeleitet werden, dass der Hydroxygruppe in Position 8 des Flavon-Grundgerüsts eine bedeutende Rolle für die wirksame Koordinierung des Inhibitors zukommt. Die Hydroxygruppen an den Positionen 3, 5, 6 und 7 scheinen nicht wesentlich zum inhibitorischen Effekt beitragen.

Bei genauerer Betrachtung der Koordinierung von 7,8-DHF in der Kristallstruktur DS6 ist zu erkennen, dass die Hydroxygruppen in Position 7 und 8 durch die Seitenketten der Aminosäuren Glu148 und Arg62 eng koordiniert werden (siehe Abbildung 20, Tabelle 10). Die 8-Hydroxygruppe hat einen etwas geringeren Abstand zu Tyr146 und zum Guanidinrest von Arg62 als die 7-Hydroxygruppe. Allerdings kann die 7-Hydroxygruppe eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxygruppe von Glu148 eingehen. Der besondere Beitrag der 8-Hydroxygruppe von 7,8-DHF zur Bindungsenergie kann mit der Kristallstruktur anhand der Abstände wichtiger funktioneller Gruppen und daraus resultierenden Wechselwirkungen nicht erklärt werden. Zusätzlich können Wassermoleküle an der Oberfläche und im aktiven Zentrum des Proteins zur Koordinierung eines Liganden beitragen. Ferner ist es wahrscheinlich, dass eine Hydroxygruppe in den Positionen 5 oder 3 weitere Wasserstoffbrückenbindungen zur Hydroxygruppe von Ser61 beziehungsweise zur Aminogruppe von Asn60 eingehen könnte. Dennoch zeigen die entsprechenden Flavone keine vermehrte inhibitorische Wirkung. Die enzymkinetischen Ergebnisse der Strukturanaloga von 7,8-DHF lassen sich also momentan nicht vollumfänglich mit der Kristallstruktur von DS6 erklären. Dies ist möglicherweise der Tatsache geschuldet, dass 7,8-DHF beziehungsweise dessen Strukturanaloga in der Lage sind die Positionen von Seitenketten einzelner Aminosäuren oder auch der gesamten Hauptkette in der Region des Bindungsortes stellenweise zu verändern. Dadurch kann es je nach Ligand zu kleineren Abweichungen in der Proteinstruktur der Bindungsstelle kommen. Für die exakte Erklärung der enzymkinetischen Ergebnisse anhand der Struktur wären Röntgenkristallanalysen von PDXP mit den 7,8-DHF-Strukturanaloga und zusätzlich Untersuchungen der Affinitätskonstanten und Assoziations-/Dissoziationsraten mittels Biolayer-Interferometrie hilfreich.

4.3. Modus der Inhibition

Die Ergebnisse der enzymkinetischen und kristallografischen Untersuchungen zur Inhibition von PDXP durch 7,8-DHF legen nahe, dass 7,8-DHF die PDXP-Aktivität gemischt inhibiert, da die kompetitive Inhibition von einer weiteren, komplexeren Komponente begleitet wird (siehe 3.1.2). Kompetitive Inhibitoren konkurrieren mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum und verringern die Enzymaktivität, indem sie den

Anteil der Enzymmoleküle mit gebundenem Substrat verringern. Der inhibitorische Effekt kann durch eine Substratzugabe wieder aufgehoben werden, wodurch der reversibel gebundene Inhibitor vom aktiven Zentrum konzentrationsabhängig verdrängt wird. Eine kompetitive Inhibition ist gekennzeichnet durch einen steigenden K_m -Wert, wobei die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unverändert bleibt. Die Ergebnisse der enzymkinetischen Untersuchungen zeigen in Anwesenheit von 7,8-DHF steigende K_m -Werte, aber auch fallende v_{max} -Werte (siehe Abbildung 10). Die Kristallisationsergebnisse bestätigen den kompetitiven Charakter der Inhibition, da der Inhibitor am aktiven Zentrum gebunden wird (siehe Abbildung 14, Abbildung 19). Worin der Abfall der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms unter Anwesenheit von 7,8-DHF begründet liegt, bleibt allerdings unklar. Es wäre denkbar, dass die Oligomerisierung von PDXP einen Grund hierfür darstellt, falls 7,8-DHF in der Lage wäre die konstitutive Homodimerisierung von PDXP zu verändern. Kestler et al. generierten 2013 monomere PDXP-Mutanten und untersuchten deren enzymatische Aktivität hinsichtlich der Hydrolyse von PLP *in-vitro*. Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität von monomerem PDXP drastisch reduziert ist und nur ca. 3,5 % der des dimeren Wildtyps entsprach [15]. Mithilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten allerdings keine Hinweise zusammengetragen werden, die eine 7,8-DHF-induzierte veränderte Oligomerisierung von PDXP stützen würden. Eine unkompetitive Hemmung, bei der der Inhibitor nur an den Enzym-Substrat-Komplex binden kann, kann ausgeschlossen werden, da die gleichzeitige Bindung von 7,8-DHF und PLP an das gleiche PDXP-Protomer anhand der Informationen der Co-Kristallisation nicht möglich erscheint (siehe Abbildung 19). Woher der experimentell beobachtete Abfall der v_{max} kommt bleibt unbekannt. Mit dem derzeitigen Wissenstand kann diese Komponente der Inhibition nicht erklärt werden.

4.4. Selektivität der Inhibition

Um aussagekräftige wissenschaftliche Ergebnisse zu erzielen, sollten pharmakologische Inhibitoren ihre Wirkung möglichst selektiv entfalten. Die Selektivität der Inhibition der PDXP-Aktivität durch 7,8-DHF wurde zum einen mithilfe strukturähnlicher Flavone, zum anderen mithilfe verwandter HAD-Phosphatasen *in-vitro* getestet. Dazu wurde 3,5-Dihydroxyflavon, 3,7-Dihydroxyflavon, 5,7-Dihydroxyflavon, 3,5,7-Trihydroxyflavon und 5,6,7-Trihydroxyflavon untersucht, die alle keinen Einfluss auf die PDXP-Aktivität

ausüben. Einzig 3,7,8-Trihydroxyflavon-4'-hydroxyphenyl ist in der Lage die PDXP-Aktivität zu reduzieren. Dabei ist der inhibitorische Effekt aber geringer als der von 7,8-DHF. Über 3,7,8-Trihydroxyflavon-4'-hydroxyphenyl ist in der Literatur nichts beschrieben. Interessanterweise wird die Aktivität der Phosphoglykolat-Phosphatase (PGP) durch 7,8-DHF partiell inhibiert. Dieser Effekt ist allerdings im Vergleich mit PDXP gering. Im Bereich der IC_{50} von PDXP wird die PGP-Aktivität erst zu circa 10 % inhibiert. PGP ist der nächste Verwandte von PDXP, die Aminosäuresequenz der murinen Paraloge beider Phosphatasen ist zu 45 % identisch [130]. Genauso wie PDXP liegt PGP auch als obligates Homodimer in Lösung vor und verfügt über eine Kappe vom Typ C2, wobei die vollständige Röntgenkristallstruktur von PGP noch nicht beschrieben wurde [130]. Die ubiquitär exprimierte Phosphatase PGP ist durch die Substrate Glycerol-3-phosphat, 2'-Phosphoglykolat, 4-Phosphoerythronat und 2-Phospho-L-laktat im Glukose- und Lipidstoffwechsel involviert und übernimmt nach aktuellem Kenntnisstand eine Schutzfunktion bei der Entgiftung schädlicher metabolischer Nebenprodukte aus der Glykolyse und von oxidativen DNA-Läsionen [28]. Die genetische Inaktivierung von PGP führte im Mausmodell zu embryonaler Letalität [132]. Neben PGP wurden noch weitere HAD-Phosphatasen verschiedener Kappentypen bezüglich ihrer Aktivität in Anwesenheit von 7,8-DHF getestet, dabei konnte jedoch keine Veränderung festgestellt werden. Getestet wurden die Enzyme Lysin-Histidin-Pyrophosphat Phosphatase (LHPP), die ebenfalls über eine große Kappe vom Typ C2 verfügt und strukturell nahe mit PGP verwandt ist, und die Phosphatasen Orphan 2 (PHOSPHO2) und Phosphoserin Phosphatase (PSPH), die beide über eine Kappe vom C1-Typ verfügen und im Falle von PHOSPHO2 auch in der Lage sind PLP zu dephosphorylieren [5, 7]. Außerdem wurde die kappenlose und von PDXP strukturell weiter entfernte Magnesium-abhängige Phosphatase (MDP1) untersucht [5, 7]. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass 7,8-DHF unter den getesteten Flavonen der wirksamste Inhibitor ist und dass 7,8-DHF neben PDXP zu einem deutlich geringeren Anteil auch PGP inhibiert.

4.5. Erklärungsmodell für das Ausbleiben der 7,8-DHF-Bindung am zweiten Protomer des Homodimers PDXP in DS6

In der Kristallstruktur DS6 liegt PDXP als Homodimer vor. Interessanterweise bindet 7,8-DHF allerdings nur in einem Protomer, der Bindungsplatz im anderen Protomer bleibt

frei. In diesem Punkt passen die enzymkinetischen Ergebnisse unter Anwesenheit von 7,8-DHF nicht mit der Kristallstruktur zusammen. Der PDXP-WT zeigt eine ca. 65%ige und die PDXP-Mutante N60S eine über 90%ige maximale Inhibition der Enzymaktivität. Aus diesen enzymkinetischen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass das zweite Protomer ebenfalls in der Lage ist einen Inhibitor zu binden.

Ein röntgenkristallografisches Modell eines Proteins bildet die durchschnittliche Struktur von 10^{13} - 10^{15} Komplexen im untersuchten Kristall gemittelt über die Zeit des Röntgenexperiments ab [126]. Daher kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Strukturmodell um einen Einzelfall im untersuchten Homodimer zum Zeitpunkt der Datensammlung handelt.

Es wäre denkbar, dass die Bindung eines 7,8-DHF-Moleküls im ersten Protomer eine Konformationsänderung auslöst, die sich auf die Struktur des zweiten Protomers auswirkt und verhindert, dass ein weiteres 7,8-DHF-Molekül binden kann. Doch neben den in 3.2.2 dargestellten Veränderungen, die die 7,8-DHF-Bindung induziert, konnten im gesamten Protein keine weiteren Konformationsabweichungen gefunden werden, die eine solche These unterstützen.

Ein anderer Erklärungsansatz für das Ausbleiben der Flavon-Bindung am zweiten Protomer ist möglicherweise in der Löslichkeitsrate von 7,8-DHF begründet. Die geringe Löslichkeit von 7,8-DHF in wässrigen Lösungsmitteln [127] kann Präzipitationen verursachen und so verhindern, dass höhere Flavon-Konzentrationen im Kristallisationspuffer erreicht werden, die aber nötig wären um eine Bindung in beiden Protomeren zu gewährleisten. Allerdings spricht gegen diese These, wie schon in 4.1 beschrieben, dass PGP den apparenten Aktivitätsanstieg von PDXP unter hohen Flavon-Konzentrationen nicht zeigt (siehe Abbildung 12).

Eine wahrscheinlichere Erklärung für die fehlende 7,8-DHF-Bindung im zweiten Protomer von PDXP liegt in der Anordnung der Proteine im Kristall und der Zugänglichkeit der Bindungsstelle von 7,8-DHF, die sich aus dieser Anordnung ergibt. Mit der Software Pymol kann neben der eigentlichen Kristallstruktur des Proteins auch dessen Umgebung innerhalb der Elementarzelle des Kristalls untersucht werden. Somit können Informationen über die Packung der Moleküle im Kristall gewonnen werden. Die Darstellung der *Symmetry mates* zeigt symmetrieäquivalente Moleküle der Elementarzelle der kristallo-

graphisch gelösten Struktur an. Dabei fällt auf, dass bei den 7,8-DHF gebundenen Protomeren von DS6 der Zugang zum aktiven Zentrum stets offen und gut zugänglich erscheint, während das aktive Zentrum des zweiten Protomers des Dimers durch ein oder mehrere Nachbarmoleküle verdeckt ist (vergleiche Abbildung 24). Es ist also denkbar, dass die Packung der einzelnen PDXP-Dimere im Kristall das Ausbleiben der 7,8-DHF-Bindung im zweiten Protomer von DS6 begründet. Somit wäre das beschriebene Phänomen ein Artefakt der Kristallisation, das so nicht den Zustand von PDXP in Anwesenheit von 7,8-DHF in wässriger Phase widerspiegelt.

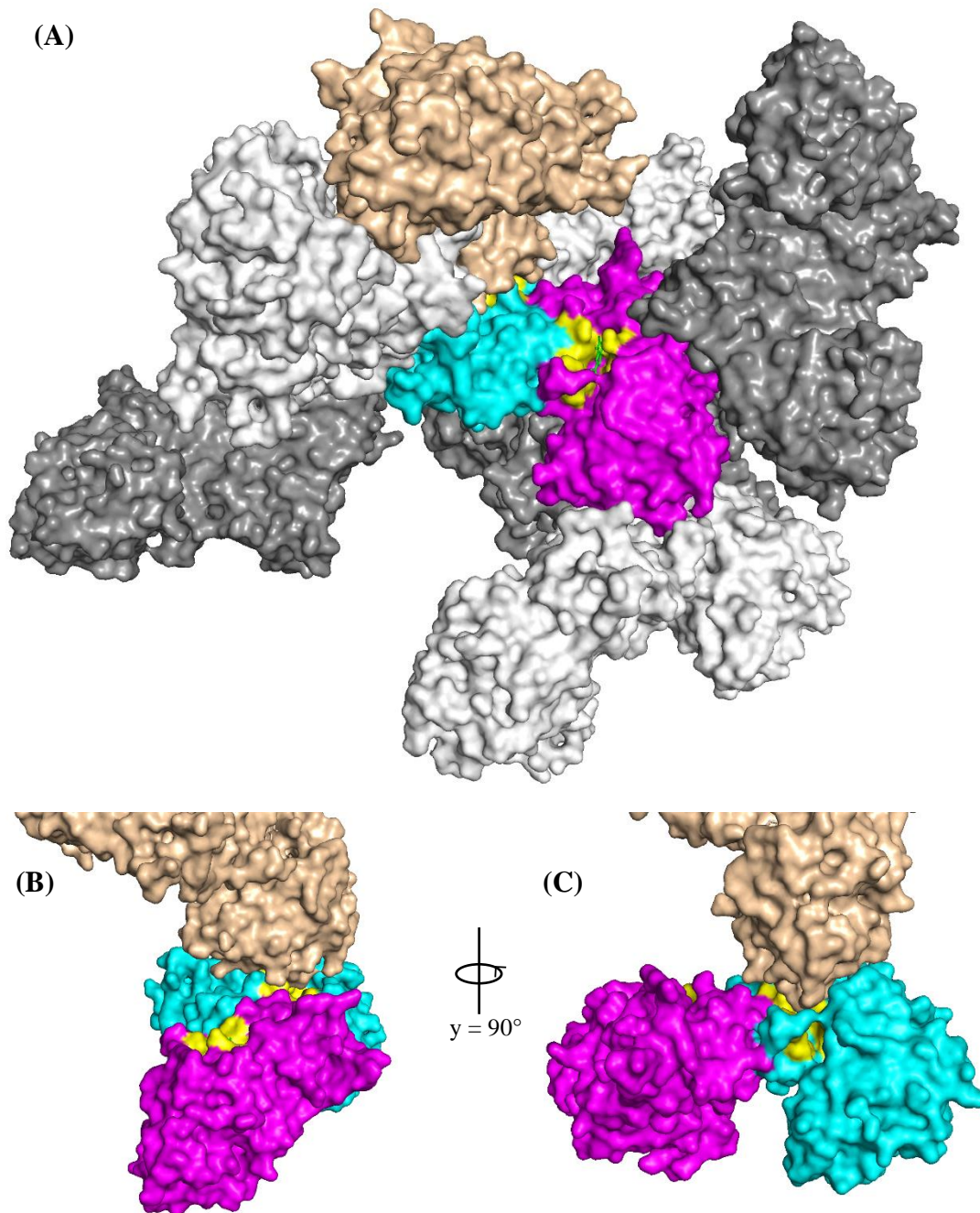


Abbildung 24: Symmetry mates in DS6

(A) Dargestellt ist das Homodimer von PDXP (Protomer A (pink) mit 7,8-DHF (grün), Protomer B (hellblau), der Eingang der aktiven Zentren beider Protomere (gelb)) zusammen mit den umgebenen *Symmetry mates* (PDXP-Dimere in hellgrau, dunkelgrau, hellbraun) in 4 Å Umgebung in der Oberflächen-darstellung. *Symmetry mates* sind symmetrieäquivalente Moleküle der kristallografisch gelösten Struktur in der Elementarzelle, die eine Untersuchung der Packung der Moleküle im Kristall erlauben. Das aktive Zentrum des 7,8-DHF-bindenden Protomers A (pink) ist trotz der Packung des Kristalls gut zugänglich, während der Zugang zur Bindungsstelle des 7,8-DHF-freien Protomers B (hellblau) durch ein Nachbarmolekül (hellbraun) verdeckt wird. (B), (C) Isolierte Darstellung des unzugänglichen aktiven Zentrums von Protomer B (hellblau) aus zwei verschiedenen Ansichten. Ein benachbartes PDXP-Dimer (hellbraun) befindet sich in enger Lagebeziehung zum Eingang des aktiven Zentrums dieses Protomers und verhindert die dortige Bindung eines 7,8-DHF-Moleküls.

4.6. Das Wechselspiel zwischen dem BDNF-Signalweg und dem GABAergen System

PDXP-KO-Mäuse zeigten signifikant erhöhte GABA-Spiegel im Gehirn [36], deshalb kann spekuliert werden, dass eine kontinuierliche Administration von 7,8-DHF PDXP- vermittelt ebenfalls erhöhte GABA-Spiegel im Gehirn freisetzt. Gleichzeitig konnten zahlreiche positive neurologische Effekte nach 7,8-DHF-Administration festgestellt werden, die auf den BDNF-TrkB-Signalweg zurückgeführt werden [114]. Interessant ist nun, dass zwischen dem BDNF- und dem GABAergen-System ein komplexer, wechselseitiger Zusammenhang besteht: BDNF beeinflusst die Entwicklung und Funktionsweise des GABAergen Netzwerks, das wiederum einen Einfluss auf die postsynaptische Freisetzung von BDNF ausübt [133]. BDNF gilt als Schlüsselregulator der GABA-vermittelten synaptischen Transmission. Studien zeigen, dass BDNF die Endozytose des GABA_A-Rezeptors [133] und die Transkription von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten [134] sowie der Glutamat-Decarboxylase (GAD65) [135] und des GABA-Transporters (GAT1) [136] reguliert. Dabei können die BDNF-vermittelten Effekte abhängig vom Entwicklungsstadium der Nervenzellen und von der Gehirnstruktur unterschiedlich ausfallen und werden häufig von proBDNF umgekehrt [133]. ProBDNF ist das Vorläuferprotein von BDNF und entfaltet seine Wirkung unabhängig von TrkB über den p75^{NTR}-Rezeptorsignalweg. Es wird vermutet, dass die relative Verfügbarkeit von BDNF und proBDNF das inhibitorische/exzitatorische Gleichgewicht der GABAergen Signalübertragung bestimmt [133]. Andererseits wurde gezeigt, dass aktivierte GABA_B-Rezeptoren über verschiedene Mechanismen eine vermehrte postsynaptische BDNF-Freisetzung in hippocampalen Neuronen im Entwicklungsstadium auslösen, die wiederum zur funktionellen Reifung des GABAergen Systems beiträgt [133]. Porcher et al. legen abschließend nahe, dass aufgrund des Zusammenspiels des BDNF-Signalwegs mit dem GABAergen System bei einer Beeinträchtigung eines der beiden auch das andere betroffen ist, wodurch weitreichende neurologische Folgen zu erwarten sind [133]. Vor diesem Hintergrund wäre es also denkbar, dass die Inhibition von PDXP durch eine Veränderung des GABAergen Systems an den positiven Effekten von 7,8-DHF beteiligt ist. Zur Untermauerung dieser These sind weitere wissenschaftliche Arbeiten auf diesem Gebiet notwendig.

4.7. Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Die biochemischen und strukturellen Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass 7,8-DHF ein direkter, selektiver Inhibitor der Pyridoxal Phosphatase PDXP ist. Sie eröffnen damit eine neue Perspektive auf die physiologischen Effekte von 7,8-DHF: der Nachweis der 7,8-DHF-vermittelten Inhibition der PDXP-Aktivität *in-vitro* stützt die These, dass PDXP auch an den sehr interessanten *in-vivo*-Effekten von 7,8-DHF beteiligt sein könnte. Diese Effekte werden momentan einem Einfluss des 7,8-DHFs auf den BDNF/TrkB-Signalweg zugeschrieben. Ein direkter Effekt von 7,8-DHF als BDNF-Mimetikum am TrkB-Rezeptor wird aber kontrovers diskutiert. Um diese These wissenschaftlich weiter zu untermauern beziehungsweise zu widerlegen, sind zelluläre Untersuchungen zum Einfluss von 7,8-DHF auf die PDXP-Aktivität ein nächster Schritt. Dazu könnte der Einfluss von 7,8-DHF auf die PDXP-Aktivität in Neuronen des PDXP-WTs im Vergleich zum PDXP-KO untersucht werden. Zusätzlich könnten die 7,8-DHF-insensitiven PDXP-Mutanten, die im Rahmen dieser Arbeit zur Validierung der Kristallisationsergebnisse generiert wurden, den Nachweis liefern, dass PDXP auch im zellulären Kontext ein relevantes Target für 7,8-DHF darstellt. Denn Zellen, die diese PDXP-Mutationen exprimieren und in Anwesenheit von 7,8-DHF keine PDXP-Inhibition verzeichnen, während Zellen, die den PDXP-WT exprimieren und eine 7,8-DHF-vermittelte PDXP-Inhibition verzeichnen, beweisen, dass der Effekt von 7,8-DHF auf PDXP in Zellen *on-target* ist. Falls dieser zelluläre Nachweis positiv ausfällt, könnte das eine wissenschaftliche Reinterpretation der gesammelten Daten zu den *in-vivo*-Effekten von 7,8-DHF veranlassen. Nach dem jetzigen Kenntnisstand erscheint es wahrscheinlich, dass 7,8-DHF indirekt über noch unbekannte Mechanismen an dem BDNF/TrkB-Signalweg wirkt. Aus der Perspektive der 7,8-DHF-vermittelten PDXP-Inhibition wäre eine Beteiligung des GABAergen Systems, eines PLP-abhängigen Enzyms, das den BDNF/TrkB-Signalweg beeinflusst oder eine Hyperphosphorylierung von BDNF/TrkB durch einen erhöhten PLP-Spiegel denkbar. Außerdem kann 7,8-DHF als PDXP-Inhibitor in künftigen wissenschaftlichen Studien dazu beitragen, mehr über die Rolle von PDXP in der Regulation des Vitamin B6-Metabolismus der verschiedenen Organe zu erfahren.

Des Weiteren könnten die gesammelten Daten für *in-silico-Screens* nach der Methodik des *structure-based drug design* verwendet werden, um neue, selektive und hochaffine

Inhibitoren auszumachen. Dieser strukturbasierte Ansatz testet digitale Datenbanken verschiedenster niedermolekularer Substanzen oder designt neue Inhibitoren und nutzt dabei als Auswahlkriterium die prognostizierte Bindungsaffinität des potenziellen Liganden zu seinem Target.

5. Zusammenfassung

Die Pyridoxal-5'-Phosphat Phosphatase (PDXP), auch bekannt als Chronophin (CIN), ist eine HAD-Phosphatase, die beim Menschen ubiquitär exprimiert wird und eine entscheidende Rolle im zellulären Vitamin-B6-Metabolismus einnimmt. PDXP ist in der Lage Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP), die co-enzymatisch aktive Form von Vitamin B6, zu dephosphorylieren. *In-vivo* Studien mit Mäusen zeigten, dass die Abwesenheit von PDXP mit verbesserten kognitiven Leistungen und einem verringerten Wachstum von Hirntumoren assoziiert ist [36, 94]. Dies begründet die gezielte Suche nach einem pharmakologischen Inhibitor für PDXP. Ein Hochdurchsatz-Screen legte nahe, dass 7,8-Dihydroxyflavon (7,8-DHF) hierfür ein potenzieller Kandidat ist. Zahlreiche Studien beschreiben bereits vielfältige positive neurologische Effekte nach *in-vivo* Administration von 7,8-DHF, allerdings bleibt der genaue Wirkmechanismus umstritten und wird bis dato nicht mit PDXP in Zusammenhang gebracht. Ziel dieser Arbeit war es, die Inhibition von PDXP durch 7,8-DHF näher zu charakterisieren und damit einen Beitrag zur Beantwortung der Frage zu leisten, ob PDXP an den 7,8-DHF-induzierten Effekten beteiligt ist.

Hierzu wurde der Effekt von 7,8-DHF auf die enzymatische Aktivität von rekombinant hergestelltem, gereinigtem PDXP in *in-vitro* Phosphatase-Assays charakterisiert. Um die Selektivität von 7,8-DHF gegenüber PDXP zu untersuchen, wurden fünf weitere HAD-Phosphatasen getestet. Unter den analysierten Phosphatasen zeigte einzig die dem PDXP nah verwandte Phosphoglykolat Phosphatase (PGP) eine geringer ausgeprägte Sensitivität gegen 7,8-DHF. Ein Vergleich von 7,8-DHF mit sechs strukturell verwandten, hydroxylierten Flavonen zeigte, dass 7,8-DHF unter den getesteten Substanzen die höchste Potenz und Effektivität aufwies. Außerdem wurde eine Co-Kristallisation von PDXP mit 7,8-DHF durchgeführt, deren Struktur bis zu einer Auflösung von 2,0 Å verfeinert werden konnte. Die in der Kristallstruktur identifizierte Bindungsstelle von 7,8-DHF an PDXP wurde mittels verschiedener, neu generierter PDXP-Mutanten enzymkinetisch bestätigt. Zusammenfassend zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse, dass 7,8-DHF ein direkter, selektiver und vorwiegend kompetitiver Inhibitor der PDXP-Aktivität ist, mit einer IC_{50} im submikromolaren Bereich.

Die Ergebnisse dieser *in-vitro* Untersuchungen motivieren zu weiterer Forschung bezüglich der 7,8-DHF-vermittelten Inhibition der PDXP-Aktivität in Zellen, um die Frage

beantworten zu können, ob PDXP auch *in-vivo* ein relevantes Target für 7,8-DHF darstellt.

6. Summary

Pyridoxal 5'-phosphate phosphatase (PDXP, also known as chronophin, CIN), is a ubiquitously expressed HAD-phosphatase. PDXP is known to dephosphorylate pyridoxal-5'-phosphate (PLP), the biologically active form of vitamin B6 that is one of the most versatile cofactors found in nature. *In-vivo* studies revealed improved cognition and impaired glial tumor growth with mice absent of PDXP [36, 94], and caused the search for a pharmacological inhibitor of PDXP. The result of a high-throughput screen suggested that 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF) is a suitable candidate for this. Interestingly, numerous scientific studies highlighted diverse positive neurological effects after administration of 7,8-DHF to mice, however, the precise mode of action remains disputed, and at this date is unrelated to PDXP. The aim of this work was to characterize the inhibition of PDXP by 7,8-DHF. This approach is a first step to determine whether 7,8-DHF may indeed exert some of its neurological effects via PDXP inhibition.

For this purpose, the effect of 7,8-DHF on the enzymatic activity of recombinantly expressed and purified PDXP was characterized in *in-vitro* phosphatase assays. To investigate the selectivity of 7,8-DHF on PDXP, five additional HAD phosphatases were tested. Among the phosphatases analyzed, only the phosphoglycolate phosphatase (PGP), closely related to PDXP, showed a less pronounced sensitivity to 7,8-DHF. A comparison of 7,8-DHF with six structurally related, hydroxylated flavones showed that 7,8-DHF had the highest potency and effectiveness among the substances tested. In addition, a co-crystallization of PDXP with 7,8-DHF was carried out. The resulting co-crystal structure could be resolved and refined to a resolution of 2.0 Å. The binding site of the ligand to the enzyme identified in the crystal structure was confirmed via activity-based assays using various newly generated PDXP mutants. In summary, the results described here show that 7,8-DHF is a direct, selective, and predominantly competitive inhibitor of PDXP activity with an IC_{50} in the submicromolar range.

The results of these *in-vitro* studies motivate further research into the 7,8-DHF-mediated inhibition of PDXP activity in cells to be able to answer the question of whether PDXP is also a relevant target for 7,8-DHF *in-vivo*.

7. Literaturverzeichnis

1. **Richard, J.P.**, *Enzymatic rate enhancements: a review and perspective*. *Biochemistry*, 2013. 52(12): S. 2009-11.
2. **McDonald, A.G. und K.F. Tipton**, *Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties*. *FEBS Journal*, 2014. 281(2): S. 583-592.
3. **Kuznetsova, E., et al.**, *Functional Diversity of Haloacid Dehalogenase Superfamily Phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae**. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015. 290(30): S. 18678-18698.
4. **Allen, K.N. und D. Dunaway-Mariano**, *Markers of fitness in a successful enzyme superfamily*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2009. 19(6): S. 658-65.
5. **Burroughs, A.M., et al.**, *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): S. 1003-34.
6. **Kim, H.Y., et al.**, *Molecular basis for the local conformational rearrangement of human phosphoserine phosphatase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(48): S. 46651-8.
7. **Seifried, A., J. Schultz, und A. Gohla**, *Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease*. *FEBS Journal*, 2013. 280(2): S. 549-71.
8. **Dai, J., et al.**, *Analysis of the structural determinants underlying discrimination between substrate and solvent in beta-phosphoglucomutase catalysis*. *Biochemistry*, 2009. 48(9): S. 1984-95.
9. **Zhang, G., et al.**, *Kinetic evidence for a substrate-induced fit in phosphonoacetaldehyde hydrolase catalysis*. *Biochemistry*, 2002. 41(45): S. 13370-7.
10. **Park, J., et al.**, *Cap-domain closure enables diverse substrate recognition by the C2-type haloacid dehalogenase-like sugar phosphatase *Plasmodium falciparum* HAD1*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 2015. 71(Pt 9): S. 1824-34.
11. **Biswas, T., et al.**, *The tail of KdsC: conformational changes control the activity of a haloacid dehalogenase superfamily phosphatase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. 284(44): S. 30594-603.
12. **Peisach, E., et al.**, *X-ray Crystal Structure of the Hypothetical Phosphotyrosine Phosphatase MDP-1 of the Haloacid Dehalogenase Superfamily*. *Biochemistry*, 2004. 43: S. 12770-9.
13. **Parsons, J.F., et al.**, *From structure to function: Yrbl from *Haemophilus influenzae* (HI1679) is a phosphatase*. *Proteins*, 2002. 46(4): S. 393-404.
14. **Pandya, C., et al.**, *Enzyme promiscuity: engine of evolutionary innovation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. 289(44): S. 30229-36.
15. **Kestler, C., et al.**, *Chronophin dimerization is required for proper positioning of its substrate specificity loop*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. 289(5): S. 3094-103.
16. **Lahiri, S.D., et al.**, *Analysis of the substrate specificity loop of the HAD superfamily cap domain*. *Biochemistry*, 2004. 43(10): S. 2812-20.

17. **Koonin, E.V. und R.L. Tatusov**, *Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search.* Journal of Molecular Biology, 1994. 244(1): S. 125-32.
18. **Zhang, G., et al.**, *Investigation of metal ion binding in phosphonoacetaldehyde hydrolase identifies sequence markers for metal-activated enzymes of the HAD enzyme superfamily.* Biochemistry, 2004. 43(17): S. 4990-7.
19. **Collet, J.F., V. Stroobant, und E. Van Schaftingen**, *Mechanistic studies of phosphoserine phosphatase, an enzyme related to P-type ATPases.* Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(48): S. 33985-90.
20. **Ridder, I.S. und B.W. Dijkstra**, *Identification of the Mg²⁺-binding site in the P-type ATPase and phosphatase members of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily by structural similarity to the response regulator protein CheY.* Biochemical Journal, 1999. 339(Pt 2): S. 223-6.
21. **Barford, D., A.K. Das, und M.P. Egloff**, *The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation.* Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1998. 27: S. 133-64.
22. **Lahiri, S.D., et al.**, *Caught in the act: the structure of phosphorylated beta-phosphoglucomutase from Lactococcus lactis.* Biochemistry, 2002. 41(26): S. 8351-9.
23. **Lahiri, S.D., et al.**, *The pentacovalent phosphorus intermediate of a phosphoryl transfer reaction.* Science, 2003. 299(5615): S. 2067-71.
24. **Collet, J.F., et al.**, *A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal DXDX(T/V) motif.* Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(23): S. 14107-12.
25. **Gohla, A., J. Birkenfeld, und G.M. Bokoch**, *Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics.* Nature Cell Biology, 2005. 7(1): S. 21-9.
26. **Li, C., et al.**, *Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover.* Molecular Cell, 2008. 31(6): S. 835-49.
27. **Jang, Y.M., et al.**, *Human pyridoxal phosphatase. Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution.* Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(50): S. 50040-6.
28. **Gohla, A.**, *Do metabolic HAD phosphatases moonlight as protein phosphatases?* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 2019. 1866(1): S. 153-166.
29. **Fonda, M.L.**, *Purification and characterization of vitamin B6-phosphate phosphatase from human erythrocytes.* Journal of Biological Chemistry, 1992. 267(22): S. 15978-83.
30. **Almo, S.C., et al.**, *Structural genomics of protein phosphatases.* Journal of Structural and Functional Genomics, 2007. 8(2-3): S. 121-40.
31. **Percudani, R. und A. Peracchi**, *A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes.* EMBO Reports, 2003. 4(9): S. 850-4.
32. **Berg, J.M., J.L. Tymoczko, und L. Stryer**, *Biochemie.* 7 Ed. 2014, Berlin: Springer, S. 691-693.

33. **Mooney, S., et al.,** *Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity.* *Molecules*, 2009. 14(1): S. 329-51.
34. **Rahman, M.K., et al.,** *Effect of pyridoxal phosphate deficiency on aromatic L-amino acid decarboxylase activity with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates in rats.* *Japanese Journal of Pharmacology*, 1982. 32(5): S. 803-11.
35. **Di Salvo, M.L., R. Contestabile, und M.K. Safo,** *Vitamin B(6) salvage enzymes: mechanism, structure and regulation.* *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2011. 1814(11): S. 1597-608.
36. **Jeanclos, E., et al.,** *Improved cognition, mild anxiety-like behavior and decreased motor performance in pyridoxal phosphatase-deficient mice.* *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2019. 1865(1): S. 193-205.
37. **Albersen, M., et al.,** *The intestine plays a substantial role in human vitamin B6 metabolism: a Caco-2 cell model.* *PLOS ONE*, 2013. 8(1): S. e54113.
38. **Clayton, P.T.,** *B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency.* *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2006. 29(2-3): S. 317-26.
39. **Kang, J.H., et al.,** *Genomic organization, tissue distribution and deletion mutation of human pyridoxine 5'-phosphate oxidase.* *European Journal of Biochemistry*, 2004. 271(12): S. 2452-61.
40. **Anderson, B.B., et al.,** *Conversion of vitamin B 6 compounds to active forms in the red blood cell.* *Journal of Clinical Investigation*, 1971. 50(9): S. 1901-9.
41. **Bohney, J.P., M.L. Fonda, und R.C. Feldhoff,** *Identification of Lys190 as the primary binding site for pyridoxal 5'-phosphate in human serum albumin.* *FEBS Letters*, 1992. 298(2-3): S. 266-8.
42. **Fonda, M.L., C. Trauss, und U.M. Guempel,** *The binding of pyridoxal 5'-phosphate to human serum albumin.* *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991. 288(1): S. 79-86.
43. **Whittaker, J.W.,** *Intracellular trafficking of the pyridoxal cofactor. Implications for health and metabolic disease.* *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016. 592: S. 20-6.
44. **Spector, R. und L.L. Greenwald,** *Transport and metabolism of vitamin B6 in rabbit brain and choroid plexus.* *Journal of Biological Chemistry*, 1978. 253(7): S. 2373-9.
45. **Darin, N., et al.,** *Mutations in PROSC Disrupt Cellular Pyridoxal Phosphate Homeostasis and Cause Vitamin-B(6)-Dependent Epilepsy.* *The American Journal of Human Genetics*, 2016. 99(6): S. 1325-1337.
46. **Di Salvo, M.L., M.K. Safo, und R. Contestabile,** *Biomedical aspects of pyridoxal 5'-phosphate availability.* *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 2012. 4: S. 897-913.
47. **Di Salvo, M.L., et al.,** *Structure and mechanism of Escherichia coli pyridoxine 5'-phosphate oxidase.* *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2003. 1647(1-2): S. 76-82.
48. **Loubbardi, A., et al.,** *Sterol uptake induced by an impairment of pyridoxal phosphate synthesis in Saccharomyces cerevisiae: cloning and sequencing of the PDX3 gene encoding pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase.* *Journal of Bacteriology*, 1995. 177(7): S. 1817-23.

49. **Bilski, P., et al.,** *Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants.* Photochemistry and Photobiology, 2000. 71(2): S. 129-34.
50. **Tully, D.B., V.E. Allgood, und J.A. Cidlowski,** *Modulation of steroid receptor-mediated gene expression by vitamin B6.* FASEB Journal, 1994. 8(3): S. 343-9.
51. **Huq, M.D., et al.,** *Vitamin B6 conjugation to nuclear corepressor RIP140 and its role in gene regulation.* Nature Chemical Biology, 2007. 3(3): S. 161-5.
52. **Oka, T.,** *Modulation of gene expression by vitamin B6.* Nutrition Research Reviews, 2001. 14(2): S. 257-66.
53. **Mills, P.B., et al.,** *Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures.* Nature Medicine, 2006. 12(3): S. 307-9.
54. **Mills, P.B., 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): S. 1077-1086.
55. **Wilson, M.P., et al.,** *Disorders affecting vitamin B(6) metabolism.* Journal of Inherited Metabolic Disease, 2019. 42(4): S. 629-646.
56. **Martin, D.L. und K. Rimvall,** *Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain.* Journal of Neurochemistry, 1993. 60(2): S. 395-407.
57. **Petroff, O.A.,** *GABA and glutamate in the human brain.* The Neuroscientist, 2002. 8(6): S. 562-73.
58. **Gachon, F., et al.,** *The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy.* Genes & Development, 2004. 18(12): S. 1397-412.
59. **Hoffmann, G.F., et al.,** *Pyridoxal 5'-phosphate may be curative in early-onset epileptic encephalopathy.* Journal of Inherited Metabolic Disease, 2007. 30(1): S. 96-9.
60. **Stockler, S., et al.,** *Pyridoxine dependent epilepsy and antiquitin deficiency: clinical and molecular characteristics and recommendations for diagnosis, treatment and follow-up.* Molecular Genetics and Metabolism, 2011. 104(1-2): S. 48-60.
61. **Mizuno, K.,** *Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation.* Cellular Signalling, 2013. 25(2): S. 457-69.
62. **Ostrowska, Z. und J. Moraczewska,** *Cofilin - a protein controlling dynamics of actin filaments.* Postepy Hig Med Dosw (Online), 2017. 71(0): S. 339-351.
63. **Alberts, B., et al.,** *Molekularbiologie der Zelle.* 2017, Weinheim, Germany: John Wiley & Sons, S. 1020-1021,1028-1029.
64. **McGough, A., et al.,** *Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function.* Journal of Cell Biology, 1997. 138(4): S. 771-81.
65. **Pollard, T.D. und G.G. Borisy,** *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.* Cell, 2003. 112(4): S. 453-65.
66. **Hotulainen, P., et al.,** *Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells.* Molecular Biology of the Cell, 2005. 16(2): S. 649-64.

67. **Kiuchi, T., et al.,** *Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers.* 2007. 177(3): S. 465-76.
68. **Arber, S., et al.,** *Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase.* Nature, 1998. 393(6687): S. 805-9.
69. **Toshima, J., et al.,** *Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation.* Molecular Biology of the Cell, 2001. 12(4): S. 1131-45.
70. **Niwa, R., et al.,** *Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin.* Cell, 2002. 108(2): S. 233-46.
71. **Oleinik, N.V., N.I. Krupenko, and S.A. Krupenko,** *ALDH1L1 inhibits cell motility via dephosphorylation of cofilin by PP1 and PP2A.* Oncogene, 2010. 29(47): S. 6233-44.
72. **Huang, T.Y., C. DerMardirossian, and G.M. Bokoch,** *Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics.* Current Opinion in Cell Biology, 2006. 18(1): S. 26-31.
73. **Oñate, S.A., et al.,** *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily.* Science, 1995. 270(5240): S. 1354-7.
74. **Xu, J., R.C. Wu, and B.W. O'Malley,** *Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family.* Nature Reviews Cancer, 2009. 9(9): S. 615-30.
75. **Lydon, J.P. and B.W. O'Malley,** *Minireview: steroid receptor coactivator-3: a multifarious coregulator in mammary gland metastasis.* Endocrinology, 2011. 152(1): S. 19-25.
76. **Anzick, S.L., et al.,** *AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer.* Science, 1997. 277(5328): S. 965-8.
77. **Han, S.J., D.M. Lonard, and B.W. O'Malley,** *Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications.* Trends in Endocrinology & Metabolism, 2009. 20(1): S. 8-15.
78. **Castellano, L., et al.,** *The estrogen receptor-alpha-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response.* PNAS, 2009. 106(37): S. 15732-7.
79. **Kim, J.E., et al.,** *PLPP/CIN Regulates Seizure Activity by the Differential Modulation of Calsenilin Binding to GluN1 and Kv4.2 in Mice.* Frontiers in Molecular Neuroscience, 2017. 10: S. 303.
80. **Kim, J.E., et al.,** *PLPP/CIN-mediated NEDD4-2 S448 dephosphorylation regulates neuronal excitability via GluA1 ubiquitination.* Cell Death & Disease, 2019. 10(8): S. 545.
81. **Kim, J.E., et al.,** *PLPP/CIN-mediated Mdm2 dephosphorylation increases seizure susceptibility via abrogating PSD95 ubiquitination.* Experimental Neurology, 2020. 331: S. 113383.
82. **Whyte, M.P., et al.,** *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.* Journal of Clinical Investigation, 1988. 81(4): S. 1234-1239.

83. **Fujimoto, S., et al.**, *Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex*. The Journal of Biochemistry, 1984. 96(4): S. 1079-88.
84. **Murakami, K., S. Fujimoto, und A. Ohara**, *Subcellular localization and some properties of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from rat liver*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986. 34(8): S. 3320-7.
85. **Klausberger, T. und P. Somogyi**, *Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations*. Science, 2008. 321(5885): S. 53-7.
86. **McQuail, J.A., C.J. Frazier, und J.L. Bizon**, *Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling*. Trends in Molecular Medicine, 2015. 21(7): S. 450-460.
87. **Ge, S., et al.**, *GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis*. Trends in Neurosciences, 2007. 30(1): S. 1-8.
88. **Lieberwirth, C., et al.**, *Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory*. Brain Research, 2016. 1644: S. 127-40.
89. **Schür, R.R., et al.**, *Brain GABA levels across psychiatric disorders: A systematic literature review and meta-analysis of 1H-MRS studies*. Human Brain Mapping, 2016. 37(9): S. 3337-3352.
90. **Rozycka, A. und M. Liguz-Leczna**, *The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse*. Aging Cell, 2017. 16(4): S. 634-643.
91. **Ostrom, Q.T., et al.**, *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*. Neuro-Oncology, 2015. 17(Suppl 4): S. iv1-iv62.
92. **Carlsson, S.K., S.P. Brothers, und C. Wahlestedt**, *Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme*. EMBO Molecular Medicine, 2014. 6(11): S. 1359-70.
93. **Huse, J.T. und E.C. Holland**, *Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma*. Nature Reviews Cancer, 2010. 10(5): S. 319-31.
94. **Schulze, M., et al.**, *Chronophin is a glial tumor modifier involved in the regulation of glioblastoma growth and invasiveness*. Oncogene, 2016. 35(24): S. 3163-3177.
95. **Johansson, M.**, *Serum B Vitamin Levels and Risk of Lung Cancer*. JAMA, 2010. 303(23): S. 2377.
96. **Harris, H.R., et al.**, *Folate, vitamin B(6) , vitamin B(12) , methionine and alcohol intake in relation to ovarian cancer risk*. International Journal of Cancer, 2012. 131(4): S. E518-29.
97. **Larsson, S.C., N. Orsini, und A. Wolk**, *Vitamin B6 and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies*. JAMA, 2010. 303(11): S. 1077-83.
98. **Galluzzi, L., et al.**, *Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses*. Oncogene, 2013. 32(42): S. 4995-5004.
99. **Mocellin, S., M. Briarava, und P. Pilati**, *Vitamin B6 and Cancer Risk: A Field Synopsis and Meta-Analysis*. Journal of the National Cancer Institute, 2017. 109(3): S. 230.

100. **Gee, K.R., et al.**, *Fluorogenic substrates based on fluorinated umbelliferones for continuous assays of phosphatases and beta-galactosidases*. *Analytical Biochemistry*, 1999. 273(1): S. 41-8.
101. **Welte, S., et al.**, *6,8-Difluoro-4-methylumbiliferyl phosphate: a fluorogenic substrate for protein tyrosine phosphatases*. *Analytical Biochemistry*, 2005. 338(1): S. 32-8.
102. **Kumar, S. und A.K. Pandey**, *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. *ScientificWorldJournal*, 2013. 2013: S. 162750.
103. **Andero, R. und K.J. Ressler**, *Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic*. *Genes, Brain and Behavior*, 2012. 11(5): S. 503-512.
104. **Jang, S.W., et al.**, *A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone*. *PNAS*, 2010. 107(6): S. 2687-92.
105. **Huang, E.J. und L.F. Reichardt**, *Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction*. *Annual Review of Biochemistry*, 2003. 72(1): S. 609-642.
106. **Erickson, K.I., D.L. Miller, und K.A. Roecklein**, *The Aging Hippocampus*. *The Neuroscientist*, 2012. 18(1): S. 82-97.
107. **Minichiello, L.**, *TrkB signalling pathways in LTP and learning*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009. 10(12): S. 850-60.
108. **Yoshii, A. und M. Constantine-Paton**, *Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease*. *Developmental Neurobiology*, 2010. 70(5): S. 304-22.
109. **Gupta, V.K., et al.**, *TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. 14(5): S. 10122-42.
110. **Liu, X., et al.**, *A synthetic 7,8-dihydroxyflavone derivative promotes neurogenesis and exhibits potent antidepressant effect*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010. 53(23): S. 8274-86.
111. **Andero, R., et al.**, *7,8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, blocks long-term spatial memory impairment caused by immobilization stress in rats*. *Hippocampus*, 2012. 22(3): S. 399-408.
112. **Blugeot, A., et al.**, *Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers*. *Journal of Neuroscience*, 2011. 31(36): S. 12889-99.
113. **Devi, L. und M. Ohno**, *7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease*. *Neuropsychopharmacology*, 2012. 37(2): S. 434-44.
114. **Liu, C., C.B. Chan, und K. Ye**, *7,8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders*. *Translational Neurodegeneration*, 2016. 5(1).
115. **Boltaev, U., et al.**, *Multiplex quantitative assays indicate a need for reevaluating reported small-molecule TrkB agonists*. *Science Signaling*, 2017. 10(493).
116. **Todd, D., et al.**, *A Monoclonal Antibody TrkB Receptor Agonist as a Potential Therapeutic for Huntington's Disease*. *PLOS ONE*, 2014. 9(2): S. e87923.

117. **Laemmli, U.K.**, *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. 227(5259): S. 680-685.
118. **Meyer, T.S. und B.L. Lamberts**, *Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1965. 107(1): S. 144-5.
119. **Kestler, C.**, *Untersuchungen über die Dimerisierung der HAD-Phosphatase Chronophin*, *Institut für Pharmakologie und Toxikologie*. 2016, Julius Maximilians Universität Würzburg: unveröffentlichte Dissertation, S. 49-50,90.
120. **Knobloch, G.**, *Die biochemische und strukturelle Charakterisierung von Chronophin*, *Institut für Biomedizin*. 2014, Julius Maximilians Universität Würzburg: unveröffentlichte Dissertation, S. 45.
121. **Panja, S., et al.**, *How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of Escherichia coli?* *Mol Membr Biol*, 2008. 25(5): S. 411-22.
122. **Baykov, A.A., O.A. Evtushenko, und S.M. Avaeva**, *A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay*. *Analytical Biochemistry*, 1988. 171(2): S. 266-270.
123. **Hogan, M.** *Ask a Chemist: How Colorimetric Assays Work*. 2011 30.09.2020]; URL: <https://bitesizebio.com/7214/ask-a-chemist-how-colorimetric-assays-work/>.
124. **Scapin, G.**, *Molecular replacement then and now*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 2013. 69(Pt 11): S. 2266-75.
125. **Rossmann, M.G. und D.M. Blow**, *The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit*. *Acta Crystallographica*, 1962. 15(1): S. 24-31.
126. **Rhodes, G.**, *Crystallography Made Crystal Clear*. 2006, Amsterdam: Elsevier, S. 35-38.
127. **Selleckchem**. *7,8-Dihydroxyflavone*. o. J. 14.11.2020]; URL: <https://www.selleckchem.com/datasheet/7-8-dihydroxyflavone-S831901-DataSheet.html>.
128. **Michaelis, L., et al.**, *The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper*. *Biochemistry*, 2011. 50(39): S. 8264-9.
129. **Kriegel, T. und W. Schellenberger**, *Enzyme - Grundkonzepte der Biokatalyse*, in *Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie*, P.C. Heinrich, M. Müller, und L. Graeve, Editors. 2014, Springer: Berlin, S. 112.
130. **Seifried, A., 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. 289(6): S. 3416-31.
131. **Knobloch, G., et al.**, *Synthesis of hydrolysis-resistant pyridoxal 5'-phosphate analogs and their biochemical and X-ray crystallographic characterization with the pyridoxal phosphatase chronophin*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015. 23(12): S. 2819-27.
132. **Segerer, G., et al.**, *An essential developmental function for murine phosphoglycolate phosphatase in safeguarding cell proliferation*. *Scientific Reports*, 2016. 6(1): S. 35160.

133. **Porcher, C., I. Medina, und J.-L. Gaiarsa**, *Mechanism of BDNF Modulation in GABAergic Synaptic Transmission in Healthy and Disease Brains*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018. 12.
134. **Bell-Horner, C.L., et al.**, *ERK/MAPK pathway regulates GABAA receptors*. *Journal of Neurobiology*, 2006. 66(13): S. 1467-74.
135. **Sánchez-Huertas, C. und B. Rico**, *CREB-Dependent Regulation of GAD65 Transcription by BDNF/TrkB in Cortical Interneurons*. *Cerebral Cortex*, 2011. 21(4): S. 777-88.
136. **Vaz, S.H., et al.**, *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) enhances GABA transport by modulating the trafficking of GABA transporter-1 (GAT-1) from the plasma membrane of rat cortical astrocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. 286(47): S. 40464-76.

8. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser, <i>aqua destillata</i> (lat.)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i> (engl.)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin, <i>bovine serum albumin</i> (engl.)
CIN	Chronophin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure, <i>gamma-aminobutyric acid</i> (engl.)
H ₂ O	Wasser
HAD	<i>Haloacid Dehalogenase</i> (engl.)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<i>K_m</i>	Michaelis-Menten-Konstante
KO	Knockout
min	Minuten
OD	Optische Dichte, <i>optical density</i> (engl.)
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i> (engl.)
PDB	Protein Data Bank
PDXK	Pyridoxal Kinase
PDXP	Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase
PGP	Phosphoglykolat Phosphatase
PL	Pyridoxal
PLP	Pyridoxal 5'-Phosphat
PNPO	Pyridox(am)in (5'-Phosphat) Oxidase
r.m.s.d.	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung, <i>root mean square deviation</i> (engl.)

rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i> (engl.)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRC	Steroid-Rezeptor-Koaktivator, <i>steroid-receptor-coactivator</i> (engl.)
TEA	Triethanolamin
TEV	Tobacco etch Virus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkB	Tropomyosin-Rezeptor Kinase B
U	Enzymeinheit, <i>Unit</i> (engl.)
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V	Volt
v/v	Volumenprozent, <i>volume per volume</i>
w/v	Massenkonzentration, <i>weight per volume</i>
WBB	Wasserstoffbrückenbindung
WT	Wildtyp

Abkürzungen der Aminosäuren:

A (Ala)	Alanin	M (Met)	Methionin
C (Cys)	Cystein	N (Asn)	Asparagin
D (Asp)	Asparaginsäure, Aspartat	P (Pro)	Prolin
E (Glu)	Glutaminsäure, Glutamat	Q (Gln)	Glutamin
F (Phe)	Phenylalanin	R (Arg)	Arginin
G (Gly)	Glycin	S (Ser)	Serin
H (His)	Histidin	T (Thr)	Threonin
I (Ile)	Isoleucin	V (Val)	Valin
K (Lys)	Lysin	W (Trp)	Tryptophan
L (Leu)	Leucin	Y (Tyr)	Tyrosin

Falls nicht anders angegeben sind alle Aminosäuresequenzen im Einbuchstabencode in 5'-3'-Richtung angegeben.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionsmechanismus von HAD-Phosphatasen	4
Abbildung 2: Chemische Struktur der Vitamin B6 Vitamere und deren enzymatische Umwandlung	6
Abbildung 3: Chemische Struktur des Flavon-Grundgerüsts und von 7,8- Dihydroxyflavon	13
Abbildung 4: <i>Nested</i> PCR der PDXP-Mutanten	24
Abbildung 5: Reaktionsmechanismus des Biomol Green Assays	30
Abbildung 6: Phosphatstandardkurve	31
Abbildung 7: <i>Sitting-drop</i> -Technik der Proteinkristallisation	35
Abbildung 8: SDS-Gele des gereinigten PDXPs gefärbt mit Coomassie Blue	37
Abbildung 9: Direkte Inhibition der PDXP-Aktivität durch 7,8-DHF	39
Abbildung 10: Michaelis-Menten-Enzymkinetik für PDXP mit 7,8-DHF	41
Abbildung 11: Inhibition der PDXP-Aktivität durch Strukturanaloga von 7,8-DHF	42
Abbildung 12: Inhibition der Enzymaktivität ausgewählter HAD-Phosphatasen durch 7,8-DHF	43
Abbildung 13: Foto eines Kristalls	44
Abbildung 14: Übersicht des PDXP Dimers in DS6	46
Abbildung 15: Überlagerungsdarstellung von DS6 Protomer A und 4BX3 Protomer A	47
Abbildung 16: Elektronendichtekarte über 7,8-DHF in DS6	47
Abbildung 17: Untersuchung der aktiven Zentren in DS6 Protomer A und 4BX3 Protomer A	48
Abbildung 18: Untersuchung der Mg ²⁺ -Koordinierung in DS6 Protomer A und 4BX3 Protomer A	49
Abbildung 19: Überlagerung der Bindungsstelle von PLP aus 2CFT mit der von 7,8-DHF aus DS6 im aktiven Zentrum von PDXP	51
Abbildung 20: Koordinierung von 7,8-DHF in DS6	52
Abbildung 21: Überlagerung von Ser61, Arg62, Glu148 von Protomer A und Protomer B aus DS6	53
Abbildung 22: Arg62 in DS6 und 4BX3	54

Abbildung 23: Enzymaktivität der PDXP-Mutanten im Vergleich zu PDXP-WT und deren Inhibition durch 7,8-DHF.....	58
Abbildung 24: <i>Symmetry mates</i> in DS6	67

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Erworbene Oligonukleotide	17
Tabelle 2:	Verwendete Plasmide.....	18
Tabelle 3:	Zusammensetzung der Gele, Puffer, Färbe- und Entfärbelösungen für SDS-PAGE.....	23
Tabelle 4:	Thermozyklen der PCR.....	25
Tabelle 5:	Puffer der Proteinaufreinigung	29
Tabelle 6:	Zusammensetzung der Assay-Puffer der jeweiligen Phosphatasen.....	33
Tabelle 7:	Reaktionsbedingungen der Aktivitätsassays der getesteten HAD- Phosphatasen.....	38
Tabelle 8:	Enzymkinetische Parameter v_{\max} und K_m für PDXP mit 7,8-DHF	41
Tabelle 9:	Datensammlung und Verfeinerungsstatistik von DS6	45
Tabelle 10:	Koordinierung von 7,8-DHF in DS6 und DS4	55
Tabelle 11:	Reaktionsbedingungen der Aktivitätsassays der PDXP-Mutanten.....	58
Tabelle S1:	Mg^{2+} und PO_4^{3-} -Koordinierung in DS6 Protomer A im Vergleich zu 4BX3 Protomer A	88
Tabelle S2:	Koordinierung von PLP in 2CFT.....	89

11. Anhang

Tabelle S1: Mg²⁺ und PO₄³⁻-Koordinierung in DS6 Protomer A im Vergleich zu 4BX3 Protomer A

Mg²⁺-Koordinierung:		
funktionelle Gruppen der Aminosäuren	4BX3 Protomer A	DS6 Protomer A
Sauerstoff der Carbonylgruppe der Seitenkette von Asp234	2,1 Å (WBB)	2,1 Å (WBB)
Sauerstoff der Hydroxygruppe der Seitenkette von Asp234	3,3 Å	3,5 Å
Sauerstoff der Hydroxygruppe der Seitenkette von Asp25	2,2 Å (WBB)	2,1 Å (WBB)
Sauerstoff der Peptidkette von Asp27	2,2 Å (WBB)	2,1 Å (WBB)
Sauerstoff der Hydroxygruppe der Seitenkette von Asp239	4,1 Å	4,0 Å
Stickstoff der Peptidkette von Gly28	4,3 Å	4,3 Å
Methylgruppe von Val29	4,5 Å	4,6 Å
Stickstoff der Seitenkette von Lys209	5,2 Å	4,9 Å
PO₄³⁻-Koordinierung:		
funktionelle Gruppen der Aminosäuren	4BX3 Protomer A	DS6 Protomer A
Sauerstoff der Carbonylgruppe der Seitenkette von Asp25	2,2 Å (WBB)	2,5 Å (WBB)
Sauerstoff der Hydroxygruppe der Seitenkette von Asp25	3,0 Å (WBB)	3,1 Å (WBB)
Sauerstoff der Hydroxygruppe der Seitenkette von Asp27	3,0 Å (WBB)	2,5 Å (WBB)
Stickstoff der Peptidkette von Asp27	3,1 Å (WBB)	3,0 Å (WBB)
Sauerstoff der Peptidkette von Asp27	3,3 Å	3,1 Å (WBB)
Stickstoff der Peptidkette von Asn59	2,8 Å (WBB)	2,8 Å (WBB)
Hydroxygruppe von Ser58	3,0 Å (WBB)	2,9 Å (WBB)
Stickstoff der Seitenkette von Lys209	3,4 Å	2,9 Å (WBB)
Stickstoff der Peptidkette von Cys26	3,4 Å	3,5 Å
Stickstoff der Peptidkette von Asn60	3,6 Å	3,6 Å
Sauerstoff der Carbonylgruppe der Seitenkette von Asp234	4,3 Å	4,1 Å
Hydroxygruppe von Asp175	4,3 Å	4,2 Å
Sauerstoff der Peptidkette von Val57	4,5 Å	4,2 Å
Stickstoff des Imidazolrings von His178	5,1 Å	5,0 Å

(Gelistet sind die Abstände (in Ångström) von funktionellen Gruppen der angegebenen Aminosäuren von PDXP-Protomer A aus DS6 und 4BX3 zu Mg²⁺ respektive PO₄³⁻. WBB: Wasserstoffbrückenbindung)

Tabelle S2: Koordinierung von PLP in 2CFT

Abstand von	Asp25	Cys26	Asp27	Ser58	Asn59	Asn60	Arg62	Asp179	His182	Thr190	Lys213
4-Hydroxymethylgruppe*			4,6 Å zum Sauerstoff der Carbonylgruppe der Seitenkette			3,5 Å zum Stickstoff der Carbamoylgruppe (WBB)	4,7 Å zum sek. Stickstoff der Guanidingruppe		5,4 Å zum Imidazolring		
5-Hydroxygruppe						3,7 Å zum Stickstoff der Carbamoylgruppe; 4,3 Å zum Sauerstoff der Carbamoylgruppe	2,9 Å zum sek. Stickstoff der Guanidingruppe (WBB); 3,2 Å zum prim. Stickstoff der Guanidingruppe (WBB)		4,6 Å zum Imidazolring	5,0 Å zur Methylgruppe	
Pyridinring					5,0 Å zum Sauerstoff der Peptidkette	3,6 Å zum Stickstoff der Carbamoylgruppe; 4,0 Å zum Sauerstoff der Carbamoylgruppe	5,0 Å zum sek. Stickstoff der Guanidingruppe	5,2 Å zum Sauerstoff der Carbonylgruppe der Seitenkette	3,5 Å zum Imidazolring		
Phosphatrest	3,1 Å zum Sauerstoff der Carbonylgruppe der Seitenkette (WBB)	3,6 Å zum Stickstoff der Peptidkette	3,0 Å zum Stickstoff der Peptidkette (WBB)	2,6 Å zu OH-Gruppe (WBB)	2,8 Å zum Stickstoff der Peptidkette (WBB)	3,7 Å zum Stickstoff der Peptidkette		4,3 Å zum Sauerstoff der Carbonylgruppe der Seitenkette			2,9 Å zum Stickstoff der Seitenkette (WBB)

* In 2CFT befindet sich in 4'-Position von PLP anstelle der Formylgruppe eine Hydroxymethylgruppe.

(Gelistet sind die Abstände (in Ångström) von funktionellen Gruppen der angegebenen Aminosäuren von PDXP zu PLP aus 2CFT. WBB: Wasserstoffbrückenbindung)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dr. Antje Gohla. Bei ihr möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, ihre ausgezeichnete Betreuung und stetige Unterstützung und Förderung herzlichst bedanken. Ich bin froh, dass ich meine Doktorarbeit in der angenehmen und kollegialen Atmosphäre ihrer Arbeitsgruppe anfertigen durfte.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Elisabeth Jeanclos bedanken, die mich geduldig in das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt hat und deren freundliche Betreuung, fachlicher Rat und Hilfe für mich unentbehrlich waren. I think we had a good time working in the lab. Thank you.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Hermann Schindelin für die Mitbetreuung meiner Promotion und für die Durchführung der Proteinkristallisation und Strukturlösung in seiner Arbeitsgruppe. Dabei bedanke ich mich auch bei Frau Nicole Bader für die kompetente und unkomplizierte Umsetzung der Laborarbeit.

Darüber hinaus danke ich den Mitgliedern der AG Gohla Frau Kerstin Hadamek, Frau Martina Fischer und Frau Angelika Keller für die professionelle technische Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und Großeltern für die Unterstützung und Motivierung während des Studiums, des Promotionsvorhabens und in sämtlichen weiteren Belangen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Christoph Zink
Geburtsdatum, -ort 30. Oktober 1996, 83024 Rosenheim
E-Mail christoph.zink@gmx.de
Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

2002 - 2006 Heinrich Braun Grundschule Trostberg
2006 - 2014 Hertzthaimer Gymnasium Trostberg
2014 - 2019 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10/2016 - 10/2017 Förderung durch das Deutschlandstipendium
04/2017 Zahnärztliche Vorprüfung
11/2019 Zahnärztliche Prüfung
10/2020 Approbation als Zahnarzt

Promotion

01/2020 – 12/2020 Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg

Berufstätigkeit

Seit Januar 2021 Assistenz Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Dr. Schütz und Dr. Spanos in Sulzheim

Würzburg, den 03.07.2021

Christoph Zink

Ein Manuskript mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist in Vorbereitung. Ko-Erstautoren sind Dr. Elisabeth Jeanclos und Christoph Zink.