

**HEMMUNG DER MENSCHLICHEN PYRIDOXAL-KINASE DURCH
GINKGOTOXIN (4'-O-METHYLPYRIDOXIN)
AUS *GINKGO BILOBA* L..
EINE MÖGLICHE ERKLÄRUNG FÜR DIE KONVULSIVE
WIRKUNG VON GINKGOTOXIN.**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Uta Kästner

aus

Schwerin

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. E. Leistner
2. Referent: Prof. Dr. M. Gütschow

Tag der Promotion: 21.10.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIII
TABELLENVERZEICHNIS	XIX
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>GINKGO BILOBA</i> L.	1
1.1.1 THERAPEUTISCHER EINSATZ VON PRÄPARATEN AUS <i>GINKGO BILOBA</i> L.	1
1.1.2 KONVULSIVE UND ANTIKONVULSIVE WIRKUNG VON <i>GINKGO BILOBA</i> L.-EXTRAKTEN UND EXTRAKTBESTANDTEILEN	3
1.2 GINKGOTOXIN (4'-O-METHYLPYRIDOXIN), EIN STRUKTURANALOGON VON VITAMIN B ₆ IN <i>GINKGO BILOBA</i> L.	6
1.2.1 VORKOMMEN VON GINKGOTOXIN	6
1.2.2 GINKGOTOXIN IN ARZNEIMITTELN AUS <i>GINKGO BILOBA</i> L.	6
1.2.3 WIRKUNG VON GINKGOSAMEN	7
1.2.4 WIRKUNG VON GINKGOTOXIN	8
1.2.5 STRUKTURANALOGIE VON GINKGOTOXIN UND VITAMIN B ₆	10
1.3 VITAMIN B ₆	10
1.3.1 VITAMIN B ₆ ALS COFAKTOR	14
1.4 GINKGOTOXIN UND NEUROTRANSMITTER	16
1.4.1 EPILEPSIE UND NEUROTRANSMITTER	16
1.4.2 PYRIDOXIN-ABHÄNGIGE EPILEPSIE	18
1.4.3 BEEINFLUSSUNG DER GABA-KONZENTRATION DURCH GINKGOTOXIN	19
1.4.3.1 Direkte Beeinflussung der GABA-Bildung und des GABA-Abbaus	19
1.4.3.2 Indirekte Hemmung der GABA-Bildung durch Ginkgotoxin	19
1.4.3.3 Enzyme, die durch Ginkgotoxin inhibiert werden können	20
1.4.4 BISHER UNTERSUCHTE TARGETS DES GINKGOTOXINS	22
1.5 ZIELSETZUNG	23
2 MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 CHEMIKALIEN, ENZYME, LÖSUNGEN	27
2.1.1 CHEMIKALIEN	27
2.1.2 ENZYME, GRÖßENSTANDARDS UND REAGENZIENSÄTZE	29
2.1.3 PUFFER UND LÖSUNGEN	29
2.1.3.1 Puffer zur Isolierung von DNA	30
2.1.3.2 Puffer zur Transformation, Transfektion und Selektion von <i>Escherichia coli</i> und HEK-Zellen	30
2.1.3.3 Puffer für die DNA-Gelelektrophorese	30
2.1.3.4 Puffer für die automatische Sequenzierung	31
2.1.3.5 Puffer für die chromatographische Reinigung von Enzymen	31
2.1.3.6 Puffer für die Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.1.3.7 Lösungen für die Proteindetektion	32
2.1.3.8 Matrix für die MALDI-TOF-Analytik	33
2.1.4 NÄHRMEDIEN	33
2.1.5 ANTIBIOTIKA	33

2.1.6	VERBRAUCHSMATERIALIEN SOWIE MATERIAL FÜR DIE CHROMATOGRAPHIE UND DIE GELFILTRATION	34
2.2	LABOREINRICHTUNG	34
2.2.1	REINSTWASSERAUFBEREITUNG	34
2.2.2	STERILISATIONSMETHODEN	35
2.2.3	REINRAUMBEDINGUNGEN / LAMINAR AIRFLOW	35
2.2.4	SONSTIGE GERÄTE UND EINRICHTUNGEN	35
2.3	OLIGONUKLEOTIDE, PLASMIDE, BAKTERIENSTÄMME UND ZELLINIEN	36
2.3.1	OLIGONUKLEOTIDE	36
2.3.2	PLASMIDE	36
2.3.3	BAKTERIENSTÄMME	37
2.3.3.1	Kultivierung und Konservierung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	38
2.3.4	ZELLINIEN	38
2.4	METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE	39
2.4.1	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	39
2.4.2	REINIGUNG UND KONZENTRIERUNG VON DNA	39
2.4.3	HYDROLYTISCHE SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUCLEASEN	41
2.4.4	LIGATION	42
2.4.5	TRANSFORMATION VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> MIT PLASMID-DNA	42
2.4.5.1	Herstellung transformationskompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen mit der Methode nach Inoue et al. (1990)	43
2.4.5.2	Herstellung transformationskompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen mit der Rubidiumchloridmethode	43
2.4.5.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels Hitzeschockverfahren	44
2.4.6	TRANSFEKTIONSMETHODEN	45
2.4.6.1	Transfektion der HEK-Zellen	45
2.4.7	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	46
2.4.7.1	Reaktionsbedingungen für die PCR	47
2.4.8	KLONIERUNG DER PKH	48
2.4.8.1	Erzeugung des rekombinanten Vektors pMAL-c2X-PKH	49
2.4.8.2	Erzeugung des rekombinanten Vektors pET-11a-PKH	49
2.4.9	DNA-SEQUENZIERUNG	50
2.4.9.1	Sequenzierreaktion	51
2.4.9.2	Reinigung der Reaktionsprodukte der Sequenzierreaktionen	52
2.4.9.3	Trennung im Sequenziergel und Detektion	52
2.4.9.4	Computergestützte Analyse der Sequenzierdaten	53
2.5	METHODEN DER PROTEINCHEMIE	53
2.5.1	GEWINNUNG DER REKOMBINANTEN PYRIDOXAL-KINASE AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	53
2.5.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> -Zellen für die Proteinexpression	54
2.5.1.2	Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte aus <i>Escherichia coli</i>	54
2.5.1.2.1	Zellyse durch Ultraschall	55
2.5.1.3	Affinitätschromatographie Maltose-bindender Fusionsproteine	56
2.5.1.3.1	Hydrolyse des Maltose-bindenden Fusionsproteins mit der Protease Faktor Xa	57
2.5.1.4	Aufreinigung der nativen Pyridoxal-Kinase	57
2.5.1.4.1	Herstellung der Pyridoxal-Sepharose-Matrix	58
2.5.1.4.2	Affinitätschromatographie	58
2.5.1.4.3	Gelfiltration	59
2.5.2	ENZYMINKUBATIONEN	60
2.5.2.1	Untersuchungen zur Charakterisierung der rekombinanten Pyridoxal-Kinase	60
2.5.2.1.1	Untersuchung der Stabilität der Pyridoxal-Kinase	61
2.5.2.1.2	Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Enzymaktivität	61
2.5.2.1.3	Bestimmung des Temperatur-Optimums	61
2.5.2.1.4	Bestimmung des pH-Optimums	61

2.5.2.1.5	<i>Untersuchung des Einflusses verschiedener zweiwertiger Kationen auf die Enzymaktivität</i>	62
2.5.2.1.6	<i>Bestimmung des K_m-Wertes</i>	62
2.5.2.1.7	<i>Bestimmung der katalytischen Konstante und der Spezifitätskonstante</i>	63
2.5.2.2	Einfluss verschiedener Vitamin-B ₆ -Analoga auf die Enzymaktivität	63
2.5.2.2.1	<i>Bestimmung des K_i-Wertes</i>	63
2.6	ANALYTISCHE METHODEN	64
2.6.1	UV-SPEKTROMETRIE	64
2.6.1.1	Bestimmung der optischen Dichte zur Wachstumskontrolle von <i>Escherichia coli</i>	64
2.6.1.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	65
2.6.1.3	Proteinquantifizierung nach Bradford	65
2.6.1.4	Photometrischer Test zur Bestimmung von Pyridoxal-5'-phosphat in Inkubationsansätzen	65
2.6.1.5	Bestimmung des logP-Wertes von Pyridoxal und Ginkgotoxin	67
2.6.2	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	68
2.6.2.1	Native Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	68
2.6.2.2	Dokumentation der Agarose-Gelelektrophorese	69
2.6.2.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	69
2.6.3	DENATURIERENDE POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	70
2.6.3.1	Probenaufbereitung	71
2.6.3.2	Färbung von Proteingelen mit Coomassie blue	71
2.6.3.3	Färben von Proteingelen mit Silber	72
2.6.4	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE	72
2.6.5	HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE (HPLC)	73
2.6.6	MALDI-TOF	74
2.6.7	HYDROPHOBIZITÄTS-PLOT DER PYRIDOXAL-KINASE	75
2.6.8	DARSTELLUNG DER SUBSTRATBINDETASCHE DER PYRIDOXAL-KINASE	76
3	ERGEBNISSE	77
3.1	EXPRESSION UND REINIGUNG DER MENSCHLICHEN PYRIDOXAL-KINASE	77
3.1.1	EXPRESSION DER PYRIDOXAL-KINASE ALS MALTOSE-BINDENDEN FUSIONSPROTEIN MIT DEM REKOMBINANTEN STAMM XL1-BLUE MRF' KAN (pMAL-c2X-PKH)	77
3.1.1.1	Überprüfung der Klone des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH) durch Restriktionshydrolyse	78
3.1.1.2	Überprüfung der Klone des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH) auf Expression der Pyridoxal-Kinase	78
3.1.1.3	Überprüfung der Sequenz der Pyridoxal-Kinase im rekombinanten Vektor pMAL-c2X-PKH	80
3.1.1.4	Ermittlung der optimalen Expressionszeit des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH)	80
3.1.1.5	Aufreinigung des Maltose-bindenden Fusionsproteins	81
3.1.2	EXPRESSION DER PYRIDOXAL-KINASE ALS NATIVES PROTEIN MIT DEM REKOMBINANTEN STAMM BL21(DE3)(pET-11a-PKH)	82
3.1.2.1	Überprüfung der Klone des rekombinanten Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH) durch Restriktionshydrolyse	84
3.1.2.2	Überprüfung der Klone des rekombinanten Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH) auf Expression der nativen Pyridoxal-Kinase	84
3.1.2.3	Überprüfung der Sequenz der Pyridoxal-Kinase im rekombinanten Vektor BL21(DE3)(pET-11a-PKH)	85
3.1.2.4	Aufreinigung der Pyridoxal-Kinase als natives Protein	86
3.1.2.4.1	<i>Verteilung der Pyridoxal-Kinase auf die einzelnen Aufreinigungsfractionen</i>	86
3.1.2.4.2	<i>Aufreinigungsschema</i>	86
3.1.2.4.3	<i>Überprüfung der Reinigung der nativen Pyridoxal-Kinase mit SDS-PAGE</i>	87
3.1.2.4.4	<i>Untersuchung der menschlichen rekombinant exprimierten Pyridoxal-Kinase mittels MALDI-TOF</i>	88
3.1.3	EXPRESSION DER PYRIDOXAL-KINASE IN HEK-ZELLEN	89

3.2	ANALYTIK VON VITAMIN B ₆ UND STRUKTURANALOGA	90
3.2.1	PHOTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON PYRIDOXAL-5'-PHOSPHAT	90
3.2.1.1	Optimierung der Bedingungen für die photometrische Quantifizierung von Pyridoxal-5'-phosphat	91
3.2.2	QUANTIFIZIERUNG DER UMSETZUNG VON PYRIDOXAL UND STRUKTURANALOGA DURCH DIE PYRIDOXAL-KINASE ZU DEN 5'-PHOSPHATEN MITTELS HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIG-CHROMATOGRAPHIE	93
3.3	CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN MENSCHLICHEN PYRIDOXAL-KINASE	93
3.3.1	CHARAKTERISIERUNG DES MALTOSE-BINDENDEN FUSIONSPROTEINS	93
3.3.1.1	Vergleichende Aktivitätsmessungen der Rohextrakte des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X-PKH) und des Kontrollstammes XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X)	94
3.3.1.2	Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung des Maltose-bindenden Fusionsproteins	94
3.3.1.3	Untersuchung der Stabilität des Pyridoxal-Kinasefusionsproteins im Proteinrohextrakt	96
3.3.1.4	Photometrische Bestimmung des K _m -Wertes für Pyridoxal im Rohextrakt des Fusionsproteins	97
3.3.1.5	Einfluss der Abspaltung des Maltose-bindenden Proteins von dem Pyridoxal-Kinasefusionsprotein auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase	98
3.3.2	CHARAKTERISIERUNG DER NATIVEN PYRIDOXAL-KINASE	101
3.3.2.1	Charakterisierung der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt	101
3.3.2.1.1	<i>Vergleich der Aktivität des Kontrollstammes BL21(DE3)(pET-11a) mit der Aktivität des rekombinanten Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH) im Proteinrohextrakt</i>	101
3.3.2.1.2	<i>Expression der Pyridoxal-Kinase im Escherichia coli Stamm Rosetta(DE3)</i>	102
3.3.2.1.3	<i>Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung im Rohextrakt der nativen Pyridoxal-Kinase</i>	103
3.3.2.1.4	<i>Untersuchung der Stabilität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt</i>	104
3.3.2.1.5	<i>Bestimmung des pH-Optimums der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt</i>	105
3.3.2.1.6	<i>Bestimmung des Temperatur-Optimums der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt</i>	106
3.3.2.1.7	<i>Photometrische Bestimmung des K_m-Wertes für Pyridoxal im Rohextrakt der nativen Pyridoxal-Kinase</i>	106
3.3.2.2	Charakterisierung der nativen Pyridoxal-Kinase nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration	108
3.3.2.2.1	<i>Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Enzymaktivität der gereinigten Pyridoxal-Kinase</i>	108
3.3.2.2.2	<i>Untersuchung der Stabilität der gereinigten Pyridoxal-Kinase</i>	109
3.3.2.2.3	<i>Bestimmung des pH-Optimums der gereinigten Pyridoxal-Kinase</i>	110
3.3.2.2.4	<i>Bestimmung des Temperatur-Optimums der gereinigten Pyridoxal-Kinase</i>	111
3.3.2.2.5	<i>Untersuchung des Einflusses verschiedener zweiwertiger Kationen auf die Enzymaktivität der gereinigten Pyridoxal-Kinase</i>	112
3.3.2.2.6	<i>Photometrische Bestimmung des K_m-Wertes für Pyridoxal mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase</i>	113
3.3.2.2.7	<i>Bestimmung des K_m-Wertes der gereinigten Pyridoxal-Kinase mittels HPLC</i>	114
3.3.2.2.8	<i>Photometrische Bestimmung des K_m-Wertes für ATP mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase</i>	115
3.3.2.2.9	<i>Vergleich der Cosubstrateigenschaften von GTP und ATP</i>	116
3.3.2.2.10	<i>Untersuchung der Rückreaktion von Pyridoxal-5'-phosphat zu Pyridoxal</i>	117
3.4	EINFLUSS VERSCHIEDENER VITAMIN B ₆ -ANALOGA AUF DIE AKTIVITÄT DER MENSCHLICHEN PYRIDOXAL-KINASE	119
3.4.1	EINFLUSS VON GINKGOTOXIN AUF DIE AKTIVITÄT DER PYRIDOXAL-KINASE	119
3.4.1.1	Einfluss steigender Ginkgotoxin-Konzentrationen bei konstanter Pyridoxal-Konzentration auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung	119

3.4.1.1.1	<i>Einfluss von Ginkgotoxin auf die Aktivität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt</i>	119
3.4.1.1.2	<i>Einfluss von Ginkgotoxin auf die Aktivität der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase</i>	120
3.4.1.2	Einfluss steigender Pyridoxal-Konzentrationen auf die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Ginkgotoxin	122
3.4.1.2.1	<i>Untersuchung mit der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase</i>	122
3.4.2	EINFLUSS VON PYRIDOXIN AUF DIE AKTIVITÄT DER PYRIDOXAL-KINASE	123
3.4.2.1	Einfluss steigender Pyridoxin-Konzentrationen bei konstanter Pyridoxal-Konzentration auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung	123
3.4.2.1.1	<i>Einfluss von Pyridoxin auf die Aktivität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt</i>	123
3.4.2.2	Einfluss steigender Pyridoxal-Konzentrationen auf die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Pyridoxin	124
3.4.2.2.1	<i>Untersuchung im Rohextrakt der nativ exprimierten Pyridoxal-Kinase</i>	124
3.4.3	EINFLUSS VON DESOXYPYRIDOXIN AUF DIE AKTIVITÄT DER PYRIDOXAL-KINASE	125
3.4.3.1	Einfluss steigender Desoxyypyridoxin-Konzentrationen bei konstanter Pyridoxal-Konzentration auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung	125
3.4.3.1.1	<i>Einfluss von Desoxyypyridoxin auf die Aktivität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt</i>	125
3.4.3.1.2	<i>Einfluss von Desoxyypyridoxin auf die Aktivität der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase</i>	126
3.4.3.2	Einfluss steigender Pyridoxal-Konzentrationen auf die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Desoxyypyridoxin	127
3.4.3.2.1	<i>Untersuchung mit der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase</i>	127
3.4.4	GEGENÜBERSTELLUNG DES EINFLUSSES VERSCHIEDENER STRUKTURANALOGA DES PYRIDOXALS AUF DIE PYRIDOXAL-KINASE	127
3.4.5	BESTIMMUNG DER K_I-WERTE	129
3.4.5.1	Bestimmung des K_I -Wertes für Pyridoxin	130
3.4.5.1.1	<i>Bestimmung des K_I-Wertes für Pyridoxin im Proteinrohextrakt</i>	130
3.4.5.2	Bestimmung des K_I -Wertes für Desoxyypyridoxin	131
3.4.5.2.1	<i>Bestimmung des K_I-Wertes für Desoxyypyridoxin im Proteinrohextrakt</i>	131
3.4.5.2.2	<i>Bestimmung des K_I-Wertes für Desoxyypyridoxin an der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase</i>	133
3.4.6	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATEIGENSCHAFTEN VON GINKGOTOXIN	134
3.4.6.1	Untersuchung der Substrateigenschaften von Ginkgotoxin mittels Dünnschichtchromatographie	134
3.4.6.2	Untersuchung der Substrateigenschaft von Ginkgotoxin mittels HPLC	136
3.4.6.2.1	<i>Inkubation der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin und zeitabhängige Auftrennung der Reaktionsprodukte</i>	136
3.4.6.2.2	<i>Überprüfung der Bildung von Ginkgotoxin-5'-phosphat durch Behandlung des Inkubationsansatzes mit alkalischer Phosphatase</i>	137
3.4.6.3	Bestimmung der logP-Werte für Ginkgotoxin und Pyridoxal	138
3.4.7	BESTIMMUNG DER K_m-WERTE VON PYRIDOXIN, PYRIDOXAMIN, DESOXYPYRIDOXIN UND GINKGOTOXIN MITTELS HPLC	140
3.4.7.1	Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxin	140
3.4.7.2	Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxamin	141
3.4.7.3	Bestimmung des K_m -Wertes für Desoxyypyridoxin	143
3.4.7.4	Bestimmung des K_m -Wertes für Ginkgotoxin	144
3.4.7.5	Zusammenfassung aller K_m -, K_I - und V_{max} -Wert-Bestimmungen	145
3.4.7.6	Berechnung der katalytischen Konstanten	146
3.4.8	VERGLEICH DER REAKTIONSGESCHWINDIGKEITEN DER VITAMERE UND ANTIVITAMERE PRO MINUTE	147
3.4.9	UNTERSUCHUNG DER UMSETZUNG VON PYRIDOXAL DURCH DIE PYRIDOXAL-KINASE IN GEGENWART VON GINKGOTOXIN MITTELS HPLC	147
3.4.10	SUBSTRATHEMMUNG	150
3.4.10.1	Hemmung der gereinigten Pyridoxal-Kinase durch Pyridoxal	150
3.4.10.2	Hemmung der gereinigten Pyridoxal-Kinase durch Ginkgotoxin	151
3.4.10.3	Hemmung der gereinigten Pyridoxal-Kinase durch Desoxyypyridoxin	153

3.5	UNTERSUCHUNG DER STRUKTUR DER PYRIDOXAL-KINASE	154
3.5.1	HYDROPHOBIZITÄTS-PLOT DER PYRIDOXAL-KINASE	154
3.5.2	RÄUMLICHE STRUKTUR DER PYRIDOXAL-KINASE	154
3.5.3	DARSTELLUNG DER SUBSTRATBINDETASCHE DER PYRIDOXAL-KINASE	155
4	DISKUSSION	157
4.1	KONVULSIVE WIRKUNG VON GINKGOTOXIN UND MÖGLICHE KONVULSIVE NEBENWIRKUNGEN VON <i>GINKGO BILOBA</i> L.-EXTRAKTEN	157
4.2	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM COFAKTOR PYRIDOXAL-5'-PHOSPHAT, GABA, GLUTAMAT UND DEM AUFTRETEN VON EPILEPTISCHEN ANFÄLLEN	159
4.2.1	MÖGLICHE ANGRIFFSPUNKTE VON GINKGOTOXIN UND <i>GINKGO BILOBA</i> L.-EXTRAKTEN	163
4.3	PYRIDOXAL-KINASE	164
4.3.1	DIE PYRIDOXAL-KINASE DES MENSCHEN	164
4.3.2	HETEROLOGE EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG DER PYRIDOXAL-KINASE	166
4.3.2.1	Expression als Maltose-bindendes Fusionsprotein	166
4.3.2.2	Expression und Charakterisierung der nativen Pyridoxal-Kinase	167
4.3.3	INKUBATIONEN DER PYRIDOXAL-KINASE MIT VITAMIN B ₆ UND ERMITTLUNG DER KINETISCHEN KONSTANTEN	170
4.4	INKUBATIONEN DER PYRIDOXAL-KINASE MIT VITAMIN B ₆ -ANTIVITAMINEN	173
4.5	ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN UND AUSBLICK	176
5	ZUSAMMENFASSUNG	181
6	LITERATURVERZEICHNIS	183
7	ANHANG	199
7.1	SEQUENZEN	199
7.1.1	SEQUENZ DES REKOMBINANTEN VEKTORS pMAL-c2X-PKH	199
7.1.2	SEQUENZ DES REKOMBINANTEN VEKTORS pET-11A-PKH	200
7.1.3	SEQUENZ DES REKOMBINANTEN VEKTORS pCDM8-PKH	202
7.2	KARTEN DER VERWENDETEN VEKTOREN	202
7.2.1	KARTE DES VEKTORS pMAL-c2X	202
7.2.2	KARTE DES VEKTORS pET-11A	202
7.3	KARTEN DER REKOMBINANTEN VEKTOREN	202
7.3.1	KARTE DES REKOMBINANTEN PLASMIDES pMAL-c2X-PKH	202
7.3.2	KARTE DES REKOMBINANTEN PLASMIDES pET-11A-PKH	203
7.4	UV-VIS-SPEKTREN	204
7.4.1	UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXAL	204
7.4.2	UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXAL IN <i>n</i> -OCTANOL GESÄTTIGTEM WASSER	204
7.4.3	UV-VIS-SPEKTRUM VON EINER FRISCHEN PYRIDOXAL-5'-PHOSPHAT-LÖSUNG	205
7.4.4	UV-VIS-SPEKTRUM VON EINER 24 STUNDEN ALTEN PYRIDOXAL-5'-PHOSPHAT-LÖSUNG	205

7.4.5	UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXAMIN	206
7.4.6	UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXAMIN-5'-PHOSPHAT	206
7.4.7	UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXIN	207
7.4.8	UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXIN-5'-PHOSPHAT	207
7.4.9	UV-VIS-SPEKTRUM VON DESOXYPYRIDOXIN	208
7.4.10	UV-VIS-SPEKTRUM VON DESOXYPYRIDOXIN-5'-PHOSPHAT	208
7.4.11	UV-VIS-SPEKTRUM VON GINGGOTOXIN	209
7.4.12	UV-VIS-SPEKTRUM VON GINGGOTOXIN IN N-OCTANOL GESÄTTIGTEM WASSER	209
7.4.13	UV-VIS-SPEKTRUM VON GINGGOTOXIN-5'-PHOSPHAT	210
7.5	HPLC-CHROMATOGRAMME	210
7.5.1	HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXAL	210
7.5.2	HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXAL-5'-PHOSPHAT	211
7.5.3	HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXAMIN	211
7.5.4	HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXAMIN-5'-PHOSPHAT	212
7.5.5	HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXIN	212
7.5.6	HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXIN-5'-PHOSPHAT	213
7.5.7	HPLC-CHROMATOGRAMM VON DESOXYPYRIDOXIN	213
7.5.8	HPLC-CHROMATOGRAMM VON DESOXYPYRIDOXIN-5'-PHOSPHAT	214
7.5.9	HPLC-CHROMATOGRAMM VON GINGGOTOXIN	214
7.5.10	HPLC-CHROMATOGRAMM VON GINGGOTOXIN-5'-PHOSPHAT	215
7.5.11	HPLC-CHROMATOGRAMM DES FLIEßMITTELS	215
7.6	HERSTELLERANGABEN	216
7.6.1	QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT, QIAGEN	216
7.6.2	ABI-PRISM™ 377 GELSYSTEM, APPLIED BIOSYSTEMS	216
7.6.3	pMAL™ PROTEIN FUSION AND PURIFICATION SYSTEM, NEW ENGLAND BIOLABS	216
7.6.4	EAH-SEPHAROSE 4B, AMERSHAM BIOSCIENCES	216
7.6.5	SEPHADEX G15, AMERSHAM BIOSCIENCES	216

Abkürzungsverzeichnis

ΔA	Absorptionsänderung
ΔT	Schmelztemperatur von Oligonukleotiden in °C
°C	Grad Celsius
μ	mikro-
A	Absorption oder Ampere
AC	Accession Number
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz Gen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATTC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BV	Blutvolumen
Da	Dalton (entspricht 1/12 Masse von ¹² C)
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	2'-Desoxycytosintriphosphat
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat-Gemisch (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP zu gleichen Teilen)
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP und dTTP zu gleichen Teilen)
DPN	Desoxypyridoxin
DPNP	Desoxypyridoxin-5'-phosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
EC	Enzyme Community, Gesellschaft zur Klassifizierung von Enzymen
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat

EPN	Ethoxypyridoxin
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G418	Geneticin ^R
GABA	γ -Aminobuttersäure
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
His	Histidin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HMW	High molecular weight
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
I	Inhibitor
Ile	Isoleucin
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
isoPPN	iso-Propoxyypyridoxin
Kanr	Kanamycin-Resistenz Gen
kb	Kilobasen, entspricht 1000 Basenpaaren
kDa	Kilo-Dalton = 1000 Dalton
K _i	Inhibitorkonstante
K _{iapp}	apparenter K _i -Wert
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
lacI	lac Repressor-Gen
lacPOZ'	β -Galactosidase-Gen (α -Fragment)
LB	Luria Bertani
LB-PenG ₁₀₀	LB-Medium mit 100 μ g/ml Penicillin G
m	Masse, Meter oder milli-
M	Mol pro Liter
m/m	Verhältnis Masse zu Masse
m/V	Verhältnis Masse zu Volumen
mA	Milliampere
Maldi-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MBP	Maltose-bindendes Protein
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure

min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPN	4'-O-Methylpyridoxin (Ginkgotoxin)
MPNP	Ginkgotoxin-5'-phosphat
n	nano-
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
OD_{λ}	optische Dichte bei der Wellenlänge λ
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PenG	Penicillin G
pH	Negativer dekatischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
PKH	menschliche Pyridoxal-Kinase
PL	Pyridoxal
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PM	Pyridoxamin
PMP	Pyridoxamin-5'-phosphat
PN	Pyridoxin
PNP	Pyridoxin-5'-phosphat
$P_{O/W}$	Verteilungskoeffizient zwischen lipophiler und hydrophiler Phase
ppm	Teile je Million Teile (parts per million)
PPN	Propoxyypyridoxin
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S	Substratkonzentration
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
tgl.	täglich
Thr	Threonin
Tm	Schmelztemperatur der Oligonukleotide in °C
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin

u	unit
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V/V	Volumenprozent
Val	Valin
v_i	initiale Reaktionsgeschwindigkeit
Vis	sichtbares Licht
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v_s	Steady-State Reaktionsgeschwindigkeit
VT	Volumenteile

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Strukturformeln von Ginkgotoxin (4'-O-Methylpyridoxin, MPN), den Vitameren der B ₆ -Gruppe und den jeweils korrespondierenden 5'-Phosphateestern	S. 10
Abbildung 1.2	"Salvage Pathway"	S. 11
Abbildung 1.3	Reaktionen eines Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzyms mit einer Aminosäure	S. 15
Abbildung 1.4	Glutamat- und GABA-Kreislauf im menschlichen Gehirn	S. 17
Abbildung 1.5	Mögliche Angriffspunkte von Ginkgotoxin	S. 22
Abbildung 2.1	Reaktionsschema zur Umsetzung von Pyridoxal zu Pyridoxal-5'-phosphat	S. 66
Abbildung 3.1	Ausschnitt aus dem Polylinker des rekombinanten Vektors pMAL-c2X-PKH	S. 77
Abbildung 3.2	SDS-PAGE zur Überprüfung der Pyridoxal-Kinaseexpression fünf verschiedener Klone des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X-PKH) und der Kontrolle XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X)	S. 79
Abbildung 3.3	SDS-PAGE zur Ermittlung der optimalen Expressionszeit des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X-PKH)	S. 81
Abbildung 3.4	Aufreinigung des Maltose-bindenden Fusionsproteins	S. 82
Abbildung 3.5	Ausschnitt aus dem Polylinker des rekombinanten Vektors pET-11a-PKH	S. 83
Abbildung 3.6	SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression der Pyridoxal-Kinase von Klon T1/7 [BL21(DE3)(pET-11a-PKH)]	S. 84
Abbildung 3.7	Verteilung der Pyridoxal-Kinase auf die einzelnen Fraktionen nach Affinitätschromatographie	S. 86
Abbildung 3.8	SDS-PAGE der in Escherichia coli (BL21(DE3)(pET-11a-PKH)) überexprimierten nativen Pyridoxal-Kinase.	S. 88
Abbildung 3.9	Abbildung des MALDI-TOF-Spektrums der gereinigten Pyridoxal-Kinase	S. 89
Abbildung 3.10	SDS-PAGE von Proben der in HEK-293(pCDM8-PKH)-Zellen exprimierten Pyridoxal-Kinase und einer Kontrolle (HEK-293-Zellen ohne PKH-Gen)	S. 90
Abbildung 3.11a	Absorptionsänderung von Pyridoxal	S. 91
Abbildung 3.11b	Absorptionsänderung durch den enzymatischen Umsatz von Pyridoxal zu Pyridoxal-5'-phosphat	S. 91
Abbildung 3.12	Vergleich der enzymunabhängigen Phosphorylierung von Pyridoxal in Kaliumphosphat- und MES-Puffer	S. 92

Abbildung 3.13	Vergleich der Pyridoxal-Kinaseaktivität des Rohextraktes des Kontrollstammes XL1-Blue MRF'Kan (pMAL-c2X) mit der Aktivität des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF'Kan (pMAL-c2X-PKH)	S. 94
Abbildung 3.14	Abhängigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung von der eingesetzten Menge Proteinrohextrakt und der Zeit	S. 95
Abbildung 3.15	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Menge Proteinrohextrakt	S. 95
Abbildung 3.16	Untersuchung der Stabilität des Pyridoxal-Kinasefusionsprotein im Proteinrohextrakt	S. 96
Abbildung 3.17	Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Rohextrakt der als Fusionsprotein überexprimierten Pyridoxal-Kinase	S. 97
Abbildung 3.18	Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Rohextrakt der als Fusionsprotein überexprimierten Pyridoxal-Kinase	S. 98
Abbildung 3.19	SDS-PAGE zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit des Fusionsproteins mit Faktor Xa zur Abspaltung des Maltosebindenden Proteins von der Pyridoxal-Kinase	S. 99
Abbildung 3.20	Aktivität der Pyridoxal-Kinase in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer mit Faktor Xa, Pyridoxal-Konzentration im Ansatz: 1,0 mM	S. 99
Abbildung 3.21	Aktivität der Pyridoxal-Kinase in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer mit Faktor Xa, Pyridoxal-Konzentration im Ansatz: 4,0 mM	S. 100
Abbildung 3.22	Vergleich der Pyridoxal-Kinaseaktivität im Rohextrakt des Kontrollstammes BL21(DE3)(pET-11a) mit den Aktivitäten der Klone T1/7 und T1/13 des rekombinanten Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH)	S. 102
Abbildung 3.23	Abhängigkeit der Aktivität des Proteinrohextraktes von der Expressionszeit im Stamm Rosetta(DE3)(pET11a-PKH)	S. 103
Abbildung 3.24	Abhängigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung von der eingesetzten Menge Proteinrohextrakt	S. 104
Abbildung 3.25	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Menge Proteinrohextrakt	S. 104
Abbildung 3.26	Untersuchung der Stabilität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt	S. 105
Abbildung 3.27	Bestimmung des pH-Optimums des Rohextraktes der nativen Pyridoxal-Kinase	S. 105
Abbildung 3.28	Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Proteinrohextrakt der nativ überexprimierten Pyridoxal-Kinase	S. 107
Abbildung 3.29	Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Proteinrohextrakt der nativ überexprimierten Pyridoxal-Kinase	S. 107

Abbildung 3.30	Abhängigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung von der eingesetzten Pyridoxal-Kinase-Menge	S. 108
Abbildung 3.31	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Pyridoxal-Kinase-Menge	S. 109
Abbildung 3.32	Untersuchung der Stabilität der gereinigten Pyridoxal-Kinase	S. 110
Abbildung 3.33	Bestimmung des pH-Optimums der gereinigten Pyridoxal-Kinase	S. 110
Abbildung 3.34	Bestimmung des Temperatur-Optimums der gereinigten Pyridoxal-Kinase	S. 111
Abbildung 3.35	Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase	S. 112
Abbildung 3.36	Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase	S. 113
Abbildung 3.37	Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase	S. 114
Abbildung 3.38	Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal der gereinigten Pyridoxal-Kinase mittels HPLC	S. 115
Abbildung 3.39	Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal der gereinigten Pyridoxal-Kinase mittels HPLC	S. 115
Abbildung 3.40	Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für ATP der gereinigten Pyridoxal-Kinase	S. 116
Abbildung 3.41	Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für ATP der gereinigten Pyridoxal-Kinase	S. 116
Abbildung 3.42	Darstellung der unterschiedlichen Cosubstrateigenschaften von ATP und GTP	S. 117
Abbildung 3.43	Untersuchung der Rückreaktion in Anwesenheit von ATP und in Anwesenheit ADP	S. 118
Abbildung 3.44	Einfluss von Ginkgotoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal im Proteinrohextrakt des Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH)	S. 120
Abbildung 3.45	Einfluss von Ginkgotoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal durch die gereinigte Pyridoxal-Kinase des Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH)	S. 121
Abbildung 3.46	Aufhebung des Einflusses von Ginkgotoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch Pyridoxal	S. 122
Abbildung 3.47	Einfluss von Pyridoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal im Proteinrohextrakt des Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH)	S. 123
Abbildung 3.48	Aufhebung des Einflusses von Pyridoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat	S. 124
Abbildung 3.49	Einfluss von Desoxypyridoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal im Proteinrohextrakt des Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH)	S. 125
Abbildung 3.50	Einfluss von Desoxypyridoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal durch die gereinigte Pyridoxal-Kinase	S. 126

Abbildung 3.51	Aufhebung der Desoxypyridoxin-Wirkung auf die Pyridoxal-Kinase durch steigende Pyridoxal-Konzentrationen	S. 127
Abbildung 3.52	Einfluss von Desoxypyridoxin, Pyridoxin und Ginkgotoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch die Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt	S. 128
Abbildung 3.53	Einfluss von Desoxypyridoxin, Pyridoxin, Pyridoxamin und Ginkgotoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch die gereinigte Pyridoxal-Kinase	S. 128
Abbildung 3.54	Bestimmung des K_i -Wertes für Pyridoxin, Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die InhibitorKonzentration	S. 130
Abbildung 3.55	Bestimmung des K_i -Wertes für Pyridoxin, Hemm-Diagramm nach Dixon	S. 131
Abbildung 3.56	Bestimmung des K_i -Wertes für Desoxypyridoxin im Proteinrohextrakt, Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die InhibitorKonzentration	S. 132
Abbildung 3.57	Bestimmung des K_i -Wertes für Desoxypyridoxin im Proteinrohextrakt, Hemm-Diagramm nach Dixon	S. 132
Abbildung 3.58	Bestimmung des K_i -Wertes für Desoxypyridoxin mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase, Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die InhibitorKonzentration	S. 133
Abbildung 3.59	Bestimmung des K_i -Wertes für Desoxypyridoxin mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase, Hemm-Diagramm nach Dixon	S. 133
Abbildung 3.60	Dünnschichtchromatogramm zur Überprüfung der Ginkgotoxinumsetzung durch die Pyridoxal-Kinase	S. 135
Abbildung 3.61	HPLC-Chromatogramme der Inkubationsansätze der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin	S. 136
Abbildung 3.62	HPLC Chromatogramm nach 5 minütiger Inkubation der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin	S. 137
Abbildung 3.63	HPLC Chromatogramm nach 60 minütiger Inkubation der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin	S. 137
Abbildung 3.64	HPLC Chromatogramm nach 5 minütiger Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem durch die Pyridoxal-Kinase gebildeten Ginkgotoxin-5'-phosphat	S. 138
Abbildung 3.65	HPLC Chromatogramm nach 60 minütiger Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem durch die Pyridoxal-Kinase gebildeten Ginkgotoxin-5'-phosphat	S. 138
Abbildung 3.66	Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxin	S. 141
Abbildung 3.67	Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxin	S. 141
Abbildung 3.68	Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxamin	S. 142
Abbildung 3.69	Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxamin	S. 142

Abbildung 3.70	Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Desoxypyridoxin	S. 143
Abbildung 3.71	Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Desoxypyridoxin	S. 143
Abbildung 3.72	Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Ginkgotoxin	S. 144
Abbildung 3.73	Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes von Ginkgotoxin	S. 144
Abbildung 3.74	Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der Vitamere und Antivitamere pro Minute	S. 147
Abbildung 3.75	Umsatz von Ginkgotoxin und Pyridoxal (jeweils 0,025 mM) in separaten Inkubationen	S. 148
Abbildung 3.76	Coinkubation der Pyridoxal-Kinase mit Pyridoxal (0,025 mM) und Ginkgotoxin (0,025 mM)	S. 149
Abbildung 3.77	Coinkubation der Pyridoxal-Kinase mit Pyridoxal (0,025 mM) und Ginkgotoxin (0,0125 mM)	S. 149
Abbildung 3.78	Direkte Darstellung der Substrathemmung für Pyridoxal	S. 151
Abbildung 3.79	Doppel-reziproke Darstellung der Substrathemmung für Pyridoxal	S. 151
Abbildung 3.80	Direkte Darstellung der Substrathemmung für Ginkgotoxin	S. 152
Abbildung 3.81	Doppel-reziproke Darstellung der Substrathemmung für Ginkgotoxin	S. 152
Abbildung 3.82	Direkte Darstellung der Substrathemmung für Desoxypyridoxin	S. 153
Abbildung 3.83	Doppel-reziproke Darstellung der Substrathemmung für Desoxypyridoxin	S. 153
Abbildung 3.84	Hydrophobizitäts-Plot der menschlichen Pyridoxal-Kinase nach Kyte und Doolittle	S. 154
Abbildung 3.85	Räumliche Darstellung der menschlichen Pyridoxal-Kinase	S. 155
Abbildung 3.86	Räumliche Darstellung der Pyridoxal-Kinase (SWISS-MODEL Repository)	S. 155
Abbildung 3.87	Computermodell der Substratbindetasche der menschlichen Pyridoxal-Kinase mit den gebildeten Produkten Pyridoxin-5'-phosphat/Ginkgotoxin-5'-phosphat und ADP	S. 156
Abbildung 4.1	Aminosäurevergleich der drei beim Menschen gefundenen Isoformen der Pyridoxal-Kinase	S. 165
Abbildung 7.1	Sequenz des rekombinanten Vektors pMAL-c2X-PKH	S. 200
Abbildung 7.2	Sequenz des rekombinanten Vektors pET-11a-PKH	S. 201
Abbildung 7.3	Karte des rekombinanten Plasmides pMAL-c2X-PKH.	S. 202
Abbildung 7.4	Karte des rekombinanten Plasmides pET-11a-PKH.	S. 203
Abbildung 7.5	UV-Vis-Spektrum von Pyridoxal	S. 204
Abbildung 7.6	UV-Vis-Spektrum von Pyridoxal in n-Octanol gesättigtem Wasser	S. 204

Abbildung 7.7	UV-Vis-Spektrum von einer frischen Pyridoxal-5'-phosphat-Lösung	S. 205
Abbildung 7.8	UV-Vis-Spektrum von einer 24 Stunden alten Pyridoxal-5'-phosphat-Lösung	S. 205
Abbildung 7.9	UV-Vis-Spektrum von Pyridoxamin	S. 206
Abbildung 7.10	UV-Vis-Spektrum von Pyridoxamin-5'-phosphat	S. 206
Abbildung 7.11	UV-Vis-Spektrum von Pyridoxin	S. 207
Abbildung 7.12	UV-Vis-Spektrum von Pyridoxin-5'-phosphat	S. 207
Abbildung 7.13	UV-Vis-Spektrum von Desoxypyridoxin	S. 208
Abbildung 7.14	UV-Vis-Spektrum von Desoxypyridoxin-5'-phosphat	S. 208
Abbildung 7.15	UV-Vis-Spektrum von Ginkgotoxin	S. 209
Abbildung 7.16	UV-Vis-Spektrum von Ginkgotoxin in n-Octanol gesättigtem Wasser	S. 209
Abbildung 7.17	UV-Vis-Spektrum von Ginkgotoxin-5'-phosphat	S. 210
Abbildung 7.18	HPLC-Chromatogramm von Pyridoxal	S. 210
Abbildung 7.19	HPLC-Chromatogramm von Pyridoxal-5'-phosphat	S. 211
Abbildung 7.20	HPLC-Chromatogramm von Pyridoxamin	S. 211
Abbildung 7.21	HPLC-Chromatogramm von Pyridoxamin-5'-phosphat	S. 212
Abbildung 7.22	HPLC-Chromatogramm von Pyridoxin	S. 212
Abbildung 7.23	HPLC-Chromatogramm von Pyridoxin-5'-phosphat	S. 213
Abbildung 7.24	HPLC-Chromatogramm von Desoxypyridoxin	S. 213
Abbildung 7.25	HPLC-Chromatogramm von Desoxypyridoxin-5'-phosphat	S. 214
Abbildung 7.26	HPLC-Chromatogramm von Ginkgotoxin	S. 214
Abbildung 7.27	HPLC-Chromatogramm von Ginkgotoxin-5'-phosphat	S. 215
Abbildung 7.28	HPLC-Chromatogramm des Fließmittels	S. 215

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen	S. 29
Tabelle 2.2	Enzyme, Molekulargewichtsstandards und Reagenziensätze	S. 29
Tabelle 2.3	Puffer zur Isolierung von DNA	S. 30
Tabelle 2.4	Puffer zur Transformation, Transfektion und Selektion von <i>Escherichia coli</i> und HEK-Zellen	S. 30
Tabelle 2.5	Puffer für die DNA-Gelelektrophorese	S. 31
Tabelle 2.6	Puffer für die automatische Sequenzierung	S. 31
Tabelle 2.7	Puffer für die chromatographische Reinigung von Enzymen	S. 32
Tabelle 2.8	Puffer für die Protein-Gelelektrophorese	S. 32
Tabelle 2.9	Lösungen für die Proteindetektion	S. 33
Tabelle 2.10	Matrix für die MALDI-TOF-Analytik	S. 33
Tabelle 2.11	Nährmedien	S. 33
Tabelle 2.12	Antibiotika	S. 34
Tabelle 2.13	Materialien für Chromatographie und Verbrauchsmaterialien	S. 34
Tabelle 2.14	sonstige Geräte und Einrichtungen	S. 36
Tabelle 2.15	Oligonukleotide ("Primer")	S. 36
Tabelle 2.16	verwendete Plasmide	S. 37
Tabelle 2.17	rekombinante Plasmide	S. 37
Tabelle 2.18	Mikroorganismen	S. 37
Tabelle 2.19	rekombinante Mikroorganismen	S. 38
Tabelle 3.1	Aufreinigungsschema	S. 87
Tabelle 3.2	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit des Pyridoxal-Kinasefusionsproteins mit Faktor Xa.	S. 100
Tabelle 3.3	Photometrisch bestimmte K_m - und V_{max} -Werte für Pyridoxal und ATP.	S. 145
Tabelle 3.4	Mittels HPLC bestimmte K_m - und V_{max} -Werte für die gereinigte Pyridoxal-Kinase.	S. 145
Tabelle 3.5	Photometrisch bestimmte K_i -Werte für Pyridoxin und Desoxy-pyridoxin.	S. 146
Tabelle 3.6	k_{cat} -Werte für die untersuchten Substrate der Pyridoxal-Kinase	S. 147
Tabelle 4.1	Ginkgotoxin-Konzentration in Arzneimitteln	S. 158
Tabelle 4.2	Tagesdosen Tebonin forte [®] zum Erreichen toxischer Ginkgotoxin-Plasmaspiegel	S. 158
Tabelle 4.3	Vergleich der enzymkinetischen Parameter des Fusionsproteins mit denen des nativen Enzym	S. 166
Tabelle 4.4	Gegenüberstellung der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte für K_m , V_{max} , k_{cat} und k_{cat}/K_m der menschlichen Pyridoxal-Kinase	S. 170
Tabelle 4.5	Vergleich der für die menschliche Pyridoxal-Kinase ermittelten K_m -Werte	S. 171

Tabelle 4.6	Mögliche posttranslationale Modifikationen der Pyridoxal-Kinase	S. 172
Tabelle 4.7	Vergleich der enzymkinetischen Parameter von Vitamin B ₆ mit den Parametern von Ginkgotoxin und Desoxypyridoxin	S. 173

1 Einleitung

1.1 *Ginkgo biloba* L.

Ginkgo biloba L. aus der Familie der *Ginkgoaceae* ist der einzige heute noch lebende Vertreter einer Klasse von Nacktsamern, der *Ginkgoatae*. Diese Klasse ist bis ins Unterperm (vor circa 270 Millionen Jahren) nachgewiesen, reicht aber wahrscheinlich bis ins Oberdevon (vor circa 360 Millionen Jahren). Im Jura (vor circa 140 Millionen Jahren) war *Ginkgo biloba* L. am weitesten verbreitet und umfasste etwa 15 Gattungen und insgesamt circa 60 Arten (Melzheimer, 1992). Seine enorme Widerstandskraft und seine Beliebtheit als Kulturbaum in Ostasien haben ihn vor dem Aussterben bewahrt. Der auch als "lebendes Fossil" bezeichnete Baum stammt ursprünglich aus China und Japan und wurde dort als Tempelbaum kultiviert. Seit Mitte des 18. Jahrhunderts findet man ihn auch als Parkbaum in Europa (Teuscher, 1997; Wichtl et al., 2002). Wahrscheinlich wurde der erste Baum in Europa um 1730 in Utrecht, Holland, gepflanzt (Müller, 1992). Weitere Bezeichnungen für *Ginkgo biloba* L. sind beispielsweise: Elefantenoherbaum, Entenfußbaum (chinesisch: Ya Chio), Fächerblattbaum, Mädchenhaarbaum (Maidenhair tree), Tempelbaum und Silberaprikose (japanisch: Gin kyo) (Hänsel et al., 1993).

1.1.1 THERAPEUTISCHER EINSATZ VON PRÄPARATEN AUS *GINKGO BILOBA* L.

In der traditionellen chinesischen Medizin werden Samenkerne von *Ginkgo biloba* L. bei Asthma, Tuberkulose, Enuresis (Bettnässen), Leukorrhoe (übermäßiger Fluor albus) und Polyurie (Ausscheidung eines pathologisch erhöhten Harnvolumens) eingesetzt. Es werden pro Tag 6 bis 9 g Samen als Tee eingenommen. Die Blätter selbst werden außerdem bei Asthma, Bluthochdruck, Tinnitus (Ohrgeräusche) und Angina pectoris (Koronarinsuffizienz) angewendet. Der Tagesdosis entsprechen 3 bis 6 g Blätter als Infus oder als Decoct zur Inhalation bei Asthma. Im Sinne der naturwissenschaftlich orientierten Medizin ist die Wirksamkeit bei den oben genannten Indikationen nicht belegt (Hänsel et al., 1993). In der westlichen Medizin wird *Ginkgo biloba* L. wegen der in den Blättern enthaltenen pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffe, den Flavonoidderivaten (Flavonglycoside, Proanthocyanidine) und Terpenen (Ginkgolide A, B, C, J und Bilobalid) therapeutisch angewendet. Der Blatttrockenextrakt wird auf 24 % Ginkgoflavonglykoside und 6 % Terpenlactone (davon 3,1 % Ginkgolid A, B, C und 2,9 % Bilobalid) eingestellt. Der Gehalt an Ginkgolsäure ist auf weniger als 5 ppm begrenzt, da sie Kontaktallergien auslöst. Der so definierte Extrakt wird als EGb 761 bezeichnet (Hänsel et al., 1993).

Die einzelnen Inhaltsstoffen haben unterschiedliche Wirkungen.

- Die Ginkgolide sind im *in vitro*-Versuch Antagonisten des Blutplättchenaktivierenden Faktors (PAF), einem starken Entzündungsmediator. Sie reduzieren die Plättchenaktivierung und -aggregation und verbessern dadurch die rheologischen Eigenschaften des Blutes und somit die Blutzirkulation.
- Die Flavonoide und die Proanthocyanidine fördern die Gefäßerweiterung, da sie als Radikalfänger die Bildung des Prostacyclins begünstigen. Weiterhin wird der "endothelium derived relaxing factor" (EDRF) stimuliert, daraus resultiert eine verbesserte Blutzirkulation. Toxische Sauerstoffradikale werden inaktiviert und die Lipidperoxidation wird gehemmt.
- Bilobalid, ein Sesquiterpen, reduziert die cerebrale Ödembildung. Die erhöhte Blutzirkulation führt zu einem erhöhten Sauerstoff- und Glucosetransport zum Gehirn nach einem ischämischen Geschehen.

Der Extrakt EGb 761 inhibiert die β -Amyloid-Aggregation, die sehr wahrscheinlich an der Entstehung der Alzheimer-Krankheit beteiligt ist. Er fördert unter anderem die Durchblutung des Gehirns und der Peripherie, erhöht insbesondere die Hypoxietoleranz des Hirngewebes, hemmt die Entwicklung von Hirnödemen, verzögert die altersbedingte Reduktion von muscarinerg-cholinergen Rezeptoren sowie von α_2 -Rezeptoren im Hippokampus und steigert das Lernvermögen und die Gedächtnisleistungen (Oberpichler-Schwenk und Krieglstein, 1992; Hänsel et al., 1993; Teuscher, 1997; Ahlemeyer und Krieglstein, 2003; Chatterjee, 2003; DeFeudis, 2003; Eckert et al., 2003; Le Bars, 2003a; Le Bars, 2003b; Smith und Luo, 2004; Stromgaard und Nakanishi, 2004).

Die aus dem *Ginkgo biloba* L.-Blätter-Trockenextrakt hergestellten Arzneimittel sind oft für die folgenden Indikationen zugelassen:

- Symptomatische Behandlung von hirnorganisch bedingten Leistungsstörungen im Rahmen eines therapeutischen Gesamtkonzeptes bei dementiellen Syndromen mit der Leitsymptomatik: Gedächtnisstörungen, Konzentrationsstörungen, depressive Verstimmung, Schwindel, Ohrensausen, Kopfschmerzen,
- Verlängerung der schmerzfreien Gehstrecke bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit im Stadium II nach FONTAINE (Claudicatio intermittens) im Rahmen physikalisch-therapeutischer Maßnahmen, insbesondere Gehtraining und
- Vertigo vaskulärer und involutiver Genese und als adjuvante Therapie bei Tinnitus vaskulärer und involutiver Genese.

Die Dosierung erfolgt folgendermaßen:

- Dementielles Syndrom:
Erwachsene und Heranwachsende ab 12 Jahre nehmen auf 2 bis 3 Einnahmen verteilt täglich 120 bis 240 mg *Ginkgo biloba* L.-Trockenextrakt pro Tag ein.
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit, Vertigo, als Adjuvans bei Tinnitus:
Erwachsene und Heranwachsende ab 12 Jahre nehmen auf 2 bis 3 Einnahmen verteilt täglich 120 bis 160 mg *Ginkgo biloba* L.-Trockenextrakt pro Tag ein.

Vorstehende Angaben entsprechen den vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) veröffentlichten Mustertexten für die Fach- und Gebrauchsinformationen für Präparate aus *Ginkgo biloba* L.-Blätter-Trockenextrakten.

Nebenwirkungen von *Ginkgo biloba* L.-Präparaten wie Blutungen, Magen-Darm-Beschwerden, Kopfschmerzen und allergische Hautreaktionen treten nur sehr selten auf (weniger als 1 von 10.000 Behandelten).

1.1.2 KONVULSIVE UND ANTIKONVULSIVE WIRKUNG VON GINKGO BILOBA L.-EXTRAKTEN UND EXTRAKTBESTANDTEILEN

Neben den pharmakologisch genutzten Wirkungen des *Ginkgo biloba* L.-Trockenextraktes deuten verschiedene Untersuchungen darauf hin, dass der Extrakt oder einzelne als wirkbestimmend angesehene Bestandteile sich negativ auf das GABAerge System des Zentralnervensystems auswirken könnten.

Dass Extrakte von *Ginkgo biloba* L. die Wirkung von Antiepileptika negativ beeinflussen können, ergaben die Versuche von Anshu et al. (1996). Für diese Versuche hatten sie die Krampfanfälle bei Mäusen mit Picrotoxin (Gemisch aus Picrotoxinin und dem unwirksamen Picrotin) und Strychnin ausgelöst. Sie kamen zu dem Untersuchungsergebnis, dass ein *Ginkgo biloba* L.-Extrakt die GABAerge Wirkung von Antiepileptika (Natriumvalproat beziehungsweise Carbamazepin) mindert.

Neben dem konvulsiv wirkenden Ginkgotoxin (Kapitel 1.2) könnte auch die Wirkung der Ginkgolide und des Bilobalids zu der beschriebenen Wirkung beigetragen haben. Huang et al. (2003) untersuchten die Wirkung von Bilobalid am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA_A-Rezeptor. Sie beobachteten dort für Bilobalid eine antagonistische Wirkung. Huang et al. (2004) prüften außerdem die Wirkung der Ginkgolide A, B und C am rekombinanten humanen $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA_A-Rezeptor. Dabei konnten sie eine antagonistische Wirkung der Ginkgolide nachweisen. GABA ist Agonist an diesem Rezeptor und vermittelt so seine inhibitorische Wirkung. Eine antagonistische Wirkung am GABA_A-Rezeptor mindert die inhibitorische Wirkung von GABA und kann zur Auslösung von Krampfanfällen führen.

Andere Versuche zeigten, dass der *Ginkgo biloba* L.-Extrakt, beziehungsweise das darin enthaltene Bilobalid, auch antikonvulsiv wirken können. Sasaki et al. (1995 und 1997) beschrieben, dass Bilobalid die Stärke der durch Ginkgotoxin, Isoniazid, Pentylentetrazol und Elektroschock ausgelösten Krampfanfällen bei Mäusen mindert. Durch Behandlung der Mäuse mit Bilobalid traten abhängig von der Dosis und der Behandlungsdauer bei weniger Tieren Krampfanfälle auf, die zudem für kürzere Zeiten andauerten. Bilobalid hat nach Sasaki et al. eine antikonvulsive Wirkung bei durch Ginkgotoxin ausgelösten Krampfanfällen.

Sasaki et al. leiteten aus den Ergebnissen ab, dass Bilobalid antikonvulsive Wirkungen hat. Als Ursache für die antikonvulsive Wirkung von Bilobalid werden verschiedene Mechanismen diskutiert.

Die Wirkung von Bilobalid könnte mit der

- Modulation der GABA-Konzentration,
- Modulation der GABA-Wirkung am GABA_A-Rezeptor-Chloridkanal-Komplex oder
- mit der erhöhten Metabolisierung von Ginkgotoxin zu Pyridoxin

begründet werden.

Der Versuch von Sasaki et al. (1997) lieferte ein Indiz für die verstärkte Metabolisierung von Ginkgotoxin bei gleichzeitiger Applikation von Bilobalid an Mäusen. Sie beobachteten die Induktion der 7-O-Methoxycumarin-O-Demethylase in der Leber und eine schnellere Konzentrationsabnahme von Ginkgotoxin im Blut im Vergleich zu Kontrolltieren, die nur mit Ginkgotoxin behandelt wurden. Bilobalid könnte daher durch Induktion des genannten Leberenzym den Abbau von Ginkgotoxin beschleunigen und damit die toxische Wirkung von Ginkgotoxin minimieren (Sasaki et al., 1997; Wada und Haga, 1997).

Dass Bilobalid die GABA-Konzentration beeinflusst, demonstrierten Sasaki et al. (1999). Sie untersuchten den Einfluss von Bilobalid auf das GABAerge System von Mäusen. An vier aufeinander folgenden Tagen wurde den Mäusen Bilobalid in einer Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht appliziert. 24 Stunden nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet und das Gehirn entnommen. Der Gehalt an GABA und Glutamat sowie die Glutamat-Decarboxylaseaktivität wurden im Hippokampus, Cortex und Corpus striatum bestimmt. Nach Bilobalidbehandlung waren der GABA-Spiegel und die Glutamat-Decarboxylaseaktivität im Hippokampus und im Cortex erhöht. Auf den Glutamat-Spiegel hatte die Bilobalidbehandlung keinen Einfluss.

Sasaki et al. (2000) untersuchten außerdem den Einfluss von Bilobalid auf durch Ginkgotoxin ausgelöste Veränderungen der GABA- und Glutamat-Spiegel sowie der Glutamat-Decarboxylaseaktivität im Hippocampus, im Cortex und im Corpus striatum von Mäusen.

Die durch Ginkgotoxin hervorgerufene signifikante Abnahme der GABA-Spiegel und der Glutamat-Decarboxylaseaktivität im Hippokampus und Cortex konnte durch die Vorbehandlung der Mäuse mit Bilobalid vermindert werden. Bilobalid wirkte in diesen Versuchen der Abnahme der GABA-Spiegel und der Inhibierung der Glutamat-Decarboxylase durch Ginkgotoxin entgegen. Die Autoren postulierten, dass Ginkgotoxin die Aktivität der GABAergen inhibitorischen Transmission relativ zur exzitatorischen Transmission reduziert und so zu Krampfanfällen führt. Die GABA-Konzentration war auch nach chronischer Anwendung (40 Tage) von Bilobalid erhöht (Sasaki et al., 2002). Außerdem wurde im Rahmen der genannten Arbeit beobachtet, dass durch die Anwendung von Bilobalid die Glutamat-, Aspartat- und Glycin-Spiegel bestimmter Hirnregionen beeinflusst wurden.

Die genannten Arbeiten verdeutlichen, dass Bilobalid einen Einfluss auf die Spiegel von exzitatorisch und inhibitorisch wirkenden Aminosäuren hat.

Zusammenfassend ergibt sich das Bild einer sehr komplexen Wirkung des *Ginkgo biloba* L.-Trockenextraktes und der darin enthaltenen Ginkgolide und des Bilobalids auf das GABAerge System des Gehirns.

Einerseits wurden Wirkungen beobachtet, die Krampfanfälle begünstigen:

- der *Ginkgo biloba* L.-Trockenextrakt kann die Wirkung von Antiepileptika mindern (Anshu et al., 1996)
- die Ginkgolide A, B, C und J wirken inhibitorisch am Glycin-Rezeptor (Chatterjee et al., 2003; Ivic et al., 2003) und
- die Ginkgolide A, B, C und Bilobalid wirken antagonistisch am $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ GABA_A-Rezeptor (Huang et al., 2003; Ivic et al., 2003; Huang et al., 2004).

Andererseits wurden Wirkungen beobachtet, die der Entwicklung von Krampfanfällen entgegenwirken:

- Bilobalid erhöht die GABA-Spiegel und die Glutamat-Decarboxylaseaktivität (Sasaki et al., 2000 und 2002).
- Bilobalid blockiert die exzitatorische Erregungsausbreitung (Chatterjee et al., 2003).
- Bilobalid reduziert die durch Hypoxie und Hypoglykämie induzierte Glutamat- und Aspartatfreisetzung (Davies et al., 2003).

Um die genannten Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können und die Relevanz bezüglich der Behandlung von Patienten mit *Ginkgo biloba* L.-Präparaten zu beurteilen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

1.2 Ginkgotoxin (4'-O-Methylpyridoxin), ein Strukturanalogon von Vitamin B₆ in *Ginkgo biloba* L.

1.2.1 VORKOMMEN VON GINKGOTOXIN

Ginkgotoxin (4'-O-Methylpyridoxin) ist ein Produkt des Sekundärstoffwechsels von *Ginkgo biloba* L.. Hauptsächlich die Samen von *Ginkgo biloba* L. akkumulieren Ginkgotoxin. Diese Verbindung ist neben den therapeutisch genutzten Inhaltsstoffen (Kapitel 1.1.1) in geringerer Konzentration auch in den Blättern enthalten (Wada et al., 1985; Arenz et al., 1996). Der Gehalt variiert innerhalb der Vegetationsperiode. In den Blättern weiblicher und männlicher Bäume sind 2 beziehungsweise 3 µg Ginkgotoxin pro Gramm Frischgewicht enthalten. Die Samen weisen 42 µg Ginkgotoxin pro Gramm Frischgewicht beziehungsweise 105 µg pro Gramm getrockneter Samen auf (Arenz et al., 1996). Hori et al. (2004) untersuchten Ginkgosamen von 8 Standorten in Japan. Sie ermittelten einen mittleren Ginkgotoxingehalt von 246 µg pro Gramm getrockneter Ginkgosamen.

Scott et al. (2000) untersuchten ebenfalls Ginkgosamen und konnten zeigen, dass diese neben Ginkgotoxin auch das 5'-O-(β-pyranosyl)-Ginkgotoxin enthalten. Der Ginkgotoxingehalt (freies Ginkgotoxin und das 5'-Glykosid) betrug 179 µg pro Gramm getrockneter Ginkgosamen.

Ginkgotoxin und ein weiteres Pyridoxin-Derivat, Acetyl-4'-O-Methylpyridoxin, konnten auch in den Hülsenfrüchten von *Albizia tanganyicensis* Bak. f. aus der Familie der *Mimosaceae* nachgewiesen werden (Steyn et al., 1987). Aus *Albizia lucida* und *Albizia julibrissin* DURAZZ. wurde das 3'-O-β-D-Glykosid von Ginkgotoxin isoliert (Higuchi et al., 1992).

1.2.2 GINKGOTOXIN IN ARZNEIMITTELN AUS *GINKGO BILOBA* L.

Neben den Samenkernen und Blättern von *Ginkgo biloba* L. wurden auch die aus den Blättern hergestellten Arzneimittel auf den Gehalt an Ginkgotoxin untersucht.

Arenz et al. (1996) analysierten den Gehalt von 5 allopathischen und 9 homöopathischen Zubereitungen. In den allopathischen Präparaten variierte der Ginkgotoxingehalt von 3,80 µg/ml bis 9,77 µg/ml. Mit der Tagesdosis werden maximal 11,40 µg (43,31 nmol) bis 58,62 µg (222,7 nmol) Ginkgotoxin aufgenommen (Tabelle 4.1). Scott et al. (2000) untersuchten ebenfalls *Ginkgo biloba* L.-Präparate. Bei den vier untersuchten Präparaten variierte der Ginkgotoxingehalt von 17 µg bis 457 µg pro Kapsel. Da die Tagesdosen von Scott et al. nicht angegeben wurden, kann hier keine Aussage über die täglich

aufgenommene Menge an Ginkgotoxin gemacht werden.

Die Untersuchungen von Scott et al. und Arenz et al. zeigen, dass das in den Blättern und Samenkernen von *Ginkgo biloba* L. vorkommende Ginkgotoxin in den entsprechenden Präparaten wiedergefunden wird.

1.2.3 WIRKUNG VON GINKGOSAMEN

Die Samen von *Ginkgo biloba* L. gelten in China und Japan als Delikatesse. Sie werden gekocht oder geröstet gegessen. Insbesondere in den 30iger und 60iger Jahren des 20. Jahrhunderts, als Nahrungsmittel in China und Japan knapp waren, dienten geröstete und gekochte Ginkgosamen (japanisch gin-nan) häufig als Nahrungsquelle. Dabei wurden vermehrt Vergiftungen ("Gin-nan sitotoxism") beobachtet. Diese äußern sich in tonischen und tonisch-klonischen Krampfanfällen, Bewusstlosigkeit, Erbrechen und Paralyse der Extremitäten. In circa 70 Fällen führten die Vergiftungen zum Tod (Wada et al., 1985; Yanai et al., 1990; Yagi et al., 1993). Die Letalität lag bei 27 % (Wada et al., 1985). Bei 74 % der Vergiftungen handelte es sich um Säuglinge und Kinder unter 6 Jahren (Wada et al., 1985; Wada et al., 1997). Spätfolgen einer Ginkgotoxinvergiftung sind nicht bekannt.

Auch in den letzten Jahren wurde über Vergiftungen mit Ginkgosamen berichtet (Yagi et al., 1993; Miwa et al., 2001; Kajiyama et al., 2002; Fujisawa et al., 2002; Hori et al., 2004). Die Krampfanfälle traten etwa 1–12 h nach Aufnahme der Ginkgosamen auf. In vielen Fällen kam es zu mehreren Krampfepisoden (Wada K., 1996; Hori et al., 2004). Hori et al. (2004) zeigten, dass zum Zeitpunkt der Krampfanfälle der Ginkgotoxin-Spiegel im Serum zwischen 0,24 und 1,28 µg/ml lag.

Die toxische Dosis für Ginkgosamen beziehungsweise von Ginkgotoxin wurde noch nicht definiert. Vergiftungen wurden nach Aufnahme von 7–574 Samen beschrieben (Kajiyama et al., 2002). Aus den Veröffentlichungen geht hervor, dass die Anzahl der Samen, die bei Kindern Symptome einer Vergiftung hervorrief, zwischen 7 und 150 lag. Bei Erwachsenen variierte die Samenzahl zwischen 40 und 300 (Dictionary of Chinese Medicine, 1985; Fujisawa et al., 2002; Shannon et al., 2003).

Bei Versuchen mit Kaninchen, denen 30 mg Ginkgotoxin pro kg Körpergewicht verabreicht wurden, traten Symptome einer Intoxikation bei Blutspiegeln von 1 µg/ml auf (Yagi et al., 1993; Fujisawa, 2002; Hori et al., 2004). Blutproben, die Hori et al. (2004) untersuchten, dokumentieren, dass Krampfanfälle beim Menschen bereits bei niedrigeren Konzentrationen auftreten können, aber im Plasma auch höhere Konzentrationen gemessen wurden (0,24 bis 1,28 µg/ml).

Diese Symptome sind durch Vitamin B₆ (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin, Abbildung

1.1) behandelbar (Kajiyama et al., 2002). Die zur Behandlung von Ginkgotoxinvergiftungen notwendige Dosis Pyridoxin wurde mit einem Viertel der aufgenommenen Ginkgotoxin-Menge angegeben (Kajiyama et al., 2002). Eine Standarddosis wurde bisher nicht empfohlen (Shannon et al., 2003). Kajiyama et al. (2002) beschrieben die erfolgreiche Behandlung einer Vergiftung mit 30 mg Pyridoxin.

1.2.4 WIRKUNG VON GINKGOTOXIN

Die Wirkung von Ginkgotoxin wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht, um den Mechanismus der Vergiftungen mit Ginkgosamen und Ginkgotoxin aufzuklären.

Wada et al. (1985 und 1988) wiesen als erste nach, dass das Agens, welches zu den genannten toxischen Symptomen nach Aufnahme von Ginkgosamen führt, 4'-O-Methylpyridoxin (2-Methyl-3-hydroxy-4'-methoxymethyl-5-hydroxymethylpyridin, Abbildung 1.1) ist. Aufgrund seiner Herkunft wird es auch als Ginkgotoxin bezeichnet (Kapitel 1.2.1). Bereits Ott (1947) belegte, dass Ginkgotoxin toxisch ist. Er untersuchte, ob synthetisch hergestelltes Ginkgotoxin als Struktur analogon des Pyridoxins ein Vitamin B₆-Antagonist ist. In seinen Versuchen minderte Ginkgotoxin die Gewichtszunahme der Küken und senkte deren Überlebensrate. Wurde den Küken gleichzeitig Pyridoxin appliziert, erhöhte sich deren Überlebensrate und Gewichtszunahme. Der Einfluss von Ginkgotoxin ließ sich in den Versuchen von Ott durch Pyridoxin aufheben. Mizuno et al. (1980) untersuchten den Einfluss von 4'-substituierten Pyridoxin-Analoga (Desoxy-, Ethoxy-, Methoxy-, Propoxy- und iso-Propoxymethylpyridoxin) *in vivo* auf Mäuse und *in vitro* auf partiell aufgereinigte Pyridoxal-Kinase aus Mäusehirn. Sie berichteten, dass die gleichzeitige Gabe von Vitamin B₆ die Auslösung von Krampfanfällen, die durch 4'-substituierten Pyridoxin-Analoga hervorgerufen wurden, verhindern kann. Unter den Verbindungen hatte Ginkgotoxin die stärkste konvulsive Wirkung und den größten hemmenden Einfluss auf die Pyridoxal-Kinaseaktivität. Da sich die Wirkung von Ginkgotoxin und von Desoxypyridoxin durch Vitamin B₆ aufheben lässt, werden diese Verbindungen auch als Antivitamine bezeichnet (Ott, 1947; Mizuno et al., 1980).

Nitsch und Okada (1976) untersuchten die durch Ginkgotoxin verursachten Veränderungen der GABA-Spiegel in verschiedenen Hirnregionen am Kaninchen. Nach ihren Berichten sank der GABA-Spiegel in allen untersuchten Hirnregionen nach Ginkgotoxin Gabe. In einer weiteren Arbeit kam Nitsch (1980) zu dem Ergebnis, dass nach Gabe von Ginkgotoxin die Aktivität der Glutamat-Decarboxylase (GAD) in den untersuchten Hirnregionen unterschiedlich stark reduziert war. Die Aktivitätsabnahme ließ sich *in vitro* durch Pyridoxal-5'-phosphat aufheben. Eine signifikante Erniedrigung der Aktivität der GABA-

Transaminase (GABA-T, 4-Aminobutyrat:2-Oxoglutarat Aminotransferase, EC 2.6.1.19) wurde nicht festgestellt. Die GABA-Transaminase bindet Pyridoxal-5'-phosphat sehr fest, so dass es durch Ginkgotoxin kaum vom Enzym verdrängt wird. Die stärkere Beeinflussung der Glutamat-Decarboxylase wird mit der geringeren Sättigung des Enzyms mit Pyridoxal-5'-phosphat im Vergleich zur GABA-Transaminase begründet. Da die Glutamat-Decarboxylase zu einem großen Teil als Apoenzym vorliegt, kann Ginkgotoxin leicht mit dem Enzym interagieren, da Ginkgotoxin keinen Cofaktor verdrängen muss. Aufgrund der geringen Sättigung mit Pyridoxal-5'-phosphat reagiert die Glutamat-Decarboxylase sehr sensibel auf Änderungen der Cofaktor-Konzentration.

In weiteren Versuchen untersuchten Haug und Nitsch (1982) den Einfluss von Ginkgotoxin auf die Taurin-Spiegel und erneut auf die GABA-Spiegel in verschiedenen Hirnregionen von Kaninchen. Sie beobachteten in diesen Versuchen ein Ansteigen der Taurin-Spiegel und erneut eine Abnahme der GABA-Spiegel. Taurin wirkt antikonvulsiv. Sie postulierten, dass es einen regulierenden Einfluss auf die Glutamat und GABA-Konzentration hat.

Nach Yanai et al. (1990) und Wada und Haga (1997) löst Ginkgotoxin Krampfanfälle bei Ratten und Meerschweinchen aus, bevor die Tiere an Kammerflimmern versterben. Die Untersuchung der cerebralen GABA-Spiegel ergab, dass sie während der durch Ginkgotoxin ausgelösten Krampfanfälle erniedrigt waren. Neben den erniedrigten GABA-Spiegeln wurden erhöhte Glutamin- und Glutamat-Spiegel beobachtet. Gleichzeitig beobachtete man Veränderungen im Elektroenzephalogramm.

Die dargelegten Versuche ergaben, dass Ginkgotoxin bei Tieren

- zuverlässig Krampfanfälle auslöst,
- die Aktivität der Glutamat-Decarboxylase mindert,
- die GABA-Spiegel in verschiedenen Hirnregionen senkt,
- möglicherweise mit Pyridoxal-5'-phosphat um die Bindung an Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige Enzyme konkurriert und
- dass die Wirkung von Ginkgotoxin durch Pyridoxal-5'-phosphat aufgehoben werden kann.

Bei den dargestellten Versuchen handelt es sich um Tierversuche. Sie geben daher nur Hinweise auf die Wirkung von Ginkgotoxin beim Menschen. Um die Ursache der beobachteten Vergiftungen mit Ginkgosamen beim Menschen (Kapitel 1.2.3) und den Wirkmechanismus von Ginkgotoxin aufzuklären, sind Untersuchungen an menschlichen Enzymen unerlässlich.

1.2.5 STRUKTURANALOGIE VON GINGKOTOXIN UND VITAMIN B₆

Die Strukturformeln von Ginkgotoxin (4'-O-Methylpyridoxin) und den Vitameren der B₆-Gruppe sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

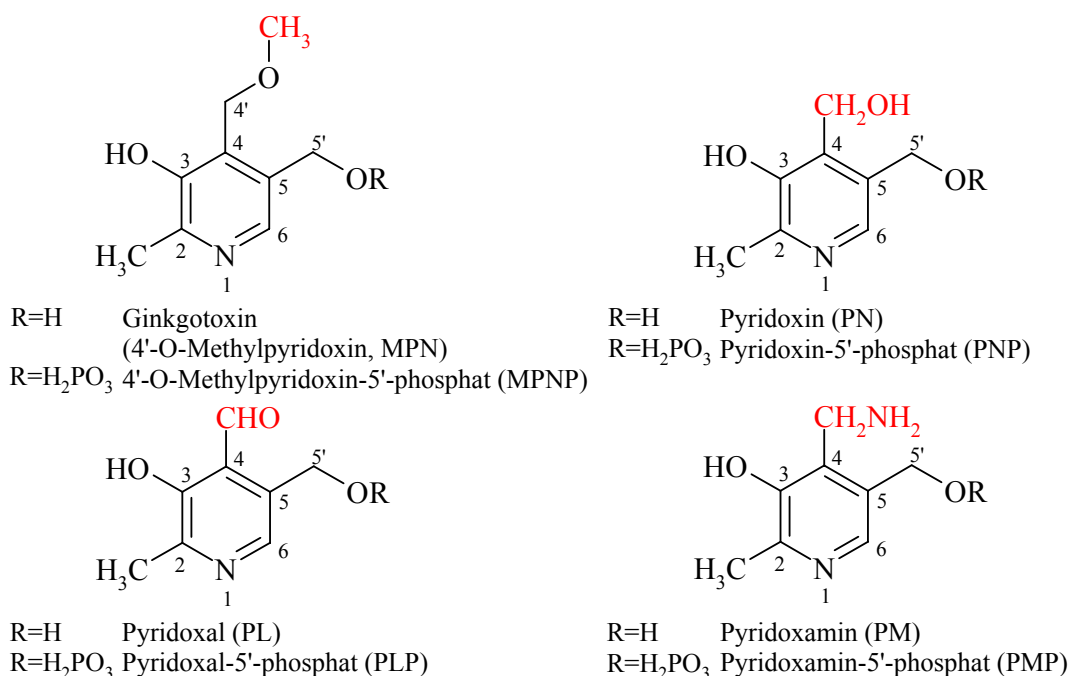


Abbildung 1.1 Strukturformeln von Ginkgotoxin (4'-O-Methylpyridoxin, MPN), den Vitameren der B₆-Gruppe und den jeweils korrespondierenden 5'-Phosphatestern

Ginkgotoxin ist ein mehrfach substituiertes Pyridin-Derivat. Es hat in Position 4' eine Methoxygruppe, im Gegensatz zu Pyridoxin (Abbildung 1.1), das hier eine Hydroxylgruppe aufweist. Die in Ginkgotoxin vorhandene Methoxygruppe anstelle der funktionellen Carbonylgruppe am 4'-Kohlenstoffatom führt zum Verlust der Cofaktoreigenschaften. Die Bildung der für die katalytische Funktion notwendigen Schiff'schen Base mit der α -Aminogruppe der umzusetzenden Aminosäure ist nicht mehr möglich (Abbildung 1.3). Ginkgotoxin ist eine weiße kristalline Substanz, die in Wasser gut löslich ist.

1.3 Vitamin B₆

Vitamine sind niedermolekulare organische Verbindungen mit katalytischer oder regulatorischer Funktion für den Stoffwechsel des menschlichen und tierischen Organismus. Für den menschlichen Organismus zählen sie zu den essentiellen Nahrungsbestandteilen, da sie nicht oder in nicht ausreichendem Maße biosynthetisiert werden

können (Roth et al., 1997). Vitamin B₆ gehört neben Thiamin (Vitamin B₁), Riboflavin (Vitamin B₂), Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂), Pantothensäure, Nikotinsäure (-amid) und Folsäure zum Vitamin B-Komplex. Die Bezeichnung Vitamin B₆ steht für eine Gruppe von drei bioäquivalenten wasserlöslichen Verbindungen und deren korrespondierenden 5'-Phosphateestern. Sie unterscheiden sich in ihren funktionellen Gruppen in Position 4'. Die Strukturformeln der Verbindungen sind in Abbildung 1.2 dargestellt. Die unterschiedlichen funktionellen Gruppen der Moleküle sind rot markiert.

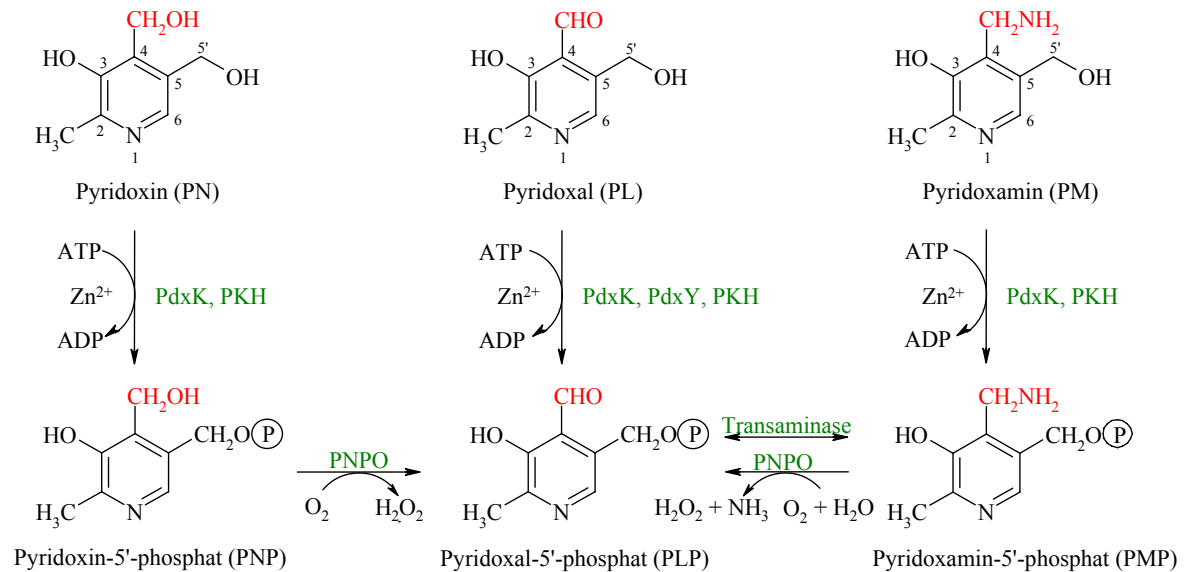


Abbildung 1.2 "Salvage Pathway"

Abbildung 1.2 zeigt die Reaktionen des "Salvage Pathway", die allen Organismen gemeinsam sind. Der "Salvage Pathway" umfasst die Reaktionen der Pyridoxal-Kinase und der Pyridoxinphosphat-Oxidase.

Die Pyridoxal-Kinasen *PKH* (Mensch) und *PdxK* (*Escherichia coli*) phosphorylieren die inaktiven Verbindungen Pyridoxal, Pyridoxin und Pyridoxamin (Yang et al., 1996; di Salvo et al., 2004; Ergebnisse der vorliegenden Arbeit). Die zweite in *Escherichia coli* existierende Pyridoxal-Kinase *PdxY* ist für Pyridoxal spezifisch (Yang et al., 1998).

Pyridoxamin-5'-phosphat und Pyridoxin-5'-phosphat können im nächsten Schritt durch die Pyridoxinphosphat-Oxidase (Pyridoxamin-5'-phosphat: O₂-Oxydoreduktase, EC 1.4.3.5) in Pyridoxal-5'-phosphat umgewandelt werden (Notheis et al., 1995; McCormick und Chen, 1999; Bahn et al., 2002; di Salvo et al., 2003; Musayev et al., 2003).

Säuger müssen Vitamin B₆ mit der Nahrung aufnehmen. Nur in Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen ist die *in vivo* Synthese von Vitamin B₆ möglich (di Salvo et al., 2003). Die Fähigkeit, die Vitamere über den so genannten "Salvage Pathway" ineinander umzuwandeln, ist jedoch allen Organismen gemeinsam (Abbildung 1.1; Hill et al., 1996; Mittenhuber, 2001; di Salvo et al., 2003). Über den "Salvage Pathway" kann das aufgenommene Vitamin B₆ durch die Pyridoxal-Kinase (*PKH*, ATP: Pyridoxal 5'-phospho-Transferase, EC 2.7.1.35) und die Pyridoxinphosphat-Oxidase (*PNPO*, Pyridoxamin-5'-phosphat: O₂-Oxydoreduktase, EC 1.4.3.5) unabhängig von den aufgenommenen

Verbindungen in die physiologisch aktiven Formen Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) und Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP) umgewandelt werden (Wada et al., 1961; Isler et al., 1988; Notheis et al., 1995). Weiterhin kann Pyridoxal-5'-phosphat beim Abbau Pyridoxal-5'-phosphat-abhängiger Enzyme rückgewonnen werden.

Ein Vitamin B₆-Mangel kommt in den westlichen Industrieländern kaum vor (Tunncliffe und Ngo, 1998). Mögliche Symptome sind seborrhoische Dermatitis, hypochrome Anämie, Neuropathien, Hyperoxalurie und cerebrale Krämpfe. Vitamin B₆-Mangelzustände traten in den USA nach Verabreichung von Säuglingsnahrung aus einem bestimmten Milchpulver endemisch auf. Bei diesem Produkt war der natürliche Vitamin B₆-Gehalt durch ein neues Herstellungsverfahren zerstört worden. Bei den Säuglingen traten Hyperirritabilität und zentralnervöse Krämpfe auf (Isler et al., 1988; Eastman und Guilarte, 1992).

Ein Vitamin B₆-Mangel kann auch durch Langzeitbehandlung mit Isoniazid, Protionamid, D-Penicillamin, D-Cyloserin, Levodopa und Thiosemicarbazon ausgelöst werden, da diese Verbindungen Vitamin B₆ durch kovalente Bindung inaktivieren. Erhöht ist der Bedarf an Vitamin B₆ während der Schwangerschaft und Stillzeit, bei langfristiger Einnahme von hormonellen Kontrazeptiva, chronischem Alkoholismus, eiweißreicher Ernährung, Hämodialysepatienten, Hyperthyreosen, gesteigertem Eiweißabbau infolge von Strahlenschäden, Homocysteinurie und genetisch bedingten Verwertungsstörungen. Der Bedarf an Vitamin B₆ liegt bei 2 mg pro Tag (Pschyrembel, 1994; Dakshinamurti, 1982; Forth et al., 1996; Teuscher, 1997; Mutschler et al., 2001).

Therapeutisch angewendet wird synthetisch hergestelltes Pyridoxinhydrochlorid. Bei Mangelerscheinungen wird es peroral oder parenteral in Tagesdosen von 50 bis 150 mg appliziert. Dosen von 100 bis 300 mg werden bei Kinetosen, Strahlenschäden, Parkinsonismus und beim Karpaltunnelsyndrom angewendet. Ebenfalls berichtet wurde über die erfolgreiche Behandlung des prämenstruellen Syndroms mit Pyridoxin in einer Dosierung von 40 bis 100 mg (Bruchhausen et al., 1993; Forth et al., 1996; Teuscher, 1997; Mutschler et al., 2001). Überdosierungen von Vitamin B₆ wurden ebenfalls beschrieben. Die Einnahme von mehr als 1 g pro Tag kann eine schmerzhaft aber reversible Neuropathie auslösen (Gospe, 1998).

Die Gesamtkonzentration von Vitamin B₆ im Plasma des Menschen wird mit 114 nM angegeben (Friedrich, 1988). Dies verteilt sich auf die Vitamere wie folgt: Pyridoxal 11–23 nM, Pyridoxal-5'-phosphat 5–25,1 nM, Pyridoxamin 2–5,7 nM, Pyridoxamin-5'-phosphat 3–8 nM und Pyridoxin 19–33 nM (Dolphin et al., 1986; Friedrich, 1988; Bor et al., 2003; Han et al., 2002). Im Gehirn und Plexus choroidei von Säugern ist die Konzentration von Vitamin B₆ normalerweise 25–50-mal höher als im Plasma (0,2–0,3 µM) (Spector und Greenwald, 1978). Friedrich (1988) gibt im Gegensatz zu

Spector und Greenwald für Pyridoxal-5'-phosphat in der Cerebrospinalflüssigkeit einen wesentlich niedrigeren Wert (0,97 nM) an.

Resorption, Verteilung, Metabolisation und Ausscheidung von Vitamin B₆

Menschen und andere Säuger müssen Vitamin B₆ aus exogenen Quellen über die intestinale Resorption aufnehmen und anschließend enzymatisch in die aktiven Formen Pyridoxal-5'-phosphat und Pyridoxamin-5'-phosphat umwandeln.

Bei der Aufrechterhaltung und Regulation der Vitamin B₆-Homöostase spielt der Darm eine wesentliche Rolle (Said et al., 2003). Die Vitamere werden gut und schnell aus den oberen Darmabschnitten resorbiert. Liegen die Vitamere in der Nahrung phosphoryliert vor, geht der intestinalen Resorption die Hydrolyse der Phosphatester voraus (Merrill und Henderson, 1990). Anschließend kann in der Darmmukosa die Phosphorylierung zu den entsprechenden 5'-Phosphorsäureestern erfolgen. Vitamin B₆ kann an Albumin gebunden oder in die Erythrozyten aufgenommen werden, wo es an Hämoglobin bindet (Merrill und Henderson, 1990). Gebunden an Albumin und aufgenommen in die Erythrozyten wird es im Körper verteilt. Vitamin B₆ gelangt schnell zur Leber und wird durch passive Diffusion aufgenommen. Im Cytosol der Leberhepatozyten erfolgt die Phosphorylierung zu den entsprechenden 5'-Phosphorsäureestern (Abbildung 1.2). Die Oxidation von Pyridoxamin-5'-phosphat und Pyridoxin-5'-phosphat zu Pyridoxal-5'-phosphat wird durch die Pyridoxin-phosphat-Oxidase katalysiert.

Pyridoxal-5'-phosphat wird von der Leber ins Plasma abgegeben. Im Plasma wird Pyridoxal-5'-phosphat hauptsächlich an Albumin gebunden oder durch Aufnahme in die Erythrozyten über den Blutkreislauf an die einzelnen Organe verteilt (Tunnicliff und Ngo, 1998). Pyridoxal-5'-phosphat bindet an den Lysin-Rest in Position 190 des Albumins unter Ausbildung einer Schiff'schen Base und ist so vor dem Abbau durch Phosphatasen geschützt.

Da die 5'-Phosphate die Zellmembran nicht passieren können, muss die Phosphat-Gruppe vor Aufnahme in die Zielzellen durch Membran-assoziierte und freie Phosphatase (Pyridoxal-Phosphatase [EC 3.1.3.74], alkalische Phosphatase [EC 3.1.3.1] und saure Phosphatase [EC 3.1.3.2]) abgespalten werden (Kim et al., 1988; Jang et al., 2003). In der Zelle wird Vitamin B₆ wieder zum aktiven Cofaktor rephosphoryliert (Roth et al., 1997; Cheung et al., 2003). Pyridoxal-5'-phosphat liegt in der Zelle hauptsächlich an Proteine gebunden vor. Die Konzentration an freiem Pyridoxal-5'-phosphat ist sehr gering und beträgt 0,1–1 µM (Choi et al., 1987; Kim et al., 1988).

Die Metabolisierung von Pyridoxal-5'-phosphat erfolgt in der Leber. Zunächst wird die

Phosphatgruppe durch die Pyridoxal-Phosphatase abgespalten. Den weiteren Abbau bewirken eine Aldehyd-Oxidase und eine β -Nicotinamidadenosindinukleotid-abhängige Dehydrogenase (Jang et al., 2003). Der Hauptmetabolit ist Pyridoxinsäure und wird über die Niere ausgeschieden (Merrill et al., 1984).

Ungefähr 70 % des im Körper angereicherten Vitamin B₆ ist im Muskelgewebe gespeichert (Coburn et al., 2003). Pyridoxal-5'-phosphat liegt hauptsächlich als Schiff'sche Base an einer ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes der Glykogen-Phosphorylase (katalysiert die phosphorylitische Spaltung von Glykogen) gebunden vor (Isler et al., 1988; Hayashi, 1995).

Die Aufrechterhaltung des Pyridoxal-5'-phosphat-Spiegels ist nicht an einen einzelnen Mechanismus gebunden und auch noch nicht in allen Einzelheiten bekannt (Jang et al., 2003). Die Regulation der Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration erfolgt durch das komplexe Zusammenwirken der Pyridoxal-Kinase, Pyridoxinphosphat-Oxidase und Pyridoxal-Phosphatase. Sie ist außerdem abhängig vom Ausmaß der Proteinbindung und der Verfügbarkeit der Vorstufen. Negative Rückkopplung reguliert die Aktivität der Pyridoxinphosphat-Oxidase. Dabei hemmt Pyridoxal-5'-phosphat die Pyridoxinphosphat-Oxidase mit einem K_i von 2 μ M (*Escherichia coli*). Dieser K_i -Wert entspricht ungefähr der Konzentration an freiem Pyridoxal-5'-phosphat in der Zelle. Durch die Hemmung der Pyridoxinphosphat-Oxidase durch Pyridoxal-5'-phosphat in niedriger Konzentration wird die Konzentration von Pyridoxal-5'-phosphat in der Zelle niedrig gehalten und nur gebildet, wenn es benötigt wird (di Salvo et al., 2003). Freies Pyridoxal-5'-phosphat liegt in der Zelle hauptsächlich enzymgebunden vor (Kim et al., 1988) und ist so vor Hydrolyse durch die Phosphatasen geschützt.

1.3.1 VITAMIN B₆ ALS COFAKTOR

Vitamin B₆-katalysierte Reaktionen

Vitamin B₆ ist in seinen phosphorylierten Formen, als Pyridoxal-5'-phosphat und Pyridoxamin-5'-phosphat (Abbildung 1.2) Coenzym von mindestens 110 Enzymen (Coburn et al., 2003).

Diese sind an folgenden Reaktionen beteiligt:

- Transaminierungen (zum Beispiel der Abbau von GABA zu Succinatsemi-aldehyd),
- Decarboxylierungen (zum Beispiel Bildung der Neurotransmitter Adrenalin, Dopamin, Serotonin, Tyramin, Histamin, GABA und Taurin),
- Racemisierungen und

- Aldol-Spaltungen.

Im allgemeinen ist Pyridoxal-5'-phosphat als aktiver Cofaktor an enzymatischen Reaktionen beteiligt. Pyridoxamin-5'-phosphat ist Cofaktor vieler Aminotransferasen (Dakshinamurti, 1982).

Die Bindung und Umsetzung einer Aminosäure im Zentrum eines Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzyms ist Abbildung 1.3 dargestellt.

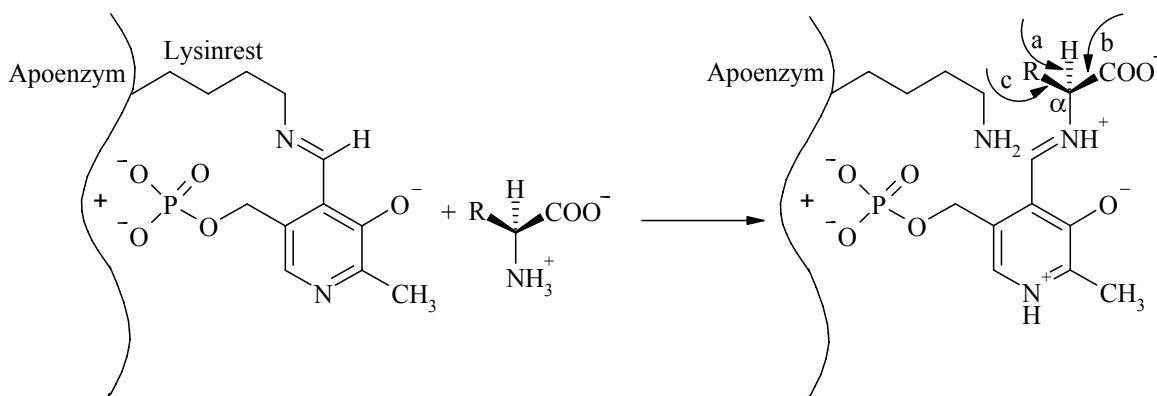


Abbildung 1.3 Reaktionen eines Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzyms mit einer Aminosäure

Pyridoxal-5'-phosphat ist zunächst unter Ausbildung einer Schiff'schen Base im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden. Unter Ausbildung einer neuen Schiff'schen Base zwischen dem Substrat und dem Cofaktor wird die Bindung von Pyridoxal-5'-phosphat zum Enzym hydrolysiert. Der protonierte Stickstoff des Pyridin-Ringes erniedrigt die Elektronendichte am α -Kohlenstoff-Atom der Aminosäure. Aminotransferasen führen zur Elimination eines Protons (a), Decarboxylasen führen zur Elimination von CO_2 (b) und Aldolasen führen beispielsweise zur Abspaltung des Restes R (c). Neben den dargestellten Reaktionen werden auch β - und γ -Eliminationen katalysiert (nach Isler et al., 1988).

Vor Beginn der Enzymreaktion ist Pyridoxal-5'-phosphat unter Ausbildung einer Schiff'schen Base an das aktive Zentrum des Apoenzyms gebunden (internes Aldimin, Abbildung 1.3 links). Im ersten Schritt reagiert die primäre Aminogruppe des Substrates unter Ausbildung einer neuen Schiff'schen Base mit Pyridoxal-5'-phosphat (externes Aldimin, Abbildung 1.3 rechts). Die gebildete Schiff'sche Base bleibt durch nonkovalente Interaktionen eng an das Enzym gebunden. Durch Tautomerisierung bildet sich ein mesomeres System, das in unterschiedlicher Weise weiter reagieren kann.

Der protonierte Stickstoff des Pyridin-Ringes übt einen Elektronenzug aus. Der setzt sich über die $\text{C}=\text{N}$ -Doppelbindung bis zum α -Kohlenstoff-Atom der Aminosäure fort. Die Elektronendichte wird in Position 4 erniedrigt und begünstigt die Eliminierung eines der Substituenten in Form einer positiv geladenen Gruppe. Am α -C-Atom kann jetzt die Abspaltung von H^+ (a), CO_2 (b) oder R^+ (c) erfolgen.

- Die Eliminierung des Protons (a) liefert nach Hydrolyse Pyridoxamin-5'-phosphat (Zwischenprodukt der Aminotransferase-Reaktion) und die

entsprechende α -Oxosäure (Transaminierungsreaktionen).

- Die Eliminierung der Carboxylgruppe (b) liefert CO_2 und nach Hydrolyse der Schiff'schen Base das entsprechende biogene Amin (zum Beispiel Glutamat-Decarboxylase).
- Die Eliminierung von R^+ (c) führt nach Addition eines Protons und anschließender Hydrolyse der Schiff'schen Base zu Glycin.

1.4 Ginkgotoxin und Neurotransmitter

Übermäßiger Verzehr von Ginkgosamen führt zu epileptiformen Krämpfen (Yagi et al., 1993; Miwa et al., 2001; Fujisawa et al., 2002; Kajiyama et al., 2002; Hori et al., 2004;). Im Tierversuch verursacht Ginkgotoxin zuverlässig Krampfanfälle und senkt den GABA-Spiegel im Gehirn (Nitsch und Okada, 1976; Nitsch, 1980; Haug und Nitsch, 1982; Yanai et al., 1990; Wada und Haga, 1997). GABA spielt eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem Mechanismus und der Behandlung der Epilepsie (Treimann, 2001). Die Beobachtungen, dass Ginkgotoxin die GABA-Spiegel im Gehirn senkt und Ginkgosamen epileptiforme Krämpfe auslösen, führten zu der Hypothese, dass Ginkgotoxin Enzyme des GABA-Stoffwechsels beeinflusst.

1.4.1 *EPILEPSIE UND NEUROTRANSMITTER*

Epilepsien gehören zu den häufigsten Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Die Prävalenz beträgt etwa 0,5 bis 1 % (Forth et al., 1996). Bei der Epilepsie handelt es sich um paroxysmale Funktionsstörungen des Gehirns infolge exzessiver Entladungen der Neurone (Pschyrembel, 1994). Sowohl fokale als auch primär generalisierte epileptische Anfälle entstehen dadurch, dass das Gleichgewicht zwischen neuronaler Hemmung und Erregung im Gehirn gestört ist (Forth et al., 1996).

GABA (γ -Aminobuttersäure) und Glycin sind die stärksten inhibitorischen und Glutamat ist neben Aspartat der stärkste exzitatorische Neurotransmitter. Neben der absoluten Konzentration des exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmitters spielt auch das Verhältnis beider eine wichtige Rolle bei der Auslösung von Krampfanfällen. Der Zusammenhang zwischen den beiden bei epileptischen Erkrankungen wichtigsten Neurotransmittern Glutamat und GABA ist in Abbildung 1.4 dargestellt. In einem Schritt wird GABA durch die Glutamat-Decarboxylase (EC 4.1.1.15) aus Glutamat gebildet. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GABA-Synthese (Bu et al., 1992). Aus dem exzitatorischen Neurotransmitter entsteht dabei der inhibitorische Neurotransmitter.

Rezeptorvermittelt wirkt GABA im Gehirn inhibitorisch und verhindert die Weiterleitung von Aktionspotentialen. Nach Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt interagiert es mit GABA_A- oder GABA_B-Rezeptoren. Der GABA_A-Rezeptor-Komplex ist ein pentamerer Heterooligomer. GABA_A-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, deren Aktivierung den Einstrom von Chloridionen in die Zellen bewirkt. Dies führt zur Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran und erschwert die Erzeugung eines postsynaptischen Erregungspotentials. Die Erregungweiterleitung wird unterdrückt. Der GABA_B-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. GABA_B-Rezeptoren vermitteln durch Minderung des Calciumeinstroms und Steigerung des Kaliumaustroms eine Hemmung der Neurone (Snodgrass, 1992; Treimann, 2001). GABA_C-Rezeptoren sind hauptsächlich in der Retina lokalisiert. Ihre Funktion und Bedeutung ist noch nicht abschließend aufgeklärt (Pearl und Gibson, 2004).

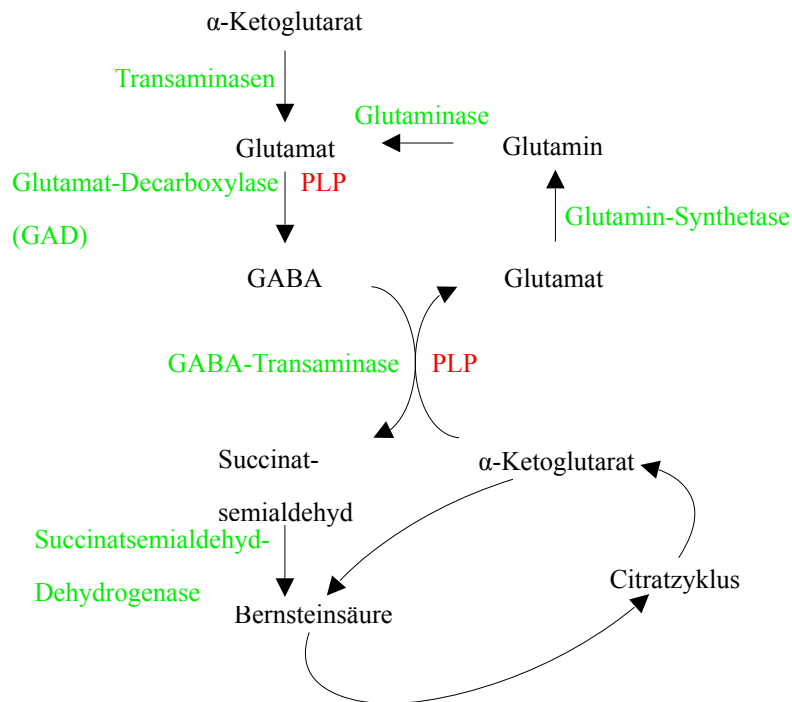


Abbildung 1.4 Glutamat- und GABA-Kreislauf im menschlichen Gehirn

Glia-Zellen versorgen GABAerge und glutaminerge Zellen mit Glutamin. Dies wird mit Hilfe der Glutaminase zu Glutamat umgesetzt. Die Glutamat-Neurone speichern das Glutamat in den Vesikeln, um es bei Erregung in den synaptischen Spalt abzugeben. In den GABA-Neuronen wird Glutamat durch die Glutamat-Decarboxylase zu GABA decarboxyliert.

Wurden Glutamat oder GABA in den synaptischen Spalt abgegeben, werden diese Neurotransmitter entweder von den Neuronen oder Gliazellen aufgenommen. In Gliazellen werden GABA und α -Ketoglutarat durch die GABA-Transaminase in Glutamat und Succinatsemialdehyd umgewandelt. Succinatsemialdehyd wird im nächsten Schritt zu Succinat oxidiert, aus dem über Reaktionen des Citratzyklus wieder α -Ketoglutarat gebildet werden kann. α -Ketoglutarat kann wieder zu Glutamat und weiter zu Glutamin umgesetzt werden, das dann wieder in die GABAergen und glutaminergen Neurone aufgenommen wird.

Über die Succinat-Bildung ist GABA auch am oxidativen Stoffwechsel des Gehirns beteiligt und trägt in bestimmten Hirnregionen erheblich zu diesem bei (Martin und Rimvall, 1993). Dieser Nebenweg des Citratzyklus wird auch als „GABA-Shunt“ bezeichnet.

Pyridoxal-5'-phosphat ist eng mit der Neurotransmitter-Synthese und deren Abbau verknüpft. Sowohl die Bildung von GABA aus Glutamat als auch der Abbau von GABA zu Succinatsemialdehyd sind Pyridoxal-5'-phosphat-abhängig (Abbildung 1.4). Änderungen der Konzentration des Cofaktors Pyridoxal-5'-phosphat können einen ausgeprägten Effekt auf das Zentralnervensystem haben (Tunnicliff und Ngo, 1998). Verbindungen, die mit dem Cofaktor unter Bildung einer Schiff'schen Base reagieren und dadurch die Cofaktor-Konzentration senken, führen zu epileptiformen Krämpfen (carbonyltrapping agents). Hierzu zählen Hydrazide und Hydrazone. Nachdem Mäusen Pyridoxal-5'-phosphat-hydrazone oder L-Glutamat- γ -hydrazone injiziert wurde, entwickelten sie Krampfanfälle. Gleichzeitig war die Glutamat-Decarboxylaseaktivität erniedrigt und die Verfügbarkeit von Pyridoxal-5'-phosphat gemindert. Die Abnahme der Glutamat-Decarboxylaseaktivität ist eine Folge der erniedrigten Pyridoxal-5'-phosphat-Spiegel (Tapia et al., 1969; Tapia und Pasantes, 1971). Die Beeinträchtigung der GABAergen Hemmung, Stimulation der Glutamat-Rezeptoren oder Störungen in der Modulation exzitatorischer und inhibitorischer Prozesse können pathophysiologische Prozesse sein, die mit der Induktion von Krampfanfällen assoziiert sind (Shannon et al., 2003).

1.4.2 PYRIDOXIN-ABHÄNGIGE EPILEPSIE

Pyridoxin (Vitamin B₆)-abhängige Epilepsie ist eine seltene autosomal rezessive Erkrankung, die zu schweren pränatalen oder neonatalen Krampfanfällen führt. Sie kommt mit einer Prävalenz von 1:500.000 vor. Die epileptischen Anfälle treten meist in den ersten Lebensstagen auf (gewöhnlich in den ersten 24–48 h). Bei diesen Patienten wurden erniedrigte GABA-Spiegel, erniedrigte Pyridoxal-5'-phosphat-Spiegel und erhöhte Glutamat-Spiegel im Gehirn und in der Cerebrospinalflüssigkeit beobachtet (Lott et al., 1978; Gospe, 1998). Pyridoxin-abhängige Epilepsie lässt sich nicht mit den bekannten Antiepileptika oder Diazepam behandeln, sondern nur mit hochdosiertem Pyridoxin (100 mg bis 500 mg, Baxter, 2003; Pearl und Gibson, 2004). Die Behandlung muss lebenslang fortgeführt werden. Nach Absetzen von Pyridoxin oder bei Unterbrechung der Behandlung treten die Krampfanfälle innerhalb von 72 Stunden erneut auf (Lott et al., 1978). Einen Konsens über eine allgemein gültige Dosierung von Vitamin B₆ zur Behandlung der Pyridoxin-abhängigen Epilepsie gibt es noch nicht. Pyridoxin wird in einer Dosierung von 0,2–30 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Dies entspricht 2–300 mg/Tag (Gospe, 1998).

Die Pathogenese dieser Erkrankung ist unbekannt, eine Veränderung der Pyridoxin-5'-phosphat-Bindung an die Glutamat-Decarboxylase wird diskutiert. Die Pyridoxin-

abhängige Epilepsie bei Kindern zeigt, dass Pyridoxal-5'-phosphat, beziehungsweise Vitamin B₆, eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit epileptischen Krampfanfällen spielt.

1.4.3 *BEEINFLUSSUNG DER GABA-KONZENTRATION DURCH GINGGOTOXIN*

Ginkgotoxin kann die GABA-Konzentration entweder direkt durch Hemmung GABA bildender oder -abbauender Enzyme beeinflussen oder indirekt über die Beeinflussung der Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration.

1.4.3.1 *Direkte Beeinflussung der GABA-Bildung und des GABA-Abbaus*

Direkt kann Ginkgotoxin die GABA-Konzentration durch Interaktion mit der Glutamat-Decarboxylase oder der GABA-Transaminase beeinflussen (Abbildung 1.4). Ginkgotoxin könnte als Struktur analogon des Vitamin B₆ mit den Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzymen interagieren, indem es die Bindung von Pyridoxal-5'-phosphat verhindert. Bei dieser Interaktion wird es sich aber nicht um eine kovalente Bindung des Ginkgotoxins an das Enzym, wie es mit Pyridoxal-5'-phosphat erfolgt, handeln. Ginkgotoxin fehlt die Aldehydgruppe in Position 4', die für die Ausbildung der Schiff'schen Base im aktiven Zentrum der Enzyme notwendig ist (Abbildung 1.3).

1.4.3.2 *Indirekte Hemmung der GABA-Bildung durch Ginkgotoxin*

Die Hypothese, dass Ginkgotoxin die GABA-Konzentration indirekt über die Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration beeinflussen kann, wird durch folgende Beobachtungen unterstützt:

- Die Bildung des Neurotransmitters GABA aus Glutamat ist von Pyridoxal-5'-phosphat abhängig.
- Die Ginkgotoxinwirkung lässt sich durch Vitamin B₆ aufheben.
- Es besteht eine Strukturverwandtschaft zwischen Ginkgotoxin und Vitamin B₆.

Die Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration wird über verschiedene Mechanismen kontrolliert. Sie beinhalten den Katabolismus durch die Pyridoxal-Phosphatase, die Bildung durch die Pyridoxal-Kinase und Pyridoxinphosphat-Oxidase, die Proteinbindung und den Transport der Vitamere. Der genaue Mechanismus zur Regulation der Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration ist jedoch weitgehend unbekannt (Jang et al., 2003). Die Expression aller 3 Enzyme im Gehirn ist hoch (Jang et al., 2003; Kang et al., 2004). Dies

belegt die Beteiligung aller drei Enzyme an der Aufrechterhaltung der Pyridoxal-5'-phosphat-Homöostase im Gehirn. Da Pyridoxal-5'-phosphat Cofaktor der GABA-Bildung und des GABA-Abbaus ist, kann eine Senkung der Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration indirekt zur Änderung der GABA-Konzentration führen (Bahn et al., 2002).

1.4.3.3 Enzyme, die durch Ginkgotoxin inhibiert werden können

Potentielle Angriffspunkte von Ginkgotoxin/Ginkgotoxin-5'-phosphat sind daher folgende Enzyme (Abbildung 1.5):

- die Pyridoxal-Phosphatase,
- die Pyridoxal-Kinase,
- die Pyridoxinphosphat-Oxidase,
- die Glutamat-Decarboxylase und
- die GABA-Transaminase.

Eine Hemmung der Pyridoxal-Phosphatase würde die Dephosphorylierung von Pyridoxal-5'-phosphat, Pyridoxin-5'-phosphat und Pyridoxamin-5'-phosphat vor Aufnahme von Vitamin B₆ in die Zellen und vor Überwindung der Blut-Hirn-Schranke verhindern (Jang et al., 2003). Als Folge der peripheren Hemmung der Pyridoxal-Phosphatase sinkt die Konzentration an Pyridoxal im Gehirn. Ist weniger Pyridoxal im Gehirn, kann durch die Pyridoxal-Kinase weniger Pyridoxal-5'-phosphat gebildet werden und für die GABA-Bildung steht weniger Cofaktor zur Verfügung. Würde die Pyridoxal-Phosphatase im Gehirn durch Ginkgotoxin oder Ginkgotoxin-5'-phosphat gehemmt, käme es zu einem Überangebot an Pyridoxal-5'-phosphat im Gehirn. Das überschüssige Pyridoxal-5'-phosphat könnte über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Enzyme des GABA-Metabolismus beeinflussen. Weiterhin wurde beobachtet, dass die intracerebroventrikuläre Applikation von Pyridoxal-5'-phosphat oder von Strukturanaloga zu epileptischen Krämpfen bei Ratten führt. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wäre die in *in vitro*-Versuchen beobachtete Inhibierung der Bindung von GABA an den GABA_A-Rezeptor (Tunnicliff und Ngo, 1998). Würden also durch Hemmung der Pyridoxal-Phosphatase die Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration im Gehirn steigen, könnte weniger GABA an den GABA_A-Rezeptor binden, und es kommt möglicherweise zu Krampfanfällen.

Eine verminderte Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat resultiert aus der Hemmung der Pyridoxal-Kinase und der Pyridoxinphosphat-Oxidase. Eine Hemmung dieser Enzyme führt zu einer indirekten Hemmung der Glutamat-Decarboxylase, da weniger Cofaktor zur

Verfügung steht. Eine Hemmung der Pyridoxal-Kinase sollte aber einen größeren Einfluss haben als die Hemmung der Pyridoxinphosphat-Oxidase, da durch Hemmung der Kinase die Bildung aller Phosphate unterdrückt wird. Wird die Pyridoxinphosphat-Oxidase gehemmt, kann immer noch Pyridoxal-5'-phosphat aus Pyridoxal gebildet werden (Abbildung 1.2).

Eine direkte Hemmung der Glutamat-Decarboxylase durch Ginkgotoxin ist ebenfalls denkbar. Dies würde zu einer verminderten Bildung von GABA aus Glutamat und damit zu einem Überwiegen des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat führen. Von den beiden beim Menschen existierenden Glutamat-Decarboxylasen ist hauptsächlich die GAD_{65kDa} von der Cofaktor-Konzentration abhängig, da diese überwiegend als Apoenzym vorliegt (Martin und Rimvall, 1993; Tillakaratne et al., 1995). Der Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat dissoziiert leichter von der GAD_{65kDa} ab. Die GAD_{65kDa} ist in den Nervenendigungen lokalisiert und verantwortlich für die kurzfristige Bereitstellung von GABA, wenn die schnelle Inhibierung der neuronalen Erregung notwendig ist.

GABA wird nach Interaktion mit den GABA-Rezeptoren schnell aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptischen Nervenendigungen und benachbarten Gliazellen (Astrozyten) aufgenommen (Petroff und Rothman, 1998; Treimann, 2001; Baxter, 2003). Der Abbau von GABA erfolgt sowohl im synaptischen Spalt als auch in den Astrozyten durch die GABA-Transaminase unter Bildung von Succinatsemialdehyd und Glutamat (Petroff und Rothman, 1998; Wong et al., 2003). Das gebildete Glutamat wird durch die Glutamin-Synthetase in Glutamin umgewandelt, das anschließend von den Nervenendigungen der GABAergen Neurone aufgenommen wird. Dort wird das Glutamin wieder zu Glutamat umgesetzt und kann erneut durch die Glutamat-Decarboxylase in GABA umgewandelt werden und steht dann wieder als inhibitorischer Neurotransmitter zu Verfügung. Eine Hemmung der GABA-Transaminase im synaptischen Spalt führt zu einer Erhöhung der GABA-Konzentration. Dies wird auch als Wirkprinzip bei der Behandlung der Epilepsie ausgenutzt (Petroff und Rothman, 1998). Vigabatrin und Valproat hemmen unter anderem die GABA-Transaminase und verstärken so die GABAerge Transmission. Würde durch Ginkgotoxin oder Ginkgotoxin-5'-phosphat die GABA-Transaminase der Astrozyten gehemmt, könnte weniger Glutamin gebildet werden. Als Folge enthielten die GABAergen Nerven weniger Glutamin. Für die GABA-Synthese stünde weniger Glutamat und damit weniger GABA für die Nerveninhibierung zur Verfügung (Abbildung 1.4).

Die Hemmung der GABA-Transaminase kann also je nach Ort der Hemmung unterschiedliche Wirkungen haben. Einerseits wirkt die Hemmung der GABA-Transaminase der Entwicklung von epileptischen Anfällen entgegen, andererseits wird bei GABA-Transaminasemangel von Krampfanfällen und Entwicklungsstörungen berichtet. GABA-

Transaminasemangel ist eine autosomal rezessive Erkrankung, die mit hohen GABA-Konzentrationen im Serum und in der Cerebrospinalflüssigkeit einhergeht (Pearl und Gibson, 2004). Da die als Antiepileptika eingesetzten Arzneistoffe Vigabatrin und Valproat die GABA-Transaminase hemmen, erscheint die Hemmung der GABA-Transaminase als toxisches Wirkprinzip für Ginkgotoxin unwahrscheinlich.

Hohe GABA-Konzentrationen führen gleichzeitig zur Inhibierung der *Holo*Glutamat-Decarboxylase-Bildung. Bei hohen GABA-Konzentrationen kann der Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat nicht von der *Apo*Glutamat-Decarboxylase gebunden werden (Petroff und Rothman, 1998). Aus dem inaktiven Enzym wird bei hohen GABA-Konzentrationen nicht das aktive Enzym gebildet und dadurch die weitere Bildung von GABA unterdrückt.

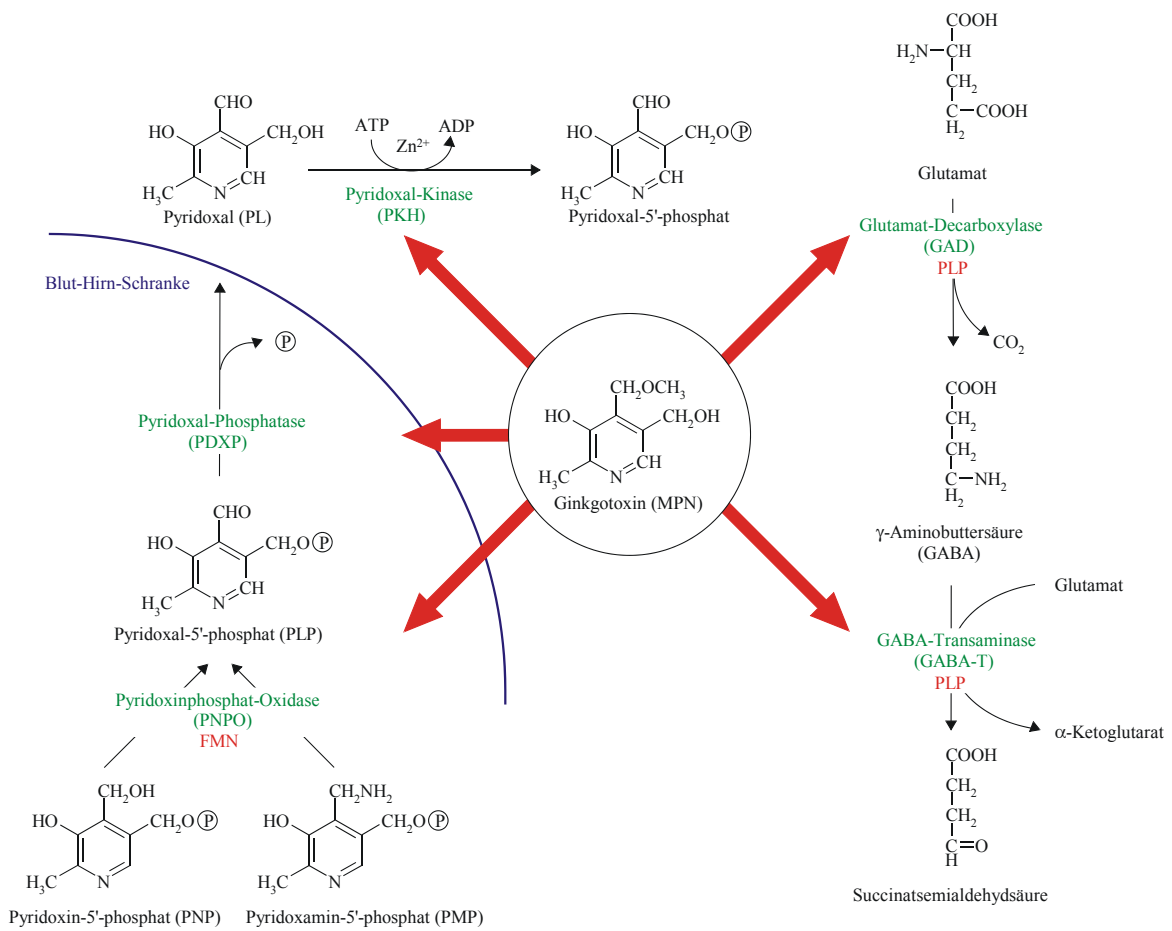


Abbildung 1.5

Mögliche Angriffspunkte von Ginkgotoxin

Pyridoxin-5'-phosphat und Pyridoxamin-5'-phosphat werden durch die Pyridoxinphosphat-Oxidase zu Pyridoxal-5'-phosphat oxidiert. Vor Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (blau dargestellt) werden Pyridoxal-5'-phosphat, Pyridoxin-5'-phosphat und Pyridoxamin-5'-phosphat durch die Pyridoxal-Phosphatase dephosphoryliert. Nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke werden die Verbindungen durch die Pyridoxal-Kinase rephosphoryliert. Das gebildete Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) kann jetzt als Cofaktor der Glutamat-Decarboxylase fungieren. Diese katalysiert die Decarboxylierung von Glutamat zu GABA. Der Abbau von GABA erfolgt durch die GABA-Transaminase, deren Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat ist. Die Pyridoxal-Kinase, die Pyridoxalphosphat-Oxidase, die Pyridoxal-Phosphatase, die Glutamat-Decarboxylase und die GABA-Transaminase sind ubiquitär im menschlichen Körper lokalisiert (Tillakaratne et al., 1995; Hanna et al., 1997; Jang et al., 2003; Fang et al., 2004; Kang et al., 2004). Daher können die Enzyme nicht nur im Gehirn, sondern auch in anderen Organen gehemmt werden.

1.4.4 BISHIER UNTERSUCHTE TARGETS DES GINKGOTOXINS

Aufgrund der Symptome einer Intoxikation mit Ginkgotoxin und der in Tierversuchen beobachteten Veränderungen der GABA- und Glutamat-Spiegel (Kapitel 1.2.4) wurden zunächst alle Enzyme, die die direkte Bildung von GABA und Glutamat beeinflussen, als mögliche Targets von Ginkgotoxin in Betracht gezogen (Abbildung 1.5).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GABA-Synthese ist die Decarboxylierung von Glutamat durch die Glutamat-Decarboxylase. Wegen der direkten Beteiligung der Glutamat-Decarboxylase an der GABA-Bildung untersuchten Buss et al. (2001) zunächst die zwei im menschlichen Gehirn vorkommenden Isoformen dieses Enzyms. Buss et al. exprimierten die GAD_{65kDa} und GAD_{67kDa} rekombinant und untersuchten den Einfluss von Ginkgotoxin, Desoxyipyridoxin und deren 5'-Phosphatester *in vitro* auf die Aktivität der Glutamat-Decarboxylase. Diese Versuche ergaben, dass besonders die phosphorylierten Verbindungen einen inhibierenden Einfluss auf die Glutamat-Decarboxylase haben. Die nicht phosphorylierten Antivitamine waren dagegen ohne Einfluss. Die GAD_{65kDa} wurde stärker gehemmt als die GAD_{67kDa}. Durch Desoxyipyridoxin-5'-phosphat ließ sich die GAD_{65kDa}-Aktivität auf 40 % und durch Ginkgotoxin-5'-phosphat auf 35 % vermindern. Die IC₅₀-Werte betragen 2,4 mM beziehungsweise 2,7 mM.

Weiterhin wurde festgestellt, dass sich der inhibierende Effekt von Ginkgotoxin-5'-phosphat und Desoxyipyridoxin-5'-phosphat auf die Glutamat-Decarboxylase durch Pyridoxal-5'-phosphat aufheben lässt. Eine Hemmung der Glutamat-Decarboxylase wurde bei Konzentrationen beobachtet, die *in vivo* nur schwer erreicht werden und bisher bei keiner Vergiftung gemessen wurden. Die höchste bei Vergiftungen gemessene Ginkgotoxin-Konzentration im Menschen betrug 6,99 µM (1,28 µg/ml). Daraus lässt sich ableiten, dass die Hemmung der Glutamat-Decarboxylase nicht allein für die gezeigten Symptome einer Ginkgotoxinintoxikation verantwortlich sein kann. Um die unter Kapitel 1.2.3 und 1.2.4 beschriebenen Symptome auszulösen, müssen durch Ginkgotoxin noch weitere Enzyme gehemmt werden.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Ginkgotoxin auf die menschliche Pyridoxal-Kinase zu untersuchen. Diese Untersuchungen sollten dazu beitragen, weitere Erkenntnisse über den Mechanismus der Vergiftungen mit Ginkgosamen und über die Wirkung von Ginkgotoxin auf Enzyme des menschlichen Hirnstoffwechsels zu erlangen. Die Ergebnisse könnten zusammen mit den in der Literatur dargestellten Beobachtungen

die Beurteilung der Risiken, die mit der Einnahme von Arzneimitteln aus *Ginkgo biloba* L.-Trockenextrakten und dem darin enthaltenen Ginkgotoxin verbunden sind, ermöglichen.

Es sollte die Hypothese, dass Ginkgotoxin die Pyridoxal-Kinase hemmt, untersucht werden. Eine Inhibierung der Pyridoxal-Kinase würde dazu führen, dass weniger Pyridoxal-5'-phosphat gebildet wird. Als Folge steht weniger Cofaktor für die Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzyme des Hirnstoffwechsels zur Verfügung. Dies würde unter anderem zu einer verminderten Aktivität der Glutamat-Decarboxylase führen, da Pyridoxal-5'-phosphat der Cofaktor dieses Enzyms ist. Eine Verringerung der Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration würde besonders die GAD_{65kDa} hemmen (Kapitel 1.4.3.3) und die schnelle Bereitstellung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA unterdrücken.

Es wurde postuliert, dass die Hemmung der Pyridoxal-Kinase zu einem relativen GABA-Mangel im Gehirn führt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen gestützt, dass der GABA-Spiegel im Gehirn durch Applikation von Ginkgotoxin bei Nagern gesenkt werden kann (Nitsch und Okada, 1976; Nitsch, 1980; Haug und Nitsch, 1982; Yanai et al., 1990; Wada und Haga, 1997).

Bisher wurde die Wirkung von Ginkgotoxin an Tieren, mit Hirnhomogenaten oder partiell aufgereinigter Pyridoxal-Kinase aus Mäusehirn untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals rekombinant exprimierte und aufgereinigte menschliche Pyridoxal-Kinase für die Untersuchung der Ginkgotoxinwirkung eingesetzt werden. Die Pyridoxal-Kinase sollte sowohl als Maltose-bindendes Fusionsprotein, als auch als natives Protein in *Escherichia coli* überexprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Die Expression als Fusionsprotein sollte eine schnelle und einfache Aufreinigung ermöglichen. Die Überexpression als natives Protein wurde gewählt, da ein Einfluss des Fusionsanteils auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase möglich ist (Fitzpatrick et al., 2004). Der Vergleich der Aktivität des nativen Proteins mit der Aktivität des Fusionsproteins, würde eine Aussage gestatten, inwieweit der Fusionsanteil die Aktivität von rekombinanten Proteinen beeinflussen kann. Es wurde geplant, die Pyridoxal-Kinase in *Escherichia coli* zu exprimieren. Ein Nachteil dieses Expressionssystems sind die fehlenden posttranslationalen Modifikationen (4.3.3). Die gebildeten Proteine werden korrekt translatiert, wegen der fehlenden posttranslationalen Modifikationen kann deren Funktion aber beeinflusst sein. Dieses Expressionssystem wurde dennoch gewählt, da es die schnelle Gewinnung ausreichend großer Proteinmengen ermöglicht.

Bei den bisher durchgeführten enzymatischen Untersuchungen der Ginkgotoxinwirkung wurde partiell aufgereinigte Pyridoxal-Kinase aus Mäusehirn eingesetzt (Kapitel 1.2.4,

Mizuno et al., 1980). Die so erhaltene Pyridoxal-Kinase war durch weitere Proteine verunreinigt. Die durchgeführten Messungen können durch diese Verunreinigungen beeinflusst worden sein. Eine eingehende Untersuchung des Hemmmechanismus wurde nicht durchgeführt.

Um eine Beeinflussung der Messergebnisse durch andere Proteine weitestgehend auszuschließen, wurde eine Aufreinigung der Pyridoxal-Kinase angestrebt. Die Aufreinigung des Maltose-bindenden Fusionsproteins sollte in einem Schritt durch Affinitätschromatographie erfolgen (pMALTM Protein Fusion and Purification System; Kellermann und Ferenci, 1982). Die Aufreinigung der nativen Pyridoxal-Kinase (Cash et al., 1980) wurde modifiziert. Nach Etablierung der Aufreinigungsmethode für die native Pyridoxal-Kinase sollte diese zunächst charakterisiert werden, um die optimalen Reaktionsbedingungen für die nachfolgenden enzymkinetischen Untersuchungen zu bestimmen. Es war geplant, den Einfluss von Ginkgotoxin auf die Pyridoxal-Kinase in einem einfachen optischen Test zu untersuchen. Neben Ginkgotoxin sollte ein weiteres Vitamin B₆-Strukturanalogon, Desoxypyridoxin, in die Untersuchungen einbezogen werden. Die Untersuchung des Einflusses von Desoxypyridoxin wurde angestrebt, da es ebenfalls Vitamin B₆ antagonistisch wirkt und ein bekannter Inhibitor der Pyridoxal-Kinase ist (Mizuno et al., 1980; Hanna et al., 1997). Desoxypyridoxin kam daher als Positivkontrolle zum Einsatz und diente als Vergleich für die Stärke der Ginkgotoxinwirkung. Es war geplant, neben der Hemmung der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung durch Ginkgotoxin auch die Phosphorylierung von Ginkgotoxin durch die Pyridoxal-Kinase zu analysieren. Da die möglicherweise bei den Enzyminkubationen gebildeten 5'-Phosphate mit dem einfachen optischen Test nicht erfasst werden können, wurde eine bereits etablierte HPLC-Methode zur Analytik von Ginkgotoxin für die Vitamere der B₆-Gruppe angepasst. Diese Methode sollte dazu dienen, mögliche Reaktionsprodukte der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin und Desoxypyridoxin und den Vitameren zu erfassen.

Die Untersuchung der Beeinflussung der menschlichen Pyridoxal-Kinase durch Ginkgotoxin kann dazu beitragen, die durch Ginkgosamen und Ginkgotoxin ausgelösten epileptiformen Krämpfe zu erklären. Ginkgotoxin löst im Tierversuch zuverlässig Krampfanfälle aus. Daher lassen sich aus den Ergebnissen der Arbeiten über den Einfluss von Ginkgotoxin auf Enzyme des Hirnstoffwechsels neue Erkenntnisse über den biochemischen Ablauf epileptischer Anfälle und neue Ansätze für die Antiepileptikaforschung ableiten.

Untersuchungen über den Wirkmechanismus von Ginkgotoxin sollten auch durchgeführt werden, um ein mögliches Risiko durch die Einnahme von *Ginkgo biloba* L.-haltiger Präparate abschätzen zu können (Granger, 2001; Gregory 2001; Spinella, 2001; Ernst,

2002). Diese Untersuchungen sind insbesondere für die Anwendung von Trockenextrakten aus *Ginkgo biloba* L. bei prädispositionierten Epileptikern wichtig, da bei diesen Patienten jede weitere Störung des Neurotransmitterhaushaltes vermieden werden muss.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

2.1.1 CHEMIKALIEN

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
1-Octanol	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
2,6-Dichlorchinonchlorimid	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
4'-Desoxypyridoxin-5'-phosphat	MP Biomedicals, Irvine, USA
Acetonitril	SDS GmbH, 76437 Rastatt
Acrylamid 40 % (Roti-Phorese)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
ADP (Adenosin-5'-diphosphat)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Agar	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Agarose	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Alconox [®]	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Amylose Resin	New England Biolabs, 65926 Frankfurt am Main
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
ATP (Adenosin-5'-triphosphat)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Betain	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Calciumchlorid	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Chloroform	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Coomassie-Brilliant blue G250 [®]	SERVA Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg
Desoxypyridoxin (2,4-Dimethyl-3-hydroxy-5-hydroxymethylpyridin)	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Desoxypyridoxin-5'-phosphat	MP Biomedicals, 37269 Eschwege
DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
EAH-Sepharose [™] 4B	Amersham Biosciences Europe GmbH, 79021 Freiburg
EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Eisessig	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Ethanol	SDS GmbH, 76437 Rastatt
Ethidiumbromid-Lösung 1 %	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Geneticin [®]	Life Technologies (Gibco BRL), 76131 Karlsruhe
Ginkgotoxin (2-Methyl-3-hydroxy-4-methoxymethyl-5-hydroxy- methylpyridin)	Synthese Dr. T. Hemscheidt, Department of Chemistry University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii
Ginkgotoxin-5'-phosphat	Synthese Dr. K. Buss, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn
Glucose	Merck KGaA, 64293 Darmstadt

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
Glutathion	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Glycerol, wasserfrei	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Glycin	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
GTP (Guanosin-5'-triphosphat)	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Hefe Extrakt (=Select [®] Yeast Extract)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
HPLC-Wasser (Lichrosolv [®])	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Isopropanol	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Kanamycin A, Monosulfat	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Maltose	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Manganchlorid	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Natriumacetat	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Natriumborhydrid	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Natriumcarbonat, wasserfrei	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Natriumthiosulfat-5-hydrat	Riedel-de Haen, Buchs, Schweiz
Oligonukleotide ("Primer")	MWG Biotech AG, 85560 Ebersberg
Penicillin G	SERVA Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg
Phenol (Roti-Phenol [®])	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
PIPES (Piperazin-N,N-bis[ethansulfonsäure])	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Pyridoxal-5'-phosphat	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Pyridoxal-hydrochlorid	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Pyridoxamin-5'-phosphat	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Pyridoxamin-dihydrochlorid	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Pyridoxin-5'-phosphat	Synthese A. Petersen, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn
Pyridoxin-hydrochlorid	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Rubidiumchlorid	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Sephadex [®] G15	Amersham Biosciences Europe GmbH, 79021 Freiburg
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Tertiärbutanol	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Tetracyclin	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
Trifluoressigsäure	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Trypton (= Selected Pepton 140)	Life Technologies (Gibco BRL), 76131 Karlsruhe
Zinkchlorid	Merck KGaA, 64293 Darmstadt

Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen

2.1.2 ENZYME, GRÖßENSTANDARDS UND REAGENZIENSÄTZE

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Molekulargewichtsstandards zur Größenbestimmung von Proteinen und DNA und die Reagenziensätze sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Bezeichnung	Hersteller
BigDye [®] Terminator Cycle Sequencing Kit v1.0, (ABI PRISM [®] Ready Reaction Cycle Sequencing Kit)	Applied Biosystems, 64311 Weiterstadt
Factor Xa, Restriction Grade Factor Xa	Novagen, Madison, WI 53711, USA
GenRuler Ladder Mix	MBI-Fermentas, 68789 St. Leon-Rot
Low molecular weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis	Amersham Biosciences Europe GmbH, 79021 Freiburg
Lysozym	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Perfect Protein [™] (15-150 kDa)	Novagen, Madison, WI 53711, USA
<i>Pfu</i> Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	Invitrogen [™] Life technologie
Phosphatase, alkalische (aus Kälberdarm) lyophilisiert (EC 3.1.3.1)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Platinum [®] <i>Pfx</i> DNA Polymerase aus <i>Thermococcus species</i> KOD, 2,5 u/µl	Invitrogen, 9704 CH Groningen, Niederlande
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, 40724 Hilden
T4-DNA-Ligase	MBI-Fermentas, 68789 St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Qbiogene, 68123 Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, 65926 Frankfurt am Main, MBI-Fermentas, 68789 St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, 65926 Frankfurt am Main

Tabelle 2.2 Enzyme, Molekulargewichtsstandards und Reagenziensätze

2.1.3 PUFFER UND LÖSUNGEN

In den Tabellen 2.3 bis 2.9 sind die Zusammensetzungen der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Puffer und Lösungen angegeben. Die Puffer und Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser (Kapitel 2.2.1) hergestellt.

2.1.3.1 *Puffer zur Isolierung von DNA*

Puffer/Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
Puffer P1	Tris-HCl	50	mM	pH-Wert 8,0
	EDTA	10	mM	
	RNAse A	100	µg/ml	
Puffer P2	NaOH	0,2	M	
	SDS	1	% (m/V)	
Puffer P3	Kaliumacetat	2,55	mM	pH-Wert 4,8 mit Eisessig einstellen
TE-Puffer	Tris-HCl	10	mM	pH-Wert 8,0
	EDTA	1	mM	
Kirby-Mix	Roti®-Phenol (pH-Wert 8,0)	24	VT	
	Chloroform	24	VT	
	Isoamylalkohol	2	VT	

Tabelle 2.3 Puffer zur Isolierung von DNA2.1.3.2 *Puffer zur Transformation, Transfektion und Selektion von Escherichia coli und HEK-Zellen*

Puffer/Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
TB-Puffer	HEPES oder Pipes	10	mM	Die Lösung vor Gebrauch frisch herstellen und sterilfiltrieren. Den pH-Wert mit KOH auf 6,7 einstellen und anschließend MnCl ₂ zugeben.
	CaCl ₂	15	mM	
	KCl	250	mM	
	MnCl ₂	55	mM	
TFB1-Puffer	Kaliumacetat	30	mM	Den pH-Wert mit 1 M Essigsäure auf 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.
	CaCl ₂	10	mM	
	MnCl ₂	50	mM	
	RbCl	100	mM	
	Glycerol	15	%	
TFB2-Puffer	MOPS oder PIPES	10	mM	Den pH-Wert mit 1 M KOH auf 6,5 einstellen und sterilfiltrieren.
	CaCl ₂	75	mM	
	RbCl	10	mM	
	Glycerol	15	%	
PBS-Puffer	Natriumphosphat	10	mM	pH-Wert 7,4
	NaCl	140	mM	
	KCl	5	mM	

Tabelle 2.4 Puffer zur Transformation, Transfektion und Selektion von *Escherichia coli* und HEK-Zellen2.1.3.3 *Puffer für die DNA-Gelelektrophorese*

Puffer/Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
TAE-Puffer (50fach konzentriert)	Tris	2,0	M	pH-Wert 8,3
	Essigsäure	1,0	M	
	EDTA	0,05	M	

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Herstellung	
TBE-Puffer (10fach konzentriert)	Tris	0,9	M
	Borsäure	0,9	M
	EDTA (pH-Wert 8,0)	0,02	M
DNA-Auftragspuffer (6fach konzentriert)	Bromphenolblau	0,25	%
	Xylencyanol FF	0,25	%
	Glycerol	30	% (m/V)

Tabelle 2.5 Puffer für die DNA-Gelelektrophorese

2.1.3.4 Puffer für die automatische Sequenzierung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Herstellung	
Probenauftragspuffer	Formamid	5	VT
	EDTA (25 mM, pH-Wert 8,0)	1	VT
APS-Lösung 10%	APS	1,0	g
	H ₂ O	ad 10	ml
Elektrophoresepuffer	10x TBE-Puffer (Tabelle 2.5)	130	ml
	H ₂ O	1170	ml
Acrylamid-Gellösung (4,5 %)	Harnstoff	12,0	g
	Acrylamid-Lösung 30%ig	5,0	ml
	10x TBE-Puffer (Tabelle 2.5)	4,0	ml
	HPLC-Wasser	15,3	ml

Tabelle 2.6 Puffer für die automatische Sequenzierung

2.1.3.5 Puffer für die chromatographische Reinigung von Enzymen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Herstellung	
Lysispuffer	Tris-HCl (pH-Wert 8,0)	50	mM
	NaCl	100	mM
	EDTA	2	mM
Säulenpuffer	Tris-HCl (pH-Wert 7,4; 1M)	20	ml
	NaCl	11,7	g
	EDTA (0,5 M)	2,0	ml
	H ₂ O	ad 1000	ml
maltosehaltiger Säulenpuffer (Elutionspuffer)	Maltose Säulenpuffer	10	mM
Puffer 1	Kaliumphosphat	2	mM
	Glutathion	0,1	mM
	KCl	100	mM
Puffer 2	Kaliumphosphat	2	mM
	Glutathion	0,1	mM
	KCl	400	mM
Puffer PN (pyridoxinhaltiger Puffer)	Kaliumphosphat	2	mM
	Glutathion	0,1	mM
	KCl	100	mM
	Pyridoxin	10	mM
Reinigungspuffer 1	Tris-HCl	0,1	M
	NaCl	0,5	M

Puffer/Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
Reinigungspuffer 2	Natriumacetat	0,1	M	pH-Wert 4,5
	NaCl	0,5	M	

Tabelle 2.7 Puffer für die chromatographische Reinigung von Enzymen

2.1.3.6 Puffer für die Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
denaturierender Probenpuffer (5fach konzentriert)	Glycerol	5,75	ml	
	β-Mercaptoethanol	2,5	ml	
	SDS	0,9	g	
	Bromphenolblau (1 % w/v)	0,1	ml	
	Tris-HCl (1,9 M, pH-Wert 6,8)	1,65	ml	
APS-Lösung 20 %	APS	2,0	g	Die hergestellte Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.
	H ₂ O	ad 10	ml	
Sammelgelpuffer	SDS	0,4	%	pH-Wert 6,8
	Tris-HCl	0,5	M	
Trenngelpuffer	SDS	0,4	%	pH-Wert 8,8
	Tris-HCl	1,5	M	
Sammelgel-Lösung (3 %)	Acrylamid-Lösung 40 %	0,15	ml	Acrylamid-Lösung, Wasser und Puffer mischen und entgasen, APS und TEMED zugeben, sofort in Gießvorrichtung geben, 30 Minuten polymerisieren lassen.
	Sammelgelpuffer	0,5	ml	
	H ₂ O	1,34	ml	
	APS (20 %)	15	µl	
	TEMED	3	µl	
Trenngel-Lösung (12,5 %)	Acrylamid-Lösung 40 %	2,5	ml	Acrylamid-Lösung, Wasser und Puffer mischen und entgasen, APS und TEMED zugeben, sofort in Gießvorrichtung geben, 30 Minuten polymerisieren lassen.
	Trenngelpuffer	2	2 ml	
	H ₂ O	3,46	3,46 ml	
	APS (20 %)	40	40 µl	
	TEMED	4,9	4,9 µl	
Elektrophoresepuffer	Tris-HCl	0,3	% (w/v)	
	Glycin	1,44	% (w/v)	
	SDS	0,1	% (w/v)	

Tabelle 2.8 Puffer für die Protein-Gelelektrophorese

2.1.3.7 Lösungen für die Proteindetektion

Puffer/Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Brillant blue G250 [®]	1	g/l	
	Methanol	500	ml/l	
	Eisessig (100 %)	75	ml/l	
Coomassie-Entfärbelösung	Methanol	200	ml/l	
	Eisessig (100 %)	75	ml/l	
Fixierer	Methanol	500	ml/l	
	Eisessig (100 %)	120	ml/l	
	Formaldehyd (37 %)	0,5	ml/l	
Waschlösung	Methanol	50	%	
	Wasser	50	%	
Vorbehandlungslösung	Natriumthiosulfat Pentahydrat	200	mg/l	

Puffer/Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
Färbelösung	Silbernitrat	2	g/l	
	Formaldehyd (37 %)	0,75	ml/l	
Entwickler	Natriumcarbonat	60	g/l	
	Formaldehyd (37 %)	0,5	ml/l	
	Natriumthiosulfat Pentahydrat	0,5	g/l	
Stopplösung	Methanol	500	ml/l	
	Eisessig (100 %)	75	ml/l	

Tabelle 2.9 Lösungen für die Proteindetektion

2.1.3.8 Matrix für die MALDI-TOF-Analytik

Puffer/Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
MALDI-TOF-Matrix	Wasser	59,94	%	10 mg Sinapinsäure werden in 10 ml des Wasser-TFA-Acetonitril Gemisches gelöst.
	TFA	0,06	%	
	Acetonitril	40	%	

Tabelle 2.10 Matrix für die MALDI-TOF-Analytik

2.1.4 NÄHRMEDIEN

Puffer/Lösung	Zusammensetzung			Herstellung
LB-Medium flüssig (nach Luria-Bertani)	Trypton	1	%	pH-Wert 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren
	Hefeextrakt	0,5	%	
	NaCl	1	%	
LB-Medium fest (nach Luria-Bertani)	Trypton	1	%	Trypton, Hefeextrakt und NaCl in Wasser lösen, pH-Wert 7,0 mit NaOH einstellen, Agar zugeben und autoklavieren.
	Hefeextrakt	0,5	%	
	NaCl	1	%	
	Agar	1,6	%	
LB-Betain/Sorbitol	Sorbitol	1	M	Sorbitol und Betain in LB-Medium lösen und autoklavieren.
	Betain	2,5	mM	
Rich Medium + Glucose	Trypton	1	%	autoklavieren
	Hefeextrakt	0,5	%	
	Glucose	0,2	%	
	NaCl	1	%	

Tabelle 2.11 Nährmedien

2.1.5 ANTIBIOTIKA

Die rekombinanten Stämme wurden mit Hilfe ihrer Antibiotikaresistenz selektiert. Hierzu wurden den Medien die in Tabelle 2.12 aufgeführten Antibiotika zugesetzt. Angegeben sind die Endkonzentration im Medium (Spalte 2), die Konzentration der Stocklösung (Spalte 3) und die Lösungsmittel.

	Konzentration im Medium [$\mu\text{g/ml}$]	Konzentration der Stocklösung [mg/ml]	Lösungsmittel
Penicillin G	100	100	H ₂ O
Kanamycin	60	60	H ₂ O
Tetracyclin	10	10	Ethanol
Chloramphenicol	34	34	Ethanol

Tabelle 2.12 Antibiotika

2.1.6 VERBRAUCHSMATERIALIEN SOWIE MATERIAL FÜR DIE CHROMATOGRAPHIE UND DIE GELFILTRATION

Bezeichnung	Hersteller
3 MM Papier zum Trocknen von Proteingelen	Whatman International Ltd., UK
FPLC-Säule: XK 26/40 Column	Amersham Biosciences Europe GmbH, 79021 Freiburg
FPLC-Säule: XK 16/40 Column	Amersham Biosciences Europe GmbH, 79021 Freiburg
HPLC-Säule EC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 SA	MACHEREY-NAGEL, 52313 Düren
HPLC-Vorsäule KS 30/4 NUCLEOSIL 100-5 SA	MACHEREY-NAGEL, 52313 Düren
Indikatorpapier	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Kartusche für die Aufreinigung des Fusionsproteins Durchmesser: 2,4 cm Länge: 10 cm	Amersham Biosciences Europe GmbH, 79021 Freiburg
Kieselgelplatten (Merck 60 F254)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Kryoröhrchen, 2 ml, Nalgene®	Nalgene, 20251 Hamburg
Membranfilter 0,2 μm	Schleicher und Schüll, 37586 Dassel
Membranfilter NL 17, 0,45 μm	Schleicher und Schüll, 37586 Dassel
Safe-lock-Gefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, 22331 Hamburg

Tabelle 2.13 Materialien für Chromatographie und Verbrauchsmaterialien

2.2 Laboreinrichtung

2.2.1 REINSTWASSERAUFBEREITUNG

Lösungen und Puffer wurde mit Reinstwasser hergestellt. Für die Wasseraufbereitung wurde das Milli-Q® Water-System der Firma Millipore, Eschborn, eingesetzt. Für molekularbiologische Arbeiten wurde das Reinstwasser autoklaviert. Für HPLC-Trennungen wurde das Reinstwasser filtriert (Membranfilter Porenweite 0,45 μm), um schwebstofffreies Wasser zu erhalten und anschließend entgast.

2.2.2 STERILISATIONSMETHODEN

Temperaturstabile Lösungen, Medien, Puffer sowie Gebrauchsmaterialien wurden mit einem Autoklav der Firma Webeco, Bad Schwartau, bei 121 °C für 20 Minuten (2 bar) autoklaviert. Temperaturempfindliche Lösungen und Puffer wurden durch Sterilfiltration (Sterilfilter Porenweite 0,2 µm, Schleicher und Schüll, Dassel) filtriert.

2.2.3 REINRAUMBEDINGUNGEN / LAMINAR AIRFLOW

Arbeiten, die Reinraumbedingungen erforderten, erfolgten unter einer Werkbank mit turbulenzarmer Verdrängungsströmung (Laminar Airflow, Gerät BSB 4A GELAIRE[®] Flow Laboratories GmbH, Meckenheim).

2.2.4 SONSTIGE GERÄTE UND EINRICHTUNGEN

Bezeichnung		Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese SUB-CELL [®] GT POWER PAC 300		Biorad, 80939 München
Brutschrank Heraeus VT 5042 EK/N2		Heraeus, 63450 Hanau
Geldokumentation UV-Durchlichttisch Chroma 43 Polaroid-Kamera MP4 Geltrockner		Vetter GmbH, Giesloch Kodak Biometra, Göttingen
HPLC Pumpe Detektor Software		Pump L-7100 RF-10A XL EuroChrom [™] 2000 for Windows Integration Package Merck HITACHI, Kyoto, Japan SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, Japan Knauer GmbH, 14163 Berlin
PCR-Thermoblock T3 Thermocycler Biometra [®]		Biometra, Göttingen
pH Meter 766 Calimatic		Knick Elektrische Meßgeräte GmbH, 14163 Berlin
Photometer Uvikon [®] 860 LKB Uvicord SII		Kontron, München Pharmacia, Freiburg
Schüttler HT INFORS Certomat [®] MO II		INFORS AG, CH-4103 Bottmingen, Switzerland Sartorius BBI Systems GmbH, 34212 Melsungen
SDS-PAGE Blue Vertical 100 Biometra Maxigel Consort Microcomputer Electrophoresis Power Suply E 734 Geltrocknungsapparatur		SERVA Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg Biometra, Göttingen Consort, Turnhout, Belgien Biometra, Göttingen
Ultraschall-Desintegrator Sonifier Typ 250		Branson, Danbury, Connecticut, USA

Bezeichnung	Hersteller
Vakuumkonzentrator SpeedVac Plus SC110A, Savant	Savant, USA
Waagen	
H51-Feinwaage	Mettler, Gießen
K7-Grobwaage	Mettler, Gießen
Zentrifugen	
Centrifuge 5804R	Eppendorf, 22331 Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, 22331 Hamburg
CRYOFUGE 5000S	Hereaus Christ, 63450 Hanau

Tabelle 2.14 sonstige Geräte und Einrichtungen

2.3 Oligonukleotide, Plasmide, Bakterienstämme und Zelllinien

2.3.1 OLIGONUKLEOTIDE

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.15 aufgeführt. Die in lyophilisierter Form von der Firma MWG Biotech, Eggenstein, bezogenen Oligonukleotide wurden in autoklaviertem HPLC-Wasser gelöst.

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5' → 3')
Hin-Primer pMAL-c2X, (Sequenzierprimer pMAL-c2X)	5'-GGT CGT CAG ACT GTC GAT GAA G-3'
Rück-Primer pMAL-c2X, (Sequenzierprimer pMAL-c2X)	5'-TGG CGA AAG GGG GAT GTG CTG C-3'
Hin-Primer innerhalb der PKH, (Sequenzierprimer)	5'-AAA GTG GTG CCG CTT GC-3'
Rück-Primer innerhalb der PKH, (Sequenzierprimer)	5'-AGA GTG CAG CAT GTC CAT C-3'
Hin-Primer pET-11a, (Sequenzierprimer pET-11a)	5'-ATA GGG GAA TTG TGA GCG GA-3'
Rück-Primer pET-11a, (Sequenzierprimer pET-11a)	5'-CTT TGT TAG CAG CCG GA-3'
"Hin-Nde I", (zur Erzeugung der <i>Nde I</i> -Schnittstelle)	5'-ATC CAG GCC CCA TAT GGA GGA GGA-3'
"Rück-BamH I" (zur Erzeugung der <i>BamH I</i> -Schnittstelle)	5'-TCA CAA GGA TCC TCT AGA GTC G-3'

Tabelle 2.15 Oligonukleotide ("Primer")

2.3.2 PLASMIDE

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren sowie die erzeugten rekombinanten Plasmide sind in den Tabellen 2.16 und 2.17 angegeben.

Bezeichnung	Eigenschaften	Größe	Bezugsquelle/Referenz
pMAL-c2X	Amp ^r , lacPOZ, Mal E (Expressionsvektor für <i>Escherichia coli</i>)	6721 bp	New England Biolabs, 65926 Frankfurt am Main
pET-11a	Amp ^r , T7lac, lacI (Expressionsvektor für <i>Escherichia coli</i>)	5677 bp	Novagen, Madison, WI, USA, Studier, 1990

Tabelle 2.16 verwendete Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Größe	Bezugsquelle/Referenz
pCDM8-PKH	Das PCR-Produkt der PKH-cDNA von menschlichen Testis wurde in den Vektor pCDM8 ligiert.	4960 bp	Professor Ewen F. Kirkness, Institute for Genomic Research (Rockville, USA)
pMAL-c2X-PKH	Die PKH-Sequenz wurde in den pMAL-c2X-Vektor zwischen die <i>BamH I</i> - und <i>Xba I</i> -Schnittstelle ligiert.	7671 bp	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
pET-11a-PKH	Das PKH-PCR-Produkt wurde zwischen die <i>Nde I</i> - und <i>BamH I</i> -Schnittstelle im pET-11a ligiert	6663 bp	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt

Tabelle 2.17 rekombinante Plasmide

2.3.3 BAKTERIENSTÄMME

Die im Rahmen dieser Arbeit für Klonierungs- und Überexpressionsexperimente verwendeten Bakterienstämme sind hinsichtlich ihrer Genotypen in Tabelle 2.18 beschrieben.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> MC1061(P3)	F ⁻ <i>hsdR</i> (r _k ⁻ ,mk ⁺) <i>araD139</i> Δ(<i>araABC-leu</i>)7679 <i>galU galK</i> Δ <i>lacX74rpsL thi mcrB</i> {P3:Kan ^R Amp ^R (am)Tet ^R (am)}	New England Biolabs, 65926 Frankfurt am Main, Wertman, 1986;49(2):253-62.
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF' Kan	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q Z Δ M15 Tn5 (Kan ^r)]	Stratagene, La Jolla, USA Wertman KF, 1986
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen, Madison, WI 53711, USA Studier, 1990
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3)pRARE (Cm ^R)	Novagen, Madison, WI 53711, USA

Tabelle 2.18 Mikroorganismen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Mikroorganismen (Tabelle 2.19) wurden durch Transformation, der in Tabelle 2.18 aufgeführten Bakterienstämme mit den in Tabelle 2.17 genannten rekombinanten Plasmiden, erhalten.

Nach erfolgreicher Transformation und Überprüfung des rekombinanten Mikroorganismus erfolgte die Konservierung des erzeugten rekombinanten Mikroorganismus. Für die Proteinexpression wurde der rekombinante Organismus auf LB-Medium (fest) reaktiviert.

Anschließend erfolgte die Proteinexpression in Flüssigmedium.

Stamm	rekombinantes Plasmid	rekombinanter Organismus	Sicherheitsstufe
<i>Escherichia coli</i> MC1061/P3	pCDM8-PKH	MC1061/P3(pCDM8-PKH)	1
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF' Kan	pMAL-c2X-PKH	XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH)	1
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF' Kan	pET-11a-PKH	XL1-Blue MRF' Kan (pET-11a-PKH)	1
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	pET-11a-PKH	BL21(DE3)(pET-11a-PKH)	1
<i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3)	pET-11a-PKH	Rosetta(DE3)(pET-11a-PKH)	1

Tabelle 2.19 rekombinante Mikroorganismen

2.3.3.1 Kultivierung und Konservierung von *Escherichia coli*-Stämmen

Die *Escherichia coli*-Stämme wurden stets aus einer Einzelkultur oder aus einer von einer Einzelkultur abgeleiteten Flüssigkultur kultiviert. Dem Kulturmedium wurden je nach Resistenzeigenschaften des Stammes und des Plasmides die für die Selektion notwendigen Antibiotika (Tabelle 2.12) zugesetzt.

Für Festkulturen erfolgte die Kultivierung in einem Thermoschrank der Firma Heraeus und für Flüssigkulturen in einem Schüttler der Firma Infors bei 180 rpm jeweils bei 37 °C für 12–16 (Übernachtkultur) Stunden.

Zur Konservierung eines Stammes wurde 1 ml einer Übernachtkultur mit 1 ml sterilem Glycerol in einem Kryo-Röhrchen (Nalgene[®]) gemischt, 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend bei -80 °C als Dauerkultur eingefroren.

Zur Reaktivierung eines Stammes aus einer Dauerkultur wurde mit einer sterilen Platinimpföse ein Aliquot dieser Dauerkultur auf einer LB-Festmedienplatte im "13-Strichverfahren" (Schlegel, 1992) ausgestrichen und für 12–16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die durch dieses Verfahren gewonnenen Einzelkolonien wurden für nachfolgende Versuche eingesetzt. Das Wachstum von *Escherichia coli*-Flüssigkulturen wurde durch Messen der optischen Dichte (Kapitel 2.6.1.1) verfolgt.

2.3.4 ZELLINIEN

Zur Expression der menschlichen Pyridoxal-Kinase in humanen Zellen wurden menschliche Nierenzellen (HEK-293, ATCC-Nummer CRL-1573) verwendet.

2.4 Methoden der Molekularbiologie

2.4.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS *ESCHERICHIA COLI*

Plasmid-DNA wurde zur Überprüfung der Transformanten, für die automatische Sequenzierung und die Transformation isoliert. Die Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*-Kulturen erfolgte mittels alkalischer Hydrolyse nach Birnboim und Doly (1979). Durch die nachfolgende Neutralisation präzipitieren die denaturierten Proteine und die chromosomale DNA. Diese wurden durch Zentrifugieren abgetrennt und die gelöste Plasmid-DNA mit Isopropanol oder eiskaltem Ethanol gefällt. Die verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 2.3 angegeben.

- 2 ml einer *Escherichia coli*-Übernachtskultur wurden in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 4000xg 5 Minuten sedimentiert.
- Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellsediment in 300 µl Puffer 1 resuspendiert.
- Die Suspension wurde zum Zellaufschluss mit 300 µl Puffer 2 versetzt und das Gefäß bis zur Klärung des Lysates mehrfach invertiert.
- Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 300 µl Puffer 3. Die denaturierten Proteine und copräzipitierte genomische DNA wurden durch Zentrifugieren (20000xg, 10 Minuten) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt.
- Zur weiteren Reinigung wurde der Ansatz mit Kirby-Mix (Tabelle 2.3) oder 0,7 VT Chloroform extrahiert. Die anschließende Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugieren (20000xg).
- Durch Zusatz von 1–2 VT eiskaltem Ethanol oder 0,7 VT Isopropanol wurde die DNA gefällt und durch Zentrifugieren (20000xg, 15 Minuten, 4 °C) abgetrennt.
- Die mit 70 %igem Ethanol gewaschene, anschließend im Vakuum getrocknete DNA wurde in 30 µl Wasser oder TE-Puffer (Tabelle 2.3) aufgenommen.

Zur Isolation größerer Mengen DNA aus *Escherichia coli* wurden 50 ml einer Übernachtskultur eingesetzt und das Puffervolumen auf 5 ml erhöht.

2.4.2 REINIGUNG UND KONZENTRIERUNG VON DNA

Reinigung von Nukleinsäuren

Zur Abtrennung von Proteinen und Zelltrümmern aus DNA-Lösungen (zum Beispiel nach

Plasmidisolierung, Kapitel 2.4.1) wurde die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Methode eingesetzt. Die benötigten Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in Kapitel 2.1 aufgelistet.

- Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 0,7 VT Kirby-Mix (Tabelle 2.3) oder 0,7 VT Chloroform versetzt und vorsichtig mehrfach invertiert.
- Zur Phasentrennung und Abtrennung der denaturierten Bestandteile wurde 5 Minuten zentrifugiert (15000xg).
- Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Gefäß wurde dieser Vorgang wiederholt, bis keine denaturierten Proteine mehr an der Phasengrenze zu beobachten waren.
- Zur Abtrennung von Phenol, das die nachfolgenden enzymatischen Reaktionen stört, wurde mit 0,7 VT Chloroform ausgeschüttelt.
- Durch Zentrifugieren (15000xg, 5 Minuten) wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt.
- Die DNA wurde anschließend, wie unter "Konzentrierung von Nukleinsäuren" beschrieben, gefällt.

Konzentrierung von Nukleinsäuren

Zur Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen fand entweder Ethanol oder Isopropanol unter Zusatz eines einwertigen Salzes Verwendung. Die Fällung mit Ethanol hatte den Vorteil, dass weniger Salze copräzipitieren.

- Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 0,1 VT Natriumacetat-Puffer (3 M, pH-Wert 4,5) versetzt und mit 0,7 VT Isopropanol beziehungsweise 2 VT Ethanol vermischt.
- Zur Fällung der DNA wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (20000xg, 15 Minuten), um die präzipitierte DNA zu sedimentieren.
- Waschen mit Ethanol (70 %) entfernte copräzipitierte Salze und Reste des gegebenenfalls eingesetzten Isopropanols aus dem DNA-Sediment.
- Der Überstand wurde verworfen und die DNA im Vakuum (SpeedVac[®] Plus SC110A, Savant, CA, USA) von Ethanolresten befreit.
- Die getrocknete DNA wurde in dem für die nachfolgenden Versuche notwendigen Lösungsmittel aufgenommen.
- Die anschließende Quantifizierung der DNA erfolgte mit der in Kapitel 2.6.1.2 beschriebenen Methode.

2.4.3 *HYDROLYTISCHE SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUCLEASEN*

Die Restriktionsspaltung wird zur Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung doppelsträngiger DNA eingesetzt. Sie dient sowohl der Herstellung der zur Klonierung verwendeten DNA-Fragmente, als auch der Identifizierung und Kontrolle der entstandenen Klonierungsprodukte.

Restriktionsenzyme sind Endonucleasen, die sich in der Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus unterscheiden. Von den drei verschiedenen Typen der Restriktionsenzyme wird in der Analytik üblicherweise Typ II eingesetzt. Restriktionsenzyme sind in der Lage, doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen zu binden und die Phosphodiesterbindungen hydrolytisch zu spalten. Die durch Restriktionshydrolyse gebildeten Restriktionsfragmente haben eine durch die Lage der Spaltstellen definierte Länge und können durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Abhängig von der DNA-Sequenz ergibt sich für jedes geschnittene DNA-Molekül im Gel ein spezifisches Bandenmuster aus Restriktionsfragmenten. Durch Vergleich mit parallel aufgetragenen Größenstandards kann jedem Fragment seine Größe in Basenpaaren zugeordnet werden.

Das Reaktionsvolumen in den Versuchen betrug in der Regel 20 µl. Um möglichst optimale Inkubationsbedingungen zu erhalten, wurden die vom Hersteller mitgelieferten enzymespezifischen Puffer verwendet. In den Fällen, in denen eine Restriktion mit zwei verschiedenen Enzymen notwendig war, wurde in einem für beide Enzyme geeigneten Puffer inkubiert (Angaben des Herstellers). Die Inkubationstemperatur entsprach ebenfalls den Angaben des Herstellers (meist 37 °C). Die Inkubationszeit betrug 1-3 h.

Die Zusammensetzung eines Standardrestriktionsansatzes war wie folgt:

DNA	1-2 µg
BSA 10x*	2 µl (1 mg/ml)
Enzym*	1-2 µl (entsprechend den Herstellerangaben)
Puffer*	2 µl (10x Puffer)
Wasser	ad 20 µl

* Lösungen der Hersteller

Die Kontrolle der Restriktionshydrolyse erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.2.1). Sollten die durch Restriktionshydrolyse gewonnenen DNA-Fragmente in nachfolgenden Reaktionen (Ligationen) eingesetzt werden, wurde der Restriktionsansatz mit Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus der Gelmatrix isoliert (Kapitel 2.6.2.3).

2.4.4 LIGATION

DNA-Fragmente können mit Hilfe der T4-DNA-Ligase unter ATP-Verbrauch verbunden werden (Ligation). Das Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen kompatiblen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden zweier DNA-Moleküle.

Handelte es sich um die Ligation eines kürzeren DNA-Fragmentes ("Insert") und eines Vektorfragmentes, wurde das Insert in fünffachem Überschuss im Vergleich zum Vektor eingesetzt. Der Standardligationsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Vektor	1 T
Insert	5 T
ATP	1,5 µl (10 mM)
Puffer	1,5 µl (10x)
Ligase	1 µl (T4-DNA-Ligase 5 Weiss units/µl)
Wasser	ad 15 µl

Die Ligationsansätze wurden jeweils 16 Stunden bei 16 °C inkubiert und anschließend 10 Minuten auf 65 °C erhitzt, um die Ligase zu inaktivieren. Für die nachfolgenden Transformationen wurden die Ligationsprodukte ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ligation zur Klonierung der Pyridoxal-Kinase in die Vektoren pMAL-c2X und pET-11a eingesetzt.

2.4.5 TRANSFORMATION VON *ESCHERICHIA COLI* MIT PLASMID-DNA

Die Transformation bezeichnet die Übertragung von DNA in eine Bakterienzelle.

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden die Methode nach Inoue et al. (1990) und die Rubidiumchloridmethode (modifizierte Methode nach Hanahan (1983)) angewendet. Bei beiden Methoden handelt es sich um chemische Methoden zur Herstellung transformationskompetenter Zellen. Durch die Behandlung der *Escherichia coli*-Zellen mit unterschiedlichen Elektrolytlösungen wird die Zellwand gelockert und das Einbringen von Fremd-DNA ermöglicht.

Die Arbeitsschritte wurden unter sorgfältiger Eiskühlung durchgeführt. Die verwendeten Lösungen, Reaktionsgefäße und Zentrifugen wurden vorgekühlt. Die frisch hergestellten Lösungen (Tabelle 2.4) wurden bis zum Gebrauch auf Eis gehalten.

2.4.5.1 *Herstellung transformationskompetenter Escherichia coli-Zellen mit der Methode nach Inoue et al. (1990)*

- 150 ml LB-Medium wurden mit dem für den entsprechenden Stamm notwendigen Antibiotikum und 1,5 ml einer Vorkultur angeimpft und bei 37 °C, 180 rpm im Tischschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis maximal 0,7 inkubiert.
- Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 4000xg bei 4 °C, 10 Minuten sedimentiert.
- Die Bakterienkultur wurde in 30 ml TB-Puffer resuspendiert, für mindestens 10 Minuten auf Eis gelagert und erneut durch Zentrifugieren sedimentiert (4000xg, 4 °C, 10 Minuten). Nach diesem Waschschrift wurde das Zellpellet in 5 ml TB-Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde mit 350 µl DMSO versetzt und in Aliquots zu jeweils 200 µl aufgeteilt.
- Sollte die Transformation am selben Tag durchgeführt werden, wurde die Bakteriensuspension bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Andernfalls wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.4.5.2 *Herstellung transformationskompetenter Escherichia coli-Zellen mit der Rubidiumchloridmethode*

- In einem 1 L-Kolben wurden 250 ml LB-Medium (20 mM MgSO₄) mit dem für den entsprechenden Stamm notwendigen Antibiotikum und 2,5 ml einer Vorkultur angeimpft und bei 37 °C, 180 rpm im Tischschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis maximal 0,6 inkubiert.
- Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 4000xg bei 4 °C, 5 Minuten sedimentiert.
- Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 100 ml TFB1-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert.
- Die Bakteriensuspension wurde erneut bei 4000xg, 4 °C für 5 Minuten sedimentiert und anschließend vorsichtig in 10 ml TFB2-Puffer resuspendiert und für 15 bis 60 Minuten auf Eis inkubiert.
- Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu jeweils 200 µl aufgeteilt.
- Sollte die Transformation am selben Tag durchgeführt werden, wurde die Bakteriensuspension bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Andernfalls wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur

Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.4.5.3 *Transformation von Escherichia coli mittels Hitzeschockverfahren*

Zur Transformation wurden die nach einem der oben beschriebenen Verfahren (Kapitel 2.4.5.1 oder 2.4.5.2) gewonnenen transformationskompetenten Zellen einem Kälte/Hitze-Programm unterzogen, um die in Lösung befindliche DNA aufzunehmen. Neben den Transformationsansätzen erfolgte eine Transformation mit einem Standardplasmid (positiv Kontrolle) und eine Transformation mit Wasser (negativ Kontrolle).

- 200 µl Bakteriensuspension wurden mit 10 ng Plasmid oder 1–5 µl eines Ligationsansatzes (Kapitel 2.4.4) versetzt, gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert.
- Anschließend wurden die Zellen für 42 Sekunden bei 42 °C (Hitzeschock) und danach für 2 Minuten auf Eis inkubiert.
- Zu der Zellsuspension wurden 800 µl Nährmedium gegeben, und der Transformationsansatz wurde bei 37 °C im Rundschüttler (180 rpm) inkubiert. Dem Medium wurden die für die Selektion notwendigen Antibiotika zugesetzt. Die dem plasmidcodierten Selektionsmarker angepasste Regenerationszeit betrug für β -Laktamantibiotika und Tetracyclin 30 Minuten und für Kanamycin 60 Minuten.
- Abhängig von der erwarteten Transformationseffizienz wurde ein Aliquot der Zellsuspension auf einer vorgewärmten Agar-Platte ausgestrichen. Sollte der gesamte Transformationsansatz auf einer Platte ausgestrichen werden, wurde das Medium abzentrifugiert, das Zellpellet in 100 µl frischem Medium aufgenommen und anschließend ausgestrichen.
- Die Agar-Platten wurden für 12 bis 16 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Kontrolle des Transformationsergebnisses

Der Erfolg der Transformation wurde mit drei verschiedenen Methoden überprüft.

Im ersten Schritt wurde durch Restriktionshydrolyse (Kapitel 2.4.3) nach vorheriger Plasmidpräparation (Kapitel 2.4.1) kontrolliert, ob das Insert im Plasmid des jeweiligen Klonen enthalten war. Bei positiven Klonen wurde im nächsten Schritt die Proteinexpression mit Hilfe der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.3) und im letzten Schritt die erfolgreiche Umklonierung durch Sequenzierung (Kapitel 2.4.9) der DNA kontrolliert.

2.4.6 TRANSFEKTIONSMETHODEN

Die von Professor Ewen F. Kirkness erhaltene Pyridoxal-Kinase lag im Vektor pCDM8 vor. Dieser Vektor ermöglichte die Expression sowohl in *Escherichia coli* als auch in humanen Zelllinien. In Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Kassack, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Bonn, wurde versucht, die Pyridoxal-Kinase in HEK 293-Zellen (human embryonic kidney cells) zu exprimieren.

2.4.6.1 Transfektion der HEK-Zellen

- Die HEK 293-Zellen wurden in T75-Kulturflaschen in Dulbecco's Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin G (100 u/ml), fötalem Kälberserum (FKS) und 5 mM Glutamin kultiviert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreicht hatten, erfolgte das Ernten und Aussäen der Zellen in Petrischalen (Durchmesser 6 cm). Hierzu wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde Trypsinlösung (0,05 % mit 0,02 % EDTA) auf die Zellen gegeben. Die proteolytische Wirkung des Enzyms wurde genutzt, um die adhärent wachsenden Zellen abzulösen. Nach einer Einwirkdauer von etwa 1–3 Minuten wurde die Trypsinlösung abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Nährmedium resuspendiert und anschließend gleichmäßig in Petrischalen verteilt. Dieses Aussäen erfolgte 20 Stunden vor der geplanten Transfektion.
- Am Tag der Transfektion wurden die Plasmidlösung (pCDM8-PKH) und das Roti[®]-Fect-Transfektionsreagenz auf Raumtemperatur gebracht und gemischt.
- Für jede Petrischale wurden folgende Lösungen in je einem Eppendorfgefäß vorbereitet:
 - a) 4 µg Plasmid-DNA in 120 µl Nährmedium (ohne FKS und Antibiotika)
 - b) 20 µl Roti[®]-Fect in 120 µl Nährmedium (ohne FKS und Antibiotika)
- Die Lösungen a und b wurden miteinander vereinigt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Diese Mischung wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert, um die Bildung von DNA-Lipidkomplexen zu ermöglichen.
- Während der 30 minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen in den Petrischalen auf die Transfektion vorbereitet. Das Medium wurde abgesaugt

und die Zellen mit je 2 ml PBS (Tabelle 2.4) gewaschen. Anschließend wurden jeweils 2,0 ml Medium ohne Antibiotika zugesetzt.

- Nach Ablauf der 30 minütigen Inkubationszeit wurden jeweils 240 µl der DNA-Lipidkomplexlösung unter gutem Vermischen der Lösungen zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für sechs Stunden inkubiert.
- Nach Ablauf der 6 Stunden wurden zu jedem Ansatz 5 ml Nährmedium gegeben und für weitere 17 Stunden inkubiert.
- Nach Ablauf der 17 Stunden wurden die Zellen mit jeweils 2 ml Nährmedium gewaschen und danach mit 10 ml vollständigem Nährmedium versetzt. Es schloss sich eine weitere Inkubation für 48 Stunden an.
- Nach Ablauf der 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und zunächst fünfmal mit PBS (eiskalt, 3 ml) gewaschen. Dann wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines Zellscrapers von der Petrischale gelöst und in ein Zentrifugengefäß pipettiert. Die Petrischalen wurden noch einmal mit 3 ml PBS gespült. Die Spüllösung wurde ebenfalls zur Zellsuspension gegeben.
- Die Zellen wurden zentrifugiert (1000xg, 5 Minuten, 4 °C) und anschließend homogenisiert (Stufe 6, 30 Sekunden).
- Der Überstand (Proteinrohextrakt) wurde durch Zentrifugieren abgetrennt (40000xg, 60 Minuten, 4 °C) und bei -80 °C eingefroren.

Der so gewonnene Proteinrohextrakt der menschlichen Pyridoxal-Kinase wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte für Aktivitätsmessungen eingesetzt.

2.4.7 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die von Saiki et al. (1988) beschriebene Polymerasekettenreaktion ist ein *in vitro* Verfahren zur schnellen und gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz. Dazu müssen entweder Teilsequenzen oder die flankierenden DNA-Sequenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes bekannt sein. Von diesen bekannten DNA-Abschnitten werden Oligonukleotide (Primer) abgeleitet, von denen die DNA-Amplifikation ausgeht. Abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden können neue Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen generiert werden.

Die PCR läuft in drei sich zyklisch wiederholenden temperaturabhängigen Schritten ab.

1. Denaturierung Die doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen denaturiert. Es entsteht Einzelstrang-DNA.
2. Annealing Nach Absenkung der Temperatur lagern sich die Oligonukleotide, die zu Bereichen an den Seiten der Zielregion des jeweils gegenüberliegenden DNA-Stranges komplementär sind, an die Einzelstränge an.
3. Extension Nach Erhöhung der Temperatur werden zwei neue Komplementärstränge des DNA-Zielbereiches durch thermostabile DNA-Polymerasen vom 3'-OH-Ende des jeweiligen Primers ausgehend synthetisiert.

Die Wiederholung der einzelnen Schritte der PCR führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Matrize, entsprechend folgender Gleichung:

$$N_n = N_0 \times 2^n$$

N_n	Anzahl der Moleküle nach n Zyklen
N_0	Anzahl der Moleküle zu Reaktionsbeginn
n	Anzahl der Zyklen

Mit zunehmender Zyklenzahl entspricht die Bildung der PCR-Produkte nicht mehr dieser Gleichung, da die Aktivität der Polymerase abnimmt und die Konzentration der Nukleotide und der Oligonukleotide sinkt.

2.4.7.1 Reaktionsbedingungen für die PCR

Die Reaktionsbedingungen wurden in Abhängigkeit von den verwendeten Oligonukleotiden, der Polymerase, der Matrize und der Länge des zu amplifizierenden Segmentes variiert.

Für die Standardreaktionen wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt. Da die Fehlerrate (Mutationshäufigkeit/bp pro Verdopplung) der *Taq*-Polymerase bei 8×10^{-6} liegt, wurde für die Erzeugung der *Nde I*- und *BamH I*-Schnittstellen und die Amplifikation der Pyridoxal-Kinase die *Pfx*-Polymerase (aus *Thermococcus species KOD*) verwendet. Diese Polymerase zeichnet sich durch ihre 3'→5'-Exonuklease-Aktivität aus, durch die falsch eingebaute Nukleotide am 3'-Ende entfernt werden ("proofreading activity"). Da die Prozessivität dieses Enzyms im Vergleich zur *Taq*-Polymerase

vermindert ist, muss dies bei der Festlegung der Extensionszeit berücksichtigt werden.

Die Zusammensetzung für einen Standard PCR-Ansatz war wie folgt:

Matrize:	10 fg-10 ng
Oligonukleotide:	1 μ M
Desoxynukleotide:	je 250 μ M
Puffer (10fach):	0,1 VT
Polymerase:	1 u
Wasser:	ad 50 μ l

Die Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide wurde entsprechend der Wallace-Regel (Sambrook und Russell, 2001) ermittelt:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C}) + 2 \times (\text{Anzahl A} + \text{Anzahl T})$$

Die daraus abgeleitete "Annealing"-Temperatur wurde so gewählt, dass diese mindestens 5 °C unter der Schmelztemperatur des am niedrigsten schmelzenden Oligonukleotides lag. Die Extensionszeit wurde der Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes angepasst.

Die Kontrolle und Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.2.1). Das PCR-Produkt wurde mit DNA-Auftragspuffer (6fach konzentriert, Tabelle 2.5) gemischt und elektrophoretisch aufgetrennt. Sollten die Amplifikate kloniert werden, wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (Kapitel 2.6.2.3).

2.4.8 KOLONIERUNG DER PKH

Die für die humane Pyridoxal-Kinase (PKH) codierende DNA wurde von Professor Ewen F. Kirkness, Institute for Genomic Research, Rockville, zur Verfügung gestellt (Hanna et al., 1997). Die DNA befand sich zunächst im Vektor pCDM8 und musste in einen anderen Expressionsvektor umkloniert werden, damit eine Expression in *Escherichia coli* möglich wurde. Um das Protein möglichst einfach aufzureinigen zu können, wurde das Protein Fusion & Purification System der Firma New England Biolabs gewählt. Als Expressionsvektor diente der Vektor pMAL-c2X (Abbildung 7.3). Durch Fusion der PKH-DNA-Sequenz, mit der für ein Maltose-bindendes Protein codierenden Sequenz unter Erhalt des Leserasters, entstand ein Fusionsprotein. Dieses ist zusammengesetzt aus der Pyridoxal-Kinase und trägt N-terminal das Maltose-bindende Protein (MalE) aus *Escherichia coli* als Fusionsan-

teil. Da der Maltose-bindende Anteil des Fusionsproteins größer ist als die Pyridoxal-Kinase (MBP: 42,5 kDa und PKH: 35,1 kDa), kann das Maltose-bindende Protein die Aktivität der Kinase beeinflussen. Um diesen möglichen Einfluss auszuschließen, wurde die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA-Sequenz in einen zweiten Expressionsvektor, pET-11a (Firma Novagen, Abbildung 7.4) inseriert, um die Expression der Pyridoxal-Kinase als natives Protein ohne Fusionsanteil zu ermöglichen.

2.4.8.1 Erzeugung des rekombinanten Vektors pMAL-c2X-PKH

Der *Escherichia coli*-Stamm MC1061/P3 wurde mit dem rekombinanten Vektor pCDM8-PKH transformiert und das amplifizierte Plasmid isoliert (Kapitel 2.4.1). Mit den Restriktionsenzymen *Xba I* und *BamH I* wurde die für die Pyridoxal-Kinase codierende Gensequenz aus dem rekombinanten pCDM8-PKH Vektor isoliert (Erzeugung des Inserts), durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.2) gereinigt und stand anschließend für die Ligation zur Verfügung (Kapitel 2.4.4). Der Vektor wurde mit *Xba I* hydrolysiert. Mit dem Insert und dem linearisierten Vektor wurde eine erste Ligation durchgeführt. Die Aufreinigung des Ligationsansatzes erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Die Bande aus Insert und Vektor wurde ausgeschnitten und einer erneuten Restriktionshydrolyse mit *BamH I* unterzogen. Nach Inaktivierung des Restriktionsenzymes (68 °C, 20 Minuten) und erneuter Ligation wurde der rekombinante Vektor pMAL-c2X-PKH gebildet.

2.4.8.2 Erzeugung des rekombinanten Vektors pET-11a-PKH

Der *Escherichia coli*-Stamm MC1061/P3 wurde mit dem rekombinanten Vektor pCDM8-PKH transformiert. Anschließend wurde der amplifizierte rekombinante Vektor reisoliert (Kapitel 2.4.1). Der rekombinante Vektor pCDM8-PKH wurde als Matrize in der PCR (Kapitel 2.4.7) eingesetzt, um eine *Nde I*- und eine *BamH I*-Schnittstelle zu erzeugen. Sie ermöglichten die Inserierung der für die Pyridoxal-Kinase codierenden DNA in den Vektor pET-11a unter Bildung des rekombinanten Vektors pET-11a-PKH.

Für die PCR mit der *Pfx*-Polymerase fand folgendes PCR-Programm im Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) Anwendung:

1. Schritt		
Denaturierung	95 °C	2 Minuten
2. Schritt		
Denaturierung	95 °C	0,5 Minuten
Annealing	55 °C	0,3 Minuten
Extension	60 °C	1,3 Minuten
35 Zyklen		
3. Schritt		
Extension	60 °C	10 Minuten
Kühlung	4 °C	bis zur Probenentnahme

Das mit den Primern "*Hin-Nde I*" und "*Rück-BamH I*" (Tabelle 2.15) erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Nde I* und *BamH I* hydrolysiert und durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.2) gereinigt. Durch Ligation des mit den Restriktionsenzymen *Nde I* und *BamH I* hydrolysierten Vektors pET-11a mit der für die Pyridoxal-Kinase codierenden DNA wurde der rekombinante Vektor pET-11a-PKH erhalten.

Mit diesem Ligationsansatz wurden XL1 Blue MRF' Kan-Zellen transformiert (Kapitel 2.4.5). Die Transformanden wurden überprüft, ob sie das rekombinante Plasmid pET-11a-PKH enthielten. Von positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Transformation in den Expressionsstamm BL21(DE3) überführt. Der so erhaltene rekombinante Stamm BL21(DE3)(pET-11a-PKH) wurde für die nachfolgenden enzymkinetischen Untersuchungen eingesetzt.

2.4.9 DNA-SEQUENZIERUNG

Die DNA-Sequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem modifizierten Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977) bestimmt.

Die zu sequenzierende DNA wird dabei einer PCR-ähnlichen Reaktion (*cycle sequencing*) unterzogen. Die Einzelstrangsynthese geht hier nur von einem Oligonukleotid ("Primer") aus. Das Reaktionsgemisch enthält die Matrize, das entsprechende Oligonukleotid, Desoxy-, Didesoxynukleotidgemische und eine DNA-Polymerase. Die im Ansatz befindlichen Didesoxynukleotide sind basenspezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und verursachen an der Stelle ihres Einbaus einen Kettenabbruch (Termination). Der Einbau der Didesoxynukleotide erfolgt statistisch verteilt, so dass man ein Gemisch aller möglichen Kettenlängen erhält. Die Reaktionsprodukte einer Sequenzierreaktion werden in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, und das Bandenmuster wird ausgewertet.

2.4.9.1 Sequenzierreaktion

Für die automatische Sequenzierung wurde das "ABI PRISM™ Ready Reaction Cycle Sequencing Kit / Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.0" der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, verwendet. Es enthält die AmpliTaq® DNA Polymerase FS, die Desoxynukleotide (dNTPs) und die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTPs) in einem Puffer (Big Dye Terminator Mix). Durch Plasmidpräparation gewonnene DNA diente als Matrize. Die verwendeten Oligonukleotide waren komplementär zum Klonierungsvektor beziehungsweise zu der zu sequenzierenden DNA (Tabelle 2.15).

Die Zusammensetzung einer Standardsequenzierreaktion war wie folgt:

Big Dye Terminator Mix	2,0 µl
DNA-Template	250 ng
Primer	15 pmol
Wasser	ad 10 µl

Die DNA wurde mit dem Primer und Wasser in einem Reaktionsgefäß gemischt und im PCR-Block (Biometra T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen) auf 4 °C gekühlt. Jedem Reaktionsansatz wurden 2 µl des auf Eis aufgetauten Big Dye Terminator Mix zugefügt. Nach Mischen der Komponenten wurde das für den jeweiligen Reaktionsansatz optimale Temperaturprogramm gestartet.

Das der Schmelztemperatur der Oligonukleotide angepasste Temperaturprogramm durchlief jeweils 40 Zyklen.

Temperaturprogramme für die verwendeten Oligonukleotide:

		Primer pET	Primer PKH	Primer pMAL
Denaturierung	[30 Sekunden]	96 °C	96 °C	98 °C
Annealing	[15 Sekunden]	45 °C	47 °C	50 °C
Extension	[4 Minuten]	60 °C	60 °C	60 °C
Zyklen 40				

Nach Ablauf des Temperaturprogrammes wurden die Reaktionsansätze bis zur Weiterverarbeitung auf 4 °C gekühlt und anschließend wurden die Reaktionsprodukte mit der in Kapitel 2.4.9.2 beschriebenen Methode gereinigt.

2.4.9.2 *Reinigung der Reaktionsprodukte der Sequenzierreaktionen*

Um die Reaktionsprodukte nach elektrophoretischer Auftrennung im Polyacrylamidgel korrekt zu detektieren, mussten sie von überschüssigen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden befreit werden.

- Zum Reaktionsansatz wurden 40 µl HPLC-Wasser, 5 µl Natriumacetatlösung (3 M, pH-Wert 4,6) und 125 µl Ethanol (100 %) gegeben. Nach dem Überführen der kompletten Lösung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden die Abbruchfragmente durch Zentrifugieren (20000xg, 15 Minuten) präzipitiert.
- Nach vorsichtigem Abdekantieren des Überstandes wurde das Präzipitat mit 300 µl frisch verdünntem Ethanol (70 %) gewaschen.
- Die DNA-Abbruchfragmente wurden nach erneutem Zentrifugieren (20000xg, 5 Minuten) und vorsichtigem Abdekantieren der Waschlösung im Vakuum getrocknet (SpeedVac[®] Plus SC110A, Savant, CA, USA).

Die getrocknete DNA konnte bis zur Weiterbehandlung mehrere Tage bei -20 °C aufbewahrt werden. Unmittelbar vor der elektrophoretischen Auftrennung der Abbruchfragmente im Polyacrylamidgel erfolgte der Zusatz von 2 µl Sequenzierpuffer zugegeben.

2.4.9.3 *Trennung im Sequenziergel und Detektion*

Die elektrophoretische Auftrennung der gereinigten Sequenzierproben erfolgte in einem denaturierenden 4,5 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgel mit dem ABI PRISM[™] 377 Gelsystem (Applied Biosystems/Perkin-Elmer, Weiterstadt). Die verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

- Die Glasplatten wurden zunächst mit warmen Leitungswasser und anschließend mit Alconox[®]-Lösung gründlich gewaschen, um die Hintergrundfluoreszenz bei der Detektion mit Laserlicht zu minimieren.
- Die Glasplatten wurden getrocknet und mit dem dazwischen liegenden Abstandhalter (Spacer, 0,3 mm) in die Gelapparatur eingespannt.
- Die frisch hergestellte Acrylamidlösung (4,5 %) wurde mit einer Wasserstrahlpumpe entgast.
- Die Gellösung wurde mit TEMED (10 µl) und APS (233 µl, 10 %) versetzt und gut gemischt, um eine gleichmäßige Polymerisation zu erzielen.
- Die Lösung wurde sofort luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen, und ein Taschenkamm wurde mit der Rückseite so eingesetzt, dass bei der

Polymerisation ein glatter Gelabschluss entstand. Die Auspolymerisation des Gels erfolgte in horizontaler Lage (circa 1 Stunde).

- Nach Polymerisation des Gels wurden die Gelreste am Halterahmen entfernt und der Taschenkamm mit 36 Zähnen so eingesetzt, dass sich 36 Taschen zur Probenaufnahme bildeten.
- Das Gel wurde vertikal in das Sequenziergerät eingespannt und die Pufferkammern mit Elektrophoresepuffer gefüllt.
- Nach einem Vorlauf zur Qualitätsüberprüfung des gegossenen Gels wurde das Gel auf 48 °C erwärmt.
- Die DNA-Proben wurden mit 2 µl Probenpuffer versetzt, 3 Minuten bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.
- Die Probestaschen wurden mit Elektrophoresepuffer gespült und je 1 µl DNA-Sequenzierprobe wurde in die Taschen gegeben.
- Die Elektrophorese erfolgte bei 2400 V und konstanter Geltemperatur (48 °C) über 5 Stunden. Der Sequenzierlauf wurde permanent durch computergestützte Fluoreszenzdetektion verfolgt. Mit Hilfe eines Computerprogramms (Sequence Analysis 3.0, Applied Biosystems, Weiterstadt) wurden die Daten ausgewertet und standen zur Weiterverarbeitung zur Verfügung.

2.4.9.4 Computergestützte Analyse der Sequenzierdaten

Mit verschiedenen Programmmodulen des Programms *Lasergene 99 DNASTar* (DNASTAR Inc., London) wurden die vom Sequenzer erhaltenen Rohdaten ausgewertet. Mit dem Programmmodul SeqMan wurden die Sequenzrohdaten vom Sequenzer überprüft und bearbeitet.

Weitere Programme, die zur Analyse von Sequenzen eingesetzt wurden, sind:

- Prosite <http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>
- SWISS-MODEL Repository <http://swissmodel.expasy.org/repository/>

2.5 Methoden der Proteinchemie

2.5.1 GEWINNUNG DER REKOMBINANTEN PYRIDOXAL-KINASE AUS *ESCHERICHIA COLI*

Die Pyridoxal-Kinase wurde sowohl als Fusionsprotein als auch als natives Enzym heterolog überexprimiert. Um das Maltose-bindende Fusionsprotein zu gewinnen, wurden

Bakterien des *Escherichia coli*-Stammes XL 1 Blue MRF' KAN mit dem für die Pyridoxal-Kinase codierenden rekombinanten Plasmid pMAL-c2X-PKH (Tabelle 2.17) transformiert (Kapitel 2.4.5). Zur Gewinnung der Pyridoxal-Kinase als natives Protein wurden Bakterien des Stammes BL21(DE3) mit dem rekombinanten Plasmid pET-11a-PKH (Tabelle 2.17) transformiert.

In beiden Fällen erfolgte die Aufreinigung durch Affinitätschromatographie. Der Affinitätschromatographie der nativen Pyridoxal-Kinase schloss sich eine Gelfiltration an.

2.5.1.1 *Anzucht von Escherichia coli-Zellen für die Proteinexpression*

Vorkulturen

Zur Erzeugung von Vorkulturen wurden 3 ml Medium mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte inokuliert. Dem Medium wurden die entsprechenden zur Selektion notwendigen Antibiotika zugesetzt. In der Regel inkubierten die Kulturen 12–16 Stunden (37 °C, 180 rpm).

Übernachtskulturen

Aus der Vorkultur wurden Übernachtskulturen gewonnen. Dafür wurden 50 ml steriles, mit den entsprechenden Antibiotika versetztes Medium, mit 50 µl Vorkultur beimpft. Die Kulturen inkubierten 12–16 Stunden (37 °C, 180 rpm).

Hauptkulturen

Die Gewinnung der Pyridoxal-Kinase in größeren Mengen erfolgte in Hauptkulturen. Dafür wurde 1 Liter Medium mit 1/100 Volumenteil Übernachtskultur inokuliert und mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Kulturen inkubierten mindestens 24 Stunden (180 rpm, HAT Infors-Schüttler, Infors, Bottmingen, CH).

2.5.1.2 *Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte aus Escherichia coli*

Zur Gewinnung des zellfreien Proteinrohextraktes des Fusionsproteins wurde Rich Medium (Tabelle 2.11) mit 1/100 Volumenteil Übernachtskultur mit Penicillin G (100 µg/ml) und Kanamycin (60 µg/ml) inokuliert. Für die Überexpression der nativen Pyridoxal-Kinase wurde LB Medium (Tabelle 2.11) mit Penicillin G (100 µg/ml) versetzt und ebenfalls mit 1/100 Volumenteil Übernachtskultur inokuliert.

Sobald die OD₆₀₀ einen Wert von 0,5 erreichte, wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,3 mM (Fusionsprotein) beziehungsweise 1,0 mM (native Pyridoxal-Kinase)

zugesetzt. Das zugesetzte IPTG induziert die plasmidcodierte Expression der Proteine. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Kontrollprobe (2 ml) ("nicht-induzierte Probe") genommen, um die Expression zu kontrollieren. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C (Fusionsprotein) beziehungsweise 37 °C (natives Protein).

Die Inkubationszeit betrug 4 Stunden für das Pyridoxal-Kinasefusionsprotein und 24 Stunden für die native Pyridoxal-Kinase. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine weitere Probennahme (1 ml, "induzierte Probe") zur Expressionskontrolle und die Zellen wurden durch Zentrifugieren (bei 4° C, 4000 x g, 20 Minuten) sedimentiert. Das aus 1 Liter Kultur gewonnene Zellsediment wurde in 10 ml Säulenpuffer (Tabelle 2.7) aufgenommen und die Zellsuspension bei -20 °C eingelagert. Die Lagerung erfolgte mindestens für eine Nacht (maximal eine Woche), da das Einfrieren die nachfolgende Zelllyse begünstigte.

Zur Kontrolle der korrekten Synthese der rekombinanten Proteine wurden parallel *Escherichia coli*- Kulturen bearbeitet, die den nicht rekombinanten Vektor pMAL-c2X beziehungsweise pET-11a ("Leer"-Plasmid) enthielten.

Induktionskontrolle

Die Synthese der rekombinanten Proteine wurde durch SDS-PAGE kontrolliert (Kapitel 2.6.3). Es wurde jeweils eine induzierte und eine nicht-induzierte Probe eines rekombinanten Klones mit den Proben eines Klones verglichen, der das "Leer"-Plasmid enthielt.

Zeigte das Proteingel eine Proteinbande mit dem erwarteten Molekulargewicht für das rekombinante Protein, wurde von einer korrekten Proteinexpression ausgegangen. Das gewonnene Zellpellet fand für die weitere Proteingewinnung Einsatz.

2.5.1.2.1 Zelllyse durch Ultraschall

Das gefrorene Zellpellet (Kapitel 2.5.1.2) wurde langsam im Eisbad aufgetaut, und die Zellen wurden mittels gepulstem Ultraschall (Stufe 5, Intensität 50 %) aufgeschlossen. Als Gerät diente ein Ultraschall-Desintegrator (Sonifier Typ 250, Branson, Danbury, Connecticut, USA). Während der Ultraschallbehandlung wurde die Zellsuspension ständig in Eiswasser gekühlt, um eine Erwärmung der Lösung und damit einen Aktivitätsverlust der Pyridoxal-Kinase zu vermeiden. Die Probenbeschallung erfolgte in zwanzig Zyklen für 15 Sekunden. Eine Pause von 15 Sekunden zwischen den einzelnen Zyklen sollte ein Erwärmen der Probe verhindern.

Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (4 °C, 9000 x g, 30 Minuten). Im Überstand

(Rohextrakt) befanden sich die löslichen Proteine und im Sediment die unlöslichen Proteine. Der sofort dekantierte Überstand, Proteinrohextrakt, wurde nach Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (Kapitel 2.6.1.3) zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt oder chromatographisch gereinigt, um die reine Pyridoxal-Kinase zu erhalten.

2.5.1.3 *Affinitätschromatographie Maltose-bindender Fusionsproteine*

Bei der Expression des Fusionsproteins bildete sich ein Protein, das aus dem Maltose-bindenden Anteil (Male) und der Pyridoxal-Kinase bestand. Der Maltose-bindende Anteil diente der Aufreinigung des Fusionsproteins in einem Schritt (Kellermann und Ferenci, 1982). Die Reinigung wurde nach Anleitung des Handbuches "pMAL™ Protein Fusion and Purification System" (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Handbuch auf der CD-ROM unter /Literatur/New England Biolabs/) unter nativen Bedingungen durchgeführt. Der Maltose-bindende Anteil des Fusionsproteins (MBP) adsorbiert hierbei spezifisch und reversibel an die Amylose-Affinitäts-Matrix. Nach Auswaschen der unspezifisch an diese Matrix bindenden Proteine sollte nur noch das Maltose-bindende Fusionsprotein an der Matrix verankert sein. Dieses wurde durch einen maltosehaltigen Puffer von der Matrix eluiert und stand für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Die Aufreinigung erfolgte bei 4 °C. Die Proben wurden auf Eis gelagert. Für die Aufreinigung fand eine spezielle Matrix (Amylose Resin, New England Biolabs, Frankfurt am Main) Anwendung, die auf ihrer Oberfläche Amylose-Einheiten besaß. 15 ml des Amylose-Harzes (Bindungskapazität 3 mg/ml) wurden in eine 2,5 cm x 10 cm Kartusche gefüllt und mit 8 Säulenvolumina (120 ml) Säulenpuffer (Tabelle 2.7) äquilibriert. Mit einer Flussrate von 1 ml/min wurde der Proteinrohextrakt auf die zuvor äquilibrierte Säule geladen. Dabei wurde das Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Anteil an die Matrix gebunden. Der proteinhaltige Durchlauf wurde aufgefangen und erneut über die Säule gegeben. Insgesamt durchlief der Proteinextrakt dreimal die Säule, um möglichst die gesamte im Proteinrohextrakt enthaltene Pyridoxal-Kinase und wenig weitere Proteine unspezifisch an die Säulenmatrix zu binden. Durch Spülen mit 12 Säulenvolumina Säulenpuffer (180 ml) wurden alle Begleitproteine von der Säule entfernt. Der Verlauf des Waschvorganges wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm kontrolliert (Durchflussphotometer). Die Elution des Pyridoxal-Kinasefusionsproteins erfolgte mit maltosehaltigem Säulenpuffer (Elutionspuffer, Maltose 10 mM). Maltose verdrängt aufgrund seiner höheren Affinität zur Amylosematrix kompetitiv das Fusionsprotein.

Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 3 ml aufgefangen. Die Protein-Konzentration jeder Fraktion wurde nach Bradford (Kapitel 2.6.1.3) gegen BSA bestimmt. Der Grad der

Reinheit wurde durch SDS-PAGE (Kapitel 2.6.3) verfolgt.

Die Maltose-bindende Domäne konnte nach Aufreinigung des Fusionsproteins durch die Protease Faktor Xa abgespalten werden (Kapitel 2.5.1.3.1).

2.5.1.3.1 Hydrolyse des Maltose-bindenden Fusionsproteins mit der Protease Faktor Xa

Mit dem Vektor pMAL-c2X überexprimierte Fusionsproteine besitzen im Bereich vor dem Polylinker eine für die Protease Faktor Xa codierende Erkennungssequenz (Ile-Glu-Gly-Arg, Abbildung 3.1). Diese Sequenz ist so lokalisiert, dass der Fusionsanteil des Proteins (Maltose-bindendes Protein) bis auf einen Rest von wenigen Aminosäuren vom Zielprotein abgespalten werden kann.

Im allgemeinen weisen Fusionsproteine eine höhere Stabilität als die nativen Zielproteine auf. Beeinträchtigt der Fusionsanteil die Enzymaktivität, ist die Hydrolyse jedoch notwendig. Diese erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (Handbuch auf der beiliegenden CD-ROM /Herstellerangaben/New England Biolabs).

Das gereinigte Fusionsprotein wurde mit Faktor Xa bei 4 °C inkubiert (Restriction Grade Factor Xa, Novagen). Die Pyridoxal-Kinase wurde pro 50 µg gereinigtem Fusionsprotein mit Faktor Xa (1 u) und 10-fach Puffer (0,1 VT, 5 µl) versetzt und das Volumen mit Wasser auf 50 µl ergänzt.

Nach 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden wurden Proben entnommen, um die Hydrolyse zeitabhängig verfolgen zu können. Das Ausmaß der Hydrolyse wurde anhand von Aktivitätsmessungen (Kapitel 2.6.1.4) und mit SDS-PAGE (Kapitel 2.6.3) verfolgt. Wurde das Fusionsprotein in einen 42 kDa großen Fusionsanteil und ein Zielprotein der korrekten Größe (35 kDa) gespalten, konnte auf korrekte Translation geschlossen werden.

Das nach Hydrolyse erhaltene Protein wurde entweder ohne weitere Reinigungsschritte in den nachfolgenden Enzyminkubationen eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.5.1.4 *Aufreinigung der nativen Pyridoxal-Kinase*

Die Aufreinigung der rekombinanten nativen Kinase erfolgte mit der von Cash et al. (1980) entwickelten Methode in modifizierter Form.

Die Pyridoxal-Kinase wurde im ersten Schritt mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Dabei wurde die Pyridoxal-Kinase an eine Pyridoxal-Sepharose-Matrix gebunden. Nach dem Waschen der Begleitproteine von der Säule, wurde die Kinase mittels eines Pyridoxin-haltigen Puffers (100 mM) eluiert. Eine sich anschließende Gelfiltration trennte die Pyridoxal-Kinase von dem Pyridoxin-Puffer.

2.5.1.4.1 Herstellung der Pyridoxal-Sepharose-Matrix

Entsprechend der von Cash et al. (1980) entwickelten Methode zur Aufreinigung der Pyridoxal-Kinase wurde Pyridoxal kovalent an eine Sepharose-Matrix (EAH-Sepharose[™] 4B, Amersham Biosciences) gebunden. Zur Vorbehandlung wurden 50 ml der EAH-Sepharose[™] 4B mit 4000 ml 0,5 M NaCl-Lösung entsprechend den Herstellerangaben gewaschen (Handbuch auf der beiliegenden CD-ROM /Herstellerangaben/Amersham Biosciences). Anschließend wurde die Sepharose mit einer Pyridoxallösung (7,0 g in 350 ml Wasser, pH-Wert 7,0) versetzt. Unter Lichtschutz wurde diese Suspension vorsichtig bei Raumtemperatur (16 Stunden) geschüttelt. Die Carbonylgruppe des Pyridoxals reagierte hierbei mit der Aminogruppe des Spacers der Matrix unter Ausbildung einer Schiff'schen Base.

Nach 16 Stunden Schütteln wurde die Suspension auf Eis abgekühlt, und die gebildete Schiff'sche Base wurde mit Natriumborhydridlösung (5 mg/ml) unter Schütteln zum sekundären Amin reduziert. Während der Reduktion wurde der pH-Wert mit 7 %iger Essigsäure unter 9,0 gehalten. Das Ende der Reaktion war durch das Verschwinden der gelben Farbe erkennbar. Danach wurde die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt, und zur Zerstörung des überschüssigen Natriumborhydrid wurde der pH-Wert mit 7 %iger Essigsäure auf 6,0 eingestellt. Die Matrix wurde mit 5 Säulenvolumina (250 ml) 3 M KCl-Lösung und anschließend mit Wasser gespült und vor Verwendung mit Puffer 1 (Tabelle 2.7) äquilibriert.

2.5.1.4.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Wechselwirkung des Proteins mit einem an der Matrix immobilisierten Liganden. Zur Affinitätschromatographie der nativen Pyridoxal-Kinase wurde die nach Kapitel 2.5.1.4.1 hergestellte Pyridoxal-Sepharose-Matrix (48 ml) in eine FPLC-Säule (Innendurchmesser 2,6 cm, Länge 40 cm, Amersham Biosciences) gefüllt. Die Matrix wurde zunächst mit mehreren Säulenvolumina (mindestens 200 ml) Puffer 1 (2 ml/min, Tabelle 2.7) äquilibriert. Der aus 6 Litern Hauptkultur gewonnene Proteinrohextrakt wurde mit KCl bis zu einer Endkonzentration von 100 mM versetzt und mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Der Proteinrohextrakt wurde insgesamt dreimal über die Säule gegeben. Dabei wurde die Pyridoxal-Kinase spezifisch an die Pyridoxal-Sepharose-Matrix gebunden. Die weiteren im Rohextrakt enthaltenen Proteine wurden nicht gebunden. Um die unspezifisch gebundenen Begleitproteine von der Säule zu waschen, wurde

zunächst mit Puffer 1 (2 ml/min, 50 ml), anschließend mit Puffer 2 (2 ml/min, Tabelle 2.7) und abschließend erneut mit Puffer 1 (2 ml/min, 50 ml) gespült. Die Pyridoxal-Kinase wurde mit einem Pyridoxin-haltigen Puffer (Puffer PN, 1,0 ml/min, Tabelle 2.7) eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen.

Die Aufreinigung erfolgte bei 4 °C und wurde mit einem Durchflussphotometer bei 280 nm verfolgt. Da sowohl Pyridoxin als auch die Pyridoxal-Kinase bei 280 nm Licht absorbieren, konnte bei der Elution nicht zwischen proteinhaltigen und proteinfreien Fraktionen unterschieden werden. Um die Fraktionen, die die Pyridoxal-Kinase enthalten, zu erkennen, erfolgte eine Proteingehaltsbestimmung aller gesammelten Fraktionen nach Bradford gegen BSA (Kapitel 2.6.1.3). Der Grad der Aufreinigung wurde durch SDS-PAGE (Kapitel 2.6.3) verfolgt. Die nach Affinitätschromatographie erhaltene Pyridoxal-Kinase wurde entweder sofort mittels Gelfiltration (Kapitel 2.5.1.4.3) vom Elutionspuffer getrennt oder bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Nach Elution der Pyridoxal-Kinase wurde die Säule mit mindestens 200 ml Puffer 1 gespült. Zur weiteren Reinigung wurde die Matrix abwechselnd mit je 3 Säulenvolumina Reinigungspuffer 1 und 2 (Tabelle 2.7) gespült. Dieser Reinigungsschritt wurde dreimal wiederholt.

2.5.1.4.3 Gelfiltration

Die Gelfiltration oder Ausschlusschromatographie ist ein Verfahren zur Trennung und Reinigung von Stoffen verschiedener Molekülmassen und zur Molmassenbestimmung. Sie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe, basierend auf der unterschiedlichen Permeation des Analyten in ein poröses Trägermaterial mit definierter Porengröße. Moleküle, die nicht in das Trägermaterial eindringen können, eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront. Kleinere Moleküle bewegen sich nicht nur ungehindert zwischen den Partikeln der stationären Phase, sondern dringen auch in ihre Poren ein. Daher ist das Elutionsvolumen umso größer, je kleiner die zu trennenden Moleküle sind.

Die Gelfiltration wurde eingesetzt, um die nach Affinitätschromatographie (Kapitel 2.5.1.4.2) erhaltene Pyridoxal-Kinase von dem im Elutionspuffer enthaltenen Pyridoxin zu trennen. Als Matrix diente Sephadex[®] G-15 (Amersham Biosciences, Handbuch auf der beiliegenden CD-ROM /Herstellerangaben/Amersham Biosciences). Eine 40 cm lange Säule mit einem Durchmesser von 1,6 cm (Amersham Biosciences) wurde mit der Matrix gefüllt und diese wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbehandelt. Vor jeder Gelfiltration wurde die Matrix mit mindestens 4 Säulenvolumina Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH-Wert 6,0) äquilibriert.

Um eine vollständige Trennung der Pyridoxal-Kinase von Pyridoxin zu erreichen, konnten maximal 5 ml Probe auf die Säule aufgebracht werden. Die nach Affinitätschromatographie erhaltene Proteinlösung wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule gegeben und mit Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH-Wert 6,0) eluiert. Die Elution wurde durch Messen der UV-Absorption bei 280 nm (Durchflussphotometer) verfolgt. Sobald die Absorption anstieg, wurde die Pyridoxal-Kinase in Fraktionen zu je 3 ml aufgefangen. Die Gelfiltration fand bei 4 °C statt, und die erhaltene reine Pyridoxal-Kinase wurde entweder direkt für enzymkinetische Untersuchungen eingesetzt oder aliquotiert bei -20 °C eingefroren. Die Konzentration der Pyridoxal-Kinase wurde in jeder Fraktion nach Bradford (Kapitel 2.6.1.3) gegen BSA bestimmt und die Reinheit wurde durch SDS-PAGE kontrolliert (Kapitel 2.6.3). Die Reinigung der Säule erfolgte mit NaOH (0,2 M). Anschließend wurde die Säule mit Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH-Wert 6,0) äquilibriert.

2.5.2 ENZYMIKUBATIONEN

Um die Funktionalität und den Einfluss von Ginkgotoxin auf die menschliche Pyridoxal-Kinase zu untersuchen, wurde das Gen in die Expressionsvektoren pMAL-c2X und pET-11a ligiert. Das Konstrukt pMAL-c2X diente der Expression der Pyridoxal-Kinase als Maltose-bindendes Fusionsprotein, während die Pyridoxal-Kinase mit dem Konstrukt pET-11a-PKH nativ exprimiert wurde.

Nach der Ernte der Zellen wurde das Zellpellet von 1 L Kultur in 10 ml Lysispuffer aufgenommen und mittels Ultraschall (Kapitel 2.5.1.2.1) aufgeschlossen. Während des Ultraschallaufschlusses wurden die Proben auf Eis gehalten. Anschließend wurden die zellulären Bestandteile abzentrifugiert (9000xg, 30 Minuten, 4 °C).

Wurden Enzyminkubationen mit dem so gewonnenen Proteinrohextrakt durchgeführt, diente der entsprechende *Escherichia coli*-Stamm transformiert mit dem "Leer"-Vektor als Negativkontrolle. Für die gereinigte Pyridoxal-Kinase waren Inkubationsansätze ohne Pyridoxal-Kinase beziehungsweise ohne Substrat die Negativkontrolle.

Zur Verfolgung der Expression und der Aufreinigung der Pyridoxal-Kinase wurden bei allen Aufreinigungsschritten Aliquots entnommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

2.5.2.1 Untersuchungen zur Charakterisierung der rekombinanten Pyridoxal-Kinase

Die zunächst durchgeführten Untersuchungen zur Stabilität sollten sicherstellen, dass die verwendeten Proteinproben über den gesamten Untersuchungszeitraum eine ausreichende

Aktivität aufwiesen. Zur Charakterisierung der Pyridoxal-Kinase wurden das Temperatur-Optimum, das pH-Optimum und die Abhängigkeit der Pyridoxal-Kinaseaktivität von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen untersucht.

2.5.2.1.1 Untersuchung der Stabilität der Pyridoxal-Kinase

Zur Stabilitätsprüfung der Pyridoxal-Kinase wurde der Proteinrohextrakt beziehungsweise die gereinigte Pyridoxal-Kinase einer Anzucht aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Am Untersuchungstag wurde ein Aliquot aufgetaut und die Aktivität der Pyridoxal-Kinase mit Hilfe des optischen Tests photometrisch (Kapitel 2.6.1.4) bestimmt.

2.5.2.1.2 Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Enzymaktivität

Um den Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Enzymaktivität zu untersuchen, wurden im optischen Test (Kapitel 2.6.1.4) steigende Enzymkonzentrationen eingesetzt und die Reaktionsgeschwindigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung bestimmt.

2.5.2.1.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Das Temperatur-Optimum wurde im Temperaturbereich von $20\text{--}60\text{ °C}$ bestimmt. Hierzu wurde die Pyridoxal-Kinase bei der entsprechenden Temperatur mit Pyridoxal inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das im Inkubationszeitraum gebildete Pyridoxal-5'-phosphat photometrisch gemessen (Endpunktbestimmung).

2.5.2.1.4 Bestimmung des pH-Optimums

Sowohl die enzymatische Aktivität als auch die Substratbindung können durch den Ladungszustand ionisierbarer Aminosäuren beeinflusst werden. Daher ist die Enzymaktivität vom pH-Wert abhängig. Das pH-Optimum ist ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung von Enzymen.

Das pH-Optimum wurde mit Hilfe von Kaliumphosphatpuffer (Endkonzentration 70 mM) in einem pH-Bereich von $5,0$ bis $8,0$ in Schritten von jeweils $0,5$ pH-Einheiten bestimmt. Bei jedem untersuchten pH-Wert wurde die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat aus Pyridoxal im einfachen optischen Test (Kapitel 2.6.1.4) kontinuierlich verfolgt.

2.5.2.1.5 Untersuchung des Einflusses verschiedener zweiwertiger Kationen auf die Enzymaktivität

Zweiwertige Kationen können als Cofaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Zur Untersuchung dieses Einflusses auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase wurde den Inkubationsansätzen Zink-, Cobalt-, Mangan-, Magnesium- oder Calciumchlorid zugesetzt. Sie wurden in einer Konzentration von 0,1 M eingesetzt. Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat aus Pyridoxal wurde im einfachen optischen Test (Kapitel 2.6.1.4) kontinuierlich verfolgt.

2.5.2.1.6 Bestimmung des K_m -Wertes

Die Michaelis-Konstante (K_m) charakterisiert die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat. Sie entspricht der Substratkonzentration, bei der die Umsetzung des Substrates mit halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) erfolgt. Der K_m -Wert charakterisiert damit die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat.

Die Michaelis-Menten-Gleichung gibt die Beziehung zwischen v , V_{max} , S und K_m wieder.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

v	Reaktionsgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
K_m	Michaelis-Konstante
S	Substratkonzentration

Die Michaelis-Menten-Gleichung zur Berechnung von K_m ist nur gültig, wenn die Substratkonzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum als konstant angesehen werden kann und die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der Enzymkonzentration abhängig ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit muss zudem unter Gleichgewichtsbedingungen bestimmt werden.

Ist die Affinität des Enzyms zum Substrat hoch, führt dies zu einem niedrigen K_m -Wert und umgekehrt. Mit steigender Substratkonzentration nähert sich v asymptotisch V_{max} an. Die Größen K_m und V_{max} wurden durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms *GraFit 5.0* bestimmt. Graphisch wurden die Werte im Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt, wobei $1/v$ gegen $1/S$ aufgetragen wird. Hierbei liegen die Messpunkte auf einer Geraden. Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der y-Achse

liefert den Wert für $1/V_{\max}$ und der Schnittpunkt mit der x-Achse liefert $-1/K_m$. Das Lineweaver-Burk-Diagramm zeigt die Linearität der Beziehung $1/v$ gegen $1/S$.

Zur Bestimmung des K_m -Wertes wurde die Aktivität der Pyridoxal-Kinase bei steigenden Substratkonzentrationen gemessen. Die weiteren Inkubationsbedingungen richteten sich nach den ermittelten pH- und Temperatur-Optima. Zur Charakterisierung der Pyridoxal-Kinase wurde der K_m -Wert für Pyridoxal zunächst photometrisch mit dem einfachen optischen Test (Kapitel 2.6.1.4) bestimmt. Da nur die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat photometrisch erfasst werden konnte, mussten die K_m -Werte für Pyridoxin, Pyridoxamin, Desoxypyridoxin und Ginkgotoxin mittels HPLC (Kapitel 2.6.5) bestimmt werden. Zum besseren Vergleich der K_m -Werte wurde der photometrisch für Pyridoxal ermittelte Wert zusätzlich mittels HPLC bestimmt. Die Bestandteile der Inkubationsansätze (Ansatzgröße 1 ml), zunächst ohne Substrat, wurden gut gemischt und 3 Minuten bei 37 °C temperiert. Nach Zugabe des Substrates und Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die unmittelbare Auftrennung des Reaktionsgemisches (Volumen 50 µl) mittels HPLC.

2.5.2.1.7 Bestimmung der katalytischen Konstante und der Spezifitätskonstante

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die katalytische Konstante k_{cat} , die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante der Produktbildung. Ihr Wert entspricht dem theoretischen Maximum der molaren Aktivität. Die so genannte Spezifitätskonstante, der Quotient aus k_{cat}/K_m , erlaubt den Vergleich verschiedener Substrate hinsichtlich ihrer Effektivität und ermöglicht damit Aussagen über die Qualität der unterschiedlichen Substrate. Die Spezifitätskonstante ist ein Maß der Substratspezifität, hohe Werte sind ein Hinweis für hohe Substratspezifität.

2.5.2.2 Einfluss verschiedener Vitamin-B₆-Analoga auf die Enzymaktivität

2.5.2.2.1 Bestimmung des K_i -Wertes

Zur Charakterisierung der Enzym-Inhibitor Wechselwirkung wurde der K_i -Wert für Pyridoxin und Desoxypyridoxin bestimmt.

Zur Ermittlung des K_i -Wertes wurden Enzyminkubationen mit konstanter Substratkonzentration und steigender Inhibitorkonzentration durchgeführt. Die bei der jeweiligen Inhibitorkonzentration erhaltene Reaktionsgeschwindigkeit wurde gegen die Inhibitorkonzentration in einem Diagramm aufgetragen. Aus dem Verlauf des Graphen wurde durch

nicht-lineare Regression der K_{iapp} -Wert mit folgender Gleichung bestimmt:

$$v_s = \frac{v_i}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{iapp}}\right)}$$

v_s = Reaktionsgeschwindigkeit im Steady-State

I = Inhibitorkonzentration

v_i = initiale Reaktionsgeschwindigkeit, $[I] = 0$

K_{iapp} = apparerter K_i -Wert, Inhibitorkonzentration, bei der die Steady-State Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte der initialen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht (IC_{50}).

Der IC_{50} -Wert ist die Konzentration des Inhibitors, bei dem die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte der initialen Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors erreicht.

Diese ist vom K_m -Wert des Substrates und der Konzentration des Substrates abhängig.

Aus dem in einem separaten Experiment ermittelten K_m -Wert (Kapitel 2.5.2.1.6) und dem Wert für K_{iapp} wurde der K_i -Wert, die Dissoziationskonstante des Inhibitors, entsprechend der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) berechnet:

$$K_i = \frac{K_{iapp}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)}$$

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 UV-SPEKTROMETRIE

2.6.1.1 Bestimmung der optischen Dichte zur Wachstumskontrolle von *Escherichia coli*

Das Wachstum von *Escherichia coli* in Flüssigmedium wurde durch die Trübungsmessung mit dem Photometer (Uvikon[®] 860, Kontron, München) kontrolliert. Es wurde die Absorption von Licht der Wellenlänge 600 nm (OD_{600}) von 1 ml Kultur gegen Medium bestimmt. Ein OD_{600} -Wert von 1,0 entspricht hierbei circa 8×10^8 Zellen/ml (Bertram und Gassen, 1991).

2.6.1.2 *Bestimmung der DNA-Konzentration*

Die Quantifizierung der nach Kapitel 2.4.1 gewonnenen DNA erfolgte photometrisch mit einem Uvikon[®] 810 Photometer (Kontron, München). Die Konzentrationsbestimmung von RNA oder DNA beruht auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. Eine Lösung, die 50 µg/ml doppelsträngige DNA enthält, hat einen Absorptionswert von 1 (Sambrock et al., 2001). Um die Reinheit der erhaltenen DNA abschätzen zu können, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Eine reine DNA-Lösung hat einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotienten von 1,8. Ist die Lösung mit Proteinen kontaminiert, ist der Wert kleiner. Für weitere Versuche sollte der Quotient zwischen 1,7–2,0 liegen.

Die Konzentrationsberechnung doppelsträngiger DNA erfolgte nach folgender Formel:

$$[c] = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

2.6.1.3 *Proteinquantifizierung nach Bradford*

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte mit der Methode nach Bradford (1976), modifiziert nach Read und Northcote (1981).

Bei der Reaktion des Bradford-Reagenzes (Coomassie-Brilliant blue G250[®] in Phosphorsäure und Methanol) mit Proteinen bildet sich zeitabhängig ein Farbkomplex. Dieser ist instabil und zerfällt wieder. Daher musste bei allen Messungen exakt die gleiche Inkubationszeit eingehalten werden.

Die Komplexbildung zwischen Proteinen und Farbstoff führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm. An dieser Komplexbildung ist hauptsächlich Arginin beteiligt, aber auch Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin interagieren mit dem Farbstoff. Die unterschiedliche Beteiligung der Aminosäuren an der Komplexbildung hat zur Folge, dass die Absorption des Komplexes für Proteine unterschiedlicher Aminosäuresequenz bei gleicher Konzentration unterschiedlich hoch ist. Dieser Test ergibt also nur näherungsweise die Proteinkonzentration und hat daher vergleichenden Charakter.

2.6.1.4 *Photometrischer Test zur Bestimmung von Pyridoxal-5'-phosphat in Inkubationsansätzen*

Die Pyridoxal-Kinaseaktivität wurde nach der Methode Kwok und Churchich (1979) bestimmt. Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat wurde durch Messen der Absorptionsänderung bei 388 nm in einem Zweistrahl Photometer Uvikon[®] 860 (BIO-TEK

Kontron, München) verfolgt. Pyridoxal-5'-phosphat hat ein Absorptionsmaximum bei 388 nm (Abbildung 7.7) mit einem Extinktionskoeffizienten von $4900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Mit diesem Test lässt sich zeitabhängig und kontinuierlich die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat verfolgen, denn bei dieser Wellenlänge hat Pyridoxal kein Absorptionsmaximum. Diese Methode wurde zur Charakterisierung der Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Mit dieser Methode lässt sich nur die Umsetzung von Pyridoxal, aber nicht die Umsetzung von Pyridoxin und Pyridoxamin und der Antivitaminere verfolgen. Die Umsetzung dieser Verbindungen wurde mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie untersucht (Kapitel 2.6.5).

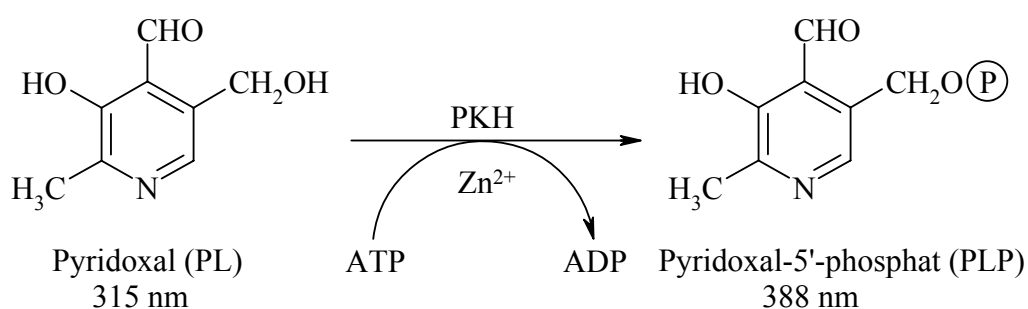


Abbildung 2.1 Reaktionsschema zur Umsetzung von Pyridoxal zu Pyridoxal-5'-phosphat

Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat wurde photometrisch bei 388 nm (Uvikon[®] 860 Photometer, Kontron, München) über einen Zeitraum von 10–40 Minuten bei 37 °C verfolgt. Der zellfreie Proteinrohextrakt von XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH) und BL21(DE3)(pET-11a-PKH) beziehungsweise die gereinigte Pyridoxal-Kinase dienten jeweils als Probe. Zur Kontrolle wurden die analog behandelten zellfreien Proteinrohextrakte von XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X) und BL21(DE3)(pET-11a) eingesetzt. Die Proteinkonzentration des Proteinrohextraktes betrug $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ für XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH) und $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ für BL21(DE3)(pET-11a-PKH). Die gereinigte Pyridoxal-Kinase wurde, wenn nicht anders angegeben, in einer Konzentration von $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingesetzt.

Die Messungen erfolgten in Kaliumphosphatpuffer (70 mM) in Anwesenheit von ZnCl_2 (0,1 mM) und ATP (1 mM). Zinkionen sind Cofaktor der Pyridoxal-Kinase und ATP stellt den Donator für die Phosphatgruppe dar. Der Enzymassay wurde in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt.

Reaktionsansatz:

Kaliumphosphatpuffer (0,1 M)	700 µl
Proteinrohextrakt/PKH	x µl
ZnCl ₂ (0,01 M)	10 µl
ATP (0,1 M)	10 µl
Pyridoxal (0,0005 M)	x µl
Wasser	ad 1000 µl

Die Bestandteile des Assays wurden bis auf das Substrat (Pyridoxal) in eine Mess- und eine Referenzküvette pipettiert. Anstelle des Substrates wurde in die Referenzküvette Wasser gegeben. Die Lösungen wurden gut durchmischt, und die Küvetten wurden ins temperierte Photometer (37 °C) gestellt. Zunächst wurde für 3 Minuten die Absorptionsänderung ohne Substrat verfolgt. Dieser Schritt diente einerseits der Temperierung der Lösung und andererseits sollte kontrolliert werden, ob andere Reaktionen ablaufen (zum Beispiel Präzipitation von Reaktionskomponenten). Anschließend wurde das Substrat in die Messküvette gegeben, die Lösung wurde gemischt und die Messung wurde gestartet.

Zur Charakterisierung der Pyridoxal-Kinase wurden verschiedene Parameter im Aktivitätstest variiert.

2.6.1.5 Bestimmung des logP-Wertes von Pyridoxal und Ginkgotoxin

Die Bestimmung des logP-Wertes wurde entsprechend der OECD Guideline for the testing of chemicals, Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method (Adopted by the Council on 27th July 1995) durchgeführt.

Der Verteilungskoeffizient (P) ist definiert als das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentration einer gelösten Substanz in einem zweiphasigen System aus zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln. Der Verteilungskoeffizient für die Lösungsmittel Wasser und n-Octanol wird wie folgt berechnet:

$$P_{O/W} = \frac{c_{n-Octanol}}{c_{Wasser}}$$

Der dimensionslose Verteilungsquotient wird als Zehnerlogarithmus angegeben ($\log P_{O/W}$). Der Verteilungskoeffizient von Pyridoxal und Ginkgotoxin wurde für das System Wasser/n-Octanol bestimmt. Vor der Ermittlung des Verteilungskoeffizienten wurden die beiden Lösungsmittel wechselseitig gesättigt. Zwei Gefäße, eins mit n-Octanol und dem notwendigem Volumen Wasser und eins mit Wasser und dem notwendigem Volumen

n-Octanol wurden 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Phasen getrennt. Das mit Wasser gesättigte n-Octanol und das mit n-Octanol gesättigte Wasser wurden im weiteren Versuch als Lösungsmittel eingesetzt.

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden zunächst Stocklösungen in n-Octanol gesättigtem Wasser hergestellt. Aliquots dieser Lösungen wurden einem bestimmten Volumen des n-Octanol gesättigten Wassers zugesetzt (Ausgangslösung). Von diesen Lösungen wurde die Konzentration (Ausgangskonzentration) photometrisch bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung für Pyridoxal erfolgte bei den Wellenlängen 290 nm und für Ginkgotoxin bei 325 nm. Die UV-Spektren von Pyridoxal und Ginkgotoxin in n-Octanol gesättigtem Wasser sind im Anhang Abbildung 7.6 und 7.16 angegeben.

Der Ausgangslösung wurde das gleiche Volumen mit Wasser gesättigtem n-Octanol zugesetzt und die Lösung 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt (180 rpm). Die anschließende Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugieren (9000xg). In den wässrigen Phasen wurden die Konzentrationen von Pyridoxal und Ginkgotoxin bestimmt (Endkonzentration). Die Differenz der Ausgangskonzentration und der Endkonzentration ergibt die Konzentration in der n-Octanolphase:

$$c_{n\text{-Octanol}} = c_{\text{Ausgangskonzentration}} - c_{\text{Endkonzentration}}$$

Der Verteilungskoeffizient ($P_{O/W}$) errechnet sich durch Division der Konzentration in n-Octanol ($c_{n\text{-Octanol}}$) mit der Endkonzentration in Wasser (c_{Wasser}) (Formel siehe oben).

2.6.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

2.6.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge voneinander zu trennen und deren Größe zu bestimmen. Die polyanionische Struktur der DNA-Fragmente ermöglicht eine Trennung im elektrischen Feld. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrades sind die DNA-Fragmente negativ geladen und wandern bei der Elektrophorese umso langsamer zur Anode, je größer sie sind (Sambrook und Russell, 2001).

Verwendet wurden 1 %ige Agarosegele. Die Agarose wurde in Elektrodenpuffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, Tabelle 2.5) suspendiert und durch Erhitzen gelöst. Der auf circa 50 °C abgekühlten Agaroselösung wurde eine 1 %ige Ethidiumbromid-Lösung (5 µl/100 ml Agarose-Lösung) zugesetzt.

Die Agarose-Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen. Mit einem Kamm wurden die Proben-Taschen geformt. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gegeben und mit TAE-Puffer überschichtet. Die zuvor mit 0,2 VT Auftragspuffer (6fach konzentriert, Tabelle 2.5) versetzten DNA-Proben wurden in die Taschen pipettiert. Zur Abschätzung der Molekülgrößen der DNA-Proben wurde gleichzeitig ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Durch Anlegen der Spannung (50–120 V) erfolgte die Trennung der Moleküle.

Der Fortschritt der Elektrophorese wurde mit den im DNA-Auftragspuffer enthaltenen Farbstoffen Bromphenolblau (Tetrabromphenolsulfonphthalein) und Xylencyanol verfolgt. Bei der gewählten Agarosekonzentration wandert Bromphenol etwa mit der Geschwindigkeit von ~300 bp-Fragmenten und Xylencyanol mit der von ~4000 bp-Fragmenten. Sobald eine ausreichende Trennung der DNA-Moleküle erreicht war, wurde die Elektrophorese beendet.

2.6.2.2 *Dokumentation der Agarose-Gelelektrophorese*

Die getrennten Nukleinsäuren wurden auf dem UV-Durchlichttisch (Transluminator, Schroma 43, Vetter, Wiesloch) visualisiert. Dokumentiert wurde das Gel mit einer Polaroid-MP4-Sofortbildkamera mit Rotfilter (Polaroid, Filmtyp 667). Das interkalierte Ethidiumbromid kann durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt werden und emittiert im orange-roten Bereich (590 nm).

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für analytische und präparative Zwecke eingesetzt. Mit ihr erfolgte unter anderem die Reinheitsprüfung der DNA.

2.6.2.3 *Extraktion von DNA aus Agarosegelen*

Sollten durch PCR (Kapitel 2.4.7) oder Restriktionshydrolyse (Kapitel 2.4.3) gewonnene DNA-Fragmente in weiteren Versuchen eingesetzt werden, wurden die Reaktionsprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.2.1) aufgetrennt. Anschließend wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel geschnitten und isoliert.

Die Elution der DNA aus dem Agarose-Gel erfolgte mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend den Herstellerangaben (Handbuch auf der beiliegenden CD-ROM /Herstellerangaben/Qiagen).

Die DNA wird bei dieser Methode in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze an eine Silicagel-Membran gebunden. Die Membran wird mit einem Salz-Ethanol-Puffer gewaschen und anschließend die DNA mit Tris-EDTA-Puffer oder Wasser eluiert

(Vogelstein und Gillespie; 1979). Die Silicagel-Membran kann bis zu 10 µg DNA binden und es lassen sich DNA-Fragmente von 70 bp bis 10 kb aus Agarosegelen isolieren.

2.6.3 *DENATURIERENDE POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)*

Die analytische Trennung von Proteinen erfolgte durch denaturierende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ("SDS-PAGE") nach Laemmli (1970). Hierbei werden die Proteine zunächst im Sammelgel (Tabelle 2.8) aufkonzentriert und anschließend in einem feinvernetzten Trenngel (Tabelle 2.8) der Größe nach im elektrischen Feld getrennt.

Die Trennung der Proteine erfolgt unabhängig von ihrer eigenen Ladung durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS ist ein Detergenz mit stark amphiphatischen Eigenschaften. Es lagert sich an die Peptidkette (~1,4 g SDS/g Protein) unter Bildung eines negativ geladenen SDS-Proteinkomplexes mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis. Gleichzeitig wird durch SDS die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der zu untersuchenden Proteine zerstört. Die SDS-Proteinkomplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Die Polyacrylamidmatrix wirkt als Molekularsieb und trennt die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht auf.

Verwendet wurden ein 3 %iges Sammelgel und ein 12,5 %iges beziehungsweise 10 %iges Trenngel. Es wurde das Blue Vertical 100-System der Firma SERVA Electrophoresis GmbH (69115 Heidelberg) und der Spannungsgeber Consort Microcomputer Electrophoresis Power Supply E 734 der Firma Consort (Turnhout, Belgien) eingesetzt.

Das Trenngel wurde entsprechend Tabelle 2.8 hergestellt und sofort zwischen die zwei durch Spacer getrennten Glasplatten der Gelgießapparatur gegossen. Zur Glättung der Gelkante wurde es sofort mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (circa 1 Stunde bei Raumtemperatur) wurde die Isobutanol-schicht entfernt. Die nach Tabelle 2.8 hergestellte Sammelgellösung wurde auf das Trenngel aufgebracht, und der Probenaschenformer eingesetzt. Nach circa 30 Minuten Polymerisation wurden die Glasplatten mit dem fixierten Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Elektrophoreseapparatur wurde mit Elektrophoresepuffer (Tabelle 2.8) gefüllt, der Probenaschenkamm entfernt und die Taschen mit Puffer gespült. Die Taschen wurden mit den Proben beladen. Neben den Proben wurde ein Molekulargewichtsstandard, "Low molecular weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis" (Amersham Biosciences), aufgetragen. Er enthielt folgende Referenzproteine: Phosphorylase B (97,0 kDa), BSA (66,0 kDa), Ovalbumin (45,0 kDa),

Carboanhydrase (30,0 kDa), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und Lysozym (14,4 kDa). Sowohl die Konzentrierung der Proben im Sammelgel als auch die Auftrennung der Proben im Trenngel erfolgten bei 25 mA. Hatte der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau den unteren Rand des Trenngels erreicht, wurde die Elektrophorese beendet. Das Gel wurde von den Glasplatten getrennt und das Sammelgel verworfen. Das Trenngel wurde zur Detektion der Proteine entweder mit Coomassie-Brilliant blue G250[®] (Kapitel 2.6.3.2) oder Silber (Kapitel 2.6.3.3) gefärbt und anschließend getrocknet. Das gefärbte Trenngel wurde auf 3 MM Papier (Whatman International Ltd., UK) platziert, im Vakuum bei 65 °C (~1,5 Stunden) getrocknet (Gel-trockner Firma Biometra) und dadurch konserviert .

2.6.3.1 *Probenaufbereitung*

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden vor Induktion ("nicht-induzierte"-Probe) der Proteinbildung jeweils 2 ml und nach Induktion ("induzierte"-Probe) jeweils 1 ml der Hauptkultur als Probe entnommen. Das Medium wurde abzentrifugiert, und das Zellsediment in 40 µl 5x SDS-Probenpuffer (Tabelle 2.8) und 160 µl Wasser aufgenommen. Diese Proben enthalten sowohl die löslichen als auch die unlöslichen Proteine. Bei den Proben des Proteinrohextraktes wurde 1/1000 des aus einem Liter Hauptkultur gewonnenen Rohextraktes mit 40 µl 5x Puffer versetzt und das Volumen mit Wasser auf 200 µl ergänzt. Diese Proben enthalten nur die löslichen Proteine. Die Proben der Proteinreinigung wurden mit 0,2 VT 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden alle Proben 5 Minuten im Wasserbad abgekocht und sofort auf Eis gestellt.

Vom Proteinrohextrakt, den "nicht-induzierten" und "induzierten" Proben wurden jeweils 20 µl bei Färbung mit Coomassie-Brilliant blue beziehungsweise 15 µl bei Silberfärbung auf ein Proteingel aufgetragen. Von den anderen Proben wurden jeweils 0,5 µg Protein aufgetragen.

2.6.3.2 *Färbung von Proteingelen mit Coomassie blue*

Das Trenngel wurde zur Detektion der Proteinbanden für mindestens eine Stunde in Coomassie-Färbelösung (Tabelle 2.9) leicht geschüttelt, dabei bildet sich ein blauer Protein-Farbstoff-Komplex. Anschließend wurde das Gel über Nacht in Coomassie-Entfärbelösung (Tabelle 2.9) geschwenkt, um die unspezifisch gefärbte Gelmatrix zu entfärben und so die Proteinbanden sichtbar zu machen. Diese Methode wurde zur schnellen Überprüfung der Proteinexpression eingesetzt. Zur Überprüfung des Reinheits-

grades der gereinigten Pyridoxal-Kinase wurden die Gele mit Silber gefärbt.

2.6.3.3 *Färben von Proteingelen mit Silber*

Die Färbung von Proteingelen mit Silber ist eine wesentlich empfindlichere Methode als die Coomassie-Färbung (Kapitel 2.6.3.2). Bei der Silberfärbung bilden Ag^+ -Ionen mit den Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Cystein-Resten der Proteine Komplexe. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag.

Die Zusammensetzungen der eingesetzten Lösungen sind in Tabelle 2.9 aufgeführt. Die Färbung erfolgte folgendermaßen:

- Das Trenngel wurde für eine Stunde im Fixierer geschwenkt.
- Das Gel wurde dreimal für fünf Minuten in Waschlösung geschwenkt.
- Das wurde Gel für eine Minute in Vorbehandlungslösung geschwenkt und anschließend gründlich mit Wasser gewaschen.
- Für 30 Minuten wurde das Gel vor Licht geschützt in Färbelösung geschwenkt. Hierbei binden die Silberionen an die Proteine. Nicht komplexierte Silberionen wurden durch gründliches Waschen mit Wasser entfernt.
- Das Gel wurde bis kurz vor Entwicklung der gewünschten Färbung in Entwicklerlösung geschwenkt. Dabei wurden die an den Proteinmolekülen komplexierten Silberionen reduziert und die Proteinbanden sichtbar. Anschließend wurde das Gel gründlich mit Wasser gewaschen und für weitere zwei Stunden in der Stopplösung belassen.

2.6.4 *DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE*

Die Dünnschichtchromatographie (DC) dient der Trennung sowie der qualitativen und semiquantitativen Analyse von Substanzen und Substanzgemischen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt, um Inkubationsansätze zu trennen. Als Trennsystem dienten DC-Fertigplatten der Firma Merck mit Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm. Von den Inkubationsansätzen wurden jeweils 200 µl aufgetragen. Als mobile Phase zur Auftrennung der Inkubationsansätze wurde eine Mischung aus Wasser, Ammoniak (5 %), Tertiärbutanol und Ethylmethylketon im Verhältnis 1:2:4:3 verwendet. Die Detektion erfolgte mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid (Stahl, 1967). Es bildete mit den Vitameren der B₆-Gruppe einen blauen Indophenol-Farbstoff.

2.6.5 HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE (HPLC)

Die Identifizierung und Quantifizierung der Reaktionsprodukte der Inkubationen der Pyridoxal-Kinase mit den Vitameren und Antivitaminen erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). Es wurde die von Mahuren und Coburn (1990) entwickelte und von Arenz (1996) modifizierte Methode zur Auftrennung der Vitamere, Antivitamere und deren 5'-Phosphate angewendet.

Als stationäre Phase diente ein starker Kationenaustauscher, eine mit Nucleosil[®] 100-5 SA gefüllte Edelstahlsäule (250 mm x 4 mm, Macherey & Nagel, 52313 Düren), mit einer mit gleichem Material gefüllten Vorsäule (30 x 4 mm).

Es wurde ein ternärer Gradient eingesetzt, der aus folgenden wässrigen Fließmitteln bestand:

Fließmittel A:	Trifluoressigsäure	(1 % TFA in Wasser, V/V)
Fließmittel B:	Kaliumphosphatpuffer	(0,5 mM, pH-Wert 5,0)
Fließmittel C:	Kaliumphosphatpuffer	(0,5 mM, pH-Wert 5,5)

Die Flußrate der mobilen Phase betrug stets 1 ml/min. Die Änderung der Fließmittelzusammensetzung erfolgte linear, entsprechend folgendem Schema:

Zeit [min]	Fließmittel A	Fließmittel B	Fließmittel C
0	100 %	0 %	0 %
10	0 %	100 %	0 %
15	0 %	100 %	0 %
20	0 %	0 %	100 %
25	0 %	0 %	100 %
33	100 %	0 %	0 %
45	100 %	0 %	0 %

Die Fluoreszenz der Vitamere, Antivitamere und deren 5'-Phosphate wurde zur Detektion genutzt. In der Regel wurden 50 µl der Inkubationsansätze direkt nach Ablauf der Inkubationszeit als Probe mit einer Hamiltonspritze auf die Säule der HPLC-Anlage aufgebracht. Um die 5'-Phosphate zu quantifizieren, wurde eine Fünfpunktkalibrierung mit bekannten Substanzmengen vorgenommen. Der Regressionskoeffizient der Kalibriergeraden betrug dabei mindestens 0,99.

Die quantitative Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Peakflächen mit der Software *EuroChrom[™] 2000 for Windows Integration Package*.

2.6.6 MALDI-TOF

Die Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) ist eine moderne und schnelle Analysenmethode zur Identifizierung von Oligonukleotiden, Proteinen und Biomolekülen. Dieses Verfahren entwickelten Karas und Hillenkamp (1988).

Der Analyt wird mit einem 1000 bis 10000fachen molaren Überschuss einer geeigneten, bei der Laserwellenlänge absorbierenden Matrix, auf einer metallischen Probenplatte gemischt. Nach Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zur Cokristallisation von Matrix und Analyten. Ein kurzwelliger UV-Laserpuls (Stickstoff, 337 nm, 4 ns) wird zur Desorption beziehungsweise Ionisation der Probe genutzt, und die Probenmoleküle werden in die Gasphase freigesetzt. Die Komponenten der Probe bleiben dabei als intakte Moleküle erhalten. Durch das angelegte elektrische Feld werden die gebildeten Ionen in der Quelle beschleunigt und durchlaufen nach Verlassen der Quelle eine feldfreie Driftstrecke (Flugrohr). Die Ionen werden dabei nach ihrem Masse/Ladungs-(m/z)-Verhältnis aufgetrennt.

Die Massenbestimmung erfolgt über die Bestimmung der Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Nach dem Durchlaufen der Beschleunigungsspannung U beträgt die kinetische Energie E_{kin} der Ionen:

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot mv^2$$

m = Masse des Ions

v = Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke

E_{kin} = kinetische Energie

Aus der Geschwindigkeit ($v = L/t$), die sich aus der Gesamtflugzeit t errechnet, in der ein Ion die Strecke L (feldfreie Driftstrecke des Flugrohrs) passiert und unter Berücksichtigung obiger Gleichung folgt:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2$$

L = Länge des Flugrohrs

z = Ladungszahl

e = Elementarladung

U = Beschleunigungsspannung

t = Zeit

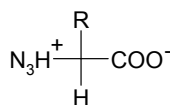
Das Verhältnis aus Molekülmasse und Ladung ist dem Quadrat der Flugzeit proportional, deshalb lässt sich die Masse der Moleküle aus der Flugzeit bestimmen.

Diese Methode wurde genutzt, um die Reinheit und die Identität der erhaltenen Pyridoxal-Kinase zu überprüfen. Durchgeführt wurden die Messungen mit dem Gerät ToFSpec E (Micromass, Manchester, UK) mit einer Flugrohrlänge von 1000 mm unter Reflektion im Positiv-Modus. Die Beschleunigungsspannung betrug 29 kV. Als Matrix diente Sinapinsäure mit TFA (Tabelle 2.10).

Alle Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Professor Dr. Konrad Sandhoff, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn.

2.6.7 *HYDROPHOBIZITÄTS-PLOT DER PYRIDOXAL-KINASE*

Proteine bestehen aus Aminosäuren, die sich nur durch ihre Reste (R) unterscheiden. Diese Reste legen fest, ob ein Protein beziehungsweise die Region eines Proteins hydrophil oder hydrophob ist.



Hydrophile Gruppen sind polar und interagieren mit Wasser unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Hydrophobe Gruppen sind nicht polar und interagieren daher auch nicht mit Wasser. Die Hydrophobizität der Aminosäuren legt fest, wo die Aminosäure innerhalb der Tertiärstruktur lokalisiert ist (Kyte und Doolittle, 1982). Bei Proteinen, die im Cytosol lokalisiert sind, wie es bei der Pyridoxal-Kinase der Fall ist, werden die hydrophoben Reste im Inneren des Proteins und die hydrophileren Reste an der Oberfläche des Proteins, interagierend mit dem Wasser, lokalisiert sein.

Das Maß für die Hydrophobizität ist die Energie in kcal/mol, die beim Übergang von der hydrophoben zur hydrophilen Phase benötigt wird. Jeder Aminosäure wird ein Hydrophobizitätswert zwischen -4,5 und 4,5 zugeordnet. Ein Wert von 4,5 steht für die höchste Hydrophobie und ein Wert von -4,5 steht für die hydrophilste Aminosäure. Zur Berechnung der Hydrophobizität wird anschließend festgelegt, von wie vielen Aminosäuren (Fenster) der Hydrophobizitätswert gemittelt wird. Anschließend werden die Hydrophobizitätswerte der einzelnen Fenster gemittelt. Der so gebildete Mittelwert wird der mittleren Aminosäure des Fensters zugeordnet und als Graph dargestellt. Die y-Achse zeigt den Hydrophobizitätswert, und die x-Achse zeigt die Position in der Aminosäuresequenz an.

2.6.8 *DARSTELLUNG DER SUBSTRATBINDETASCHE DER PYRIDOXAL-KINASE*

Die Substratbindetasche der Pyridoxal-Kinase wurde mit dem Computerprogramm MOETM (Molecular Operating Environment); Chemical Computing Group Inc.; Montreal, Canada, 2003 dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Reinigung der menschlichen Pyridoxal-Kinase

Die Pyridoxal-Kinase musste zunächst in ausreichender Menge gewonnen werden, um die enzymkinetischen Untersuchungen durchführen zu können. Hanna et al. (1997) hatten aus der cDNA menschlicher Testis die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA isoliert, in den Vektor pCDM8 inseriert und in HEK-293 Zellen (*Human embryonic kidney cells*) exprimiert. Diesen rekombinanten Vektor pCDM8-PKH stellte Professor Ewen F. Kirkness freundlicherweise zur Verfügung.

Die menschliche Pyridoxal-Kinase wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl als Fusionsprotein (Kapitel 3.1.1) als auch als natives Protein (Kapitel 3.1.2) in *Escherichia coli* überexprimiert. Um zu untersuchen, wie sich die Expression im prokaryontischen Organismus von der Expression beim Menschen unterscheidet, wurde die Pyridoxal-Kinase darüber hinaus in menschlichen Nierenzellen exprimiert (Kapitel 3.1.3).

Für die Überexpression als Maltose-bindendes Fusionsprotein wurde die Pyridoxal-Kinase in den Vektor pMAL-c2X und für die Überexpression als natives Protein in den Vektor pET-11a inseriert. Zur Expression der Pyridoxal-Kinase in menschlichen Nierenzellen wurde das von Hanna et al. beschriebene Expressionssystem genutzt.

3.1.1 EXPRESSION DER PYRIDOXAL-KINASE ALS MALTOSE-BINDENDENDES FUSIONSPROTEIN MIT DEM REKOMBINANTEN STAMM XLI-BLUE MRF' KAN (pMAL-c2X-PKH)

Die Pyridoxal-Kinase wurde als Maltose-bindendes Fusionsprotein exprimiert, um diese einfach aufzureinigen zu können. Hierzu wurde die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA-Sequenz zwischen die *BamH I* und die *Xba I* Schnittstelle des Vektors pMAL-c2X (New England Biolabs) ligiert. Abbildung 3.1 zeigt den Polylinker des Vektors pMAL-c2X-PKH mit der enthaltenen Pyridoxal-Kinase (rot dargestellt). Die vollständige Vektorkarte befindet sich im Anhang (Abbildung 7.3).

Faktor Xa Schnittstelle	<i>BamH I</i>	Pyridoxal-Kinase	<i>Xba I</i>
ATC GAG GGA AGG	ATT TCA <u>GAA TTC</u> GGA TCC AGG CCC GGC	ATG GAG CTG TGA	GGG CCC... <u>TCTAGA</u> GGA TCT
Ile Glu Gly Arg			

Abbildung 3.1 Ausschnitt aus dem Polylinker des rekombinanten Vektors pMAL-c2X-PKH

Der Vektor pMAL-c2X enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen, das die Selektion von

rekombinanten Klonen auf LB-Platten mit Penicillin ermöglicht. Die Transkription des Fusionsproteins wird durch den starken *tac*-Promotor gesteuert und dieser durch den *lac*-Repressor. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG, das an den *lac*-Repressor bindet und ihn damit vom Promotor ablöst. Allerdings werden durch den *tac*-Promotor kontrollierte Gene in geringem Maß auch in Abwesenheit von IPTG exprimiert.

Transformationskompetente Zellen (Kapitel 2.4.5.) des *Escherichia coli*-Stammes XL1-Blue MRF' Kan wurden nach Kapitel 2.4.5.3 mit dem Plasmid pMAL-c2X-PKH transformiert und auf LB-PenG₁₀₀-Platten (Kapitel 2.1.4 und 2.1.5) selektiert. Die erfolgreiche Transformation wurde mit drei verschiedenen Methoden überprüft. Im ersten Schritt wurde durch Restriktionshydrolyse (Kapitel 2.4.3) nach vorheriger Plasmidpräparation (Kapitel 2.4.1) kontrolliert, ob das Insert (PKH) im Plasmid des jeweiligen Klones enthalten war. Bei positiven Klonen wurde im nächsten Schritt die Proteinexpression mit Hilfe der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.3) und im letzten Schritt die erfolgreiche Umklonierung durch Sequenzierung (Kapitel 2.4.9) der DNA kontrolliert.

3.1.1.1 Überprüfung der Klone des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH) durch Restriktionshydrolyse

Die Inserierung der Pyridoxal-Kinase in den Vektor pMAL-c2X wurde durch Restriktionshydrolyse (Kapitel 2.4.3) mit den Restriktionsenzymen *BamH I* und *Xba I* überprüft. Von allen überprüften Klonen enthielten 19 ein DNA-Fragment, dessen Größe dem inserierten Pyridoxal-Kinase-Gen entsprach.

3.1.1.2 Überprüfung der Klone des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH) auf Expression der Pyridoxal-Kinase

Von den Klonen, die ein Insert der korrekten Größe im Plasmid enthielten, wurde im nächsten Schritt die Proteinexpression überprüft. 80 ml Medium wurden mit 0,8 ml einer Übernachtskultur angeimpft und im Schüttler bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Hatten die Zellen eine OD₆₀₀ von ungefähr 0,5 erreicht, wurde eine Probe der Zellkultur entnommen (vor Induktion).

Die anschließende Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,3 mM). Nach 2 Stunden wurde eine weitere Probe genommen (nach Induktion). Nach entsprechender Probenaufbereitung (Kapitel 2.6.3.1) wurde die Protein-

expression mittels SDS-PAGE überprüft. Abbildung 3.2 zeigt beispielhaft ein Proteingel zur Überprüfung von fünf Klonen auf Expression der Pyridoxal-Kinase. Im Gegensatz zu der nicht-induzierten Probe (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, SDS-PAGE Abbildung 3.2) ist in den Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 eine deutlich ausgeprägte Bande zwischen der 97 kDa und der 66 kDa Bande des Molekulargewichtsstandards (schwarzer Pfeil: fehlende Proteinbande, roter Pfeil: gebildete Pyridoxal-Kinase) erkennbar, welche sehr gut zum theoretischen Molekulargewicht des Fusionsprotein von 77,6 kDa (MBP: 42,5 kDa und PKH: 35,1 kDa) passt. Sowohl die Größe der Proteinbande nach Induktion (roter Pfeil) als auch die Tatsache, dass sich diese Bande erst nach Induktion der Proteinexpression bildete, weisen darauf hin, dass es sich bei dieser Bande um das rekombinante Fusionsprotein handeln könnte.

Bei Klonen, die eine Proteinbande der korrekten Größe bildeten, wurde überprüft, ob der Proteinrohextrakt Pyridoxal-Kinaseaktivität aufwies. Die Prüfung der Klone auf Aktivität der Pyridoxal-Kinase erfolgte mit dem in Kapitel 2.6.1.4 beschriebenen photometrischen Test im Proteinrohextrakt.

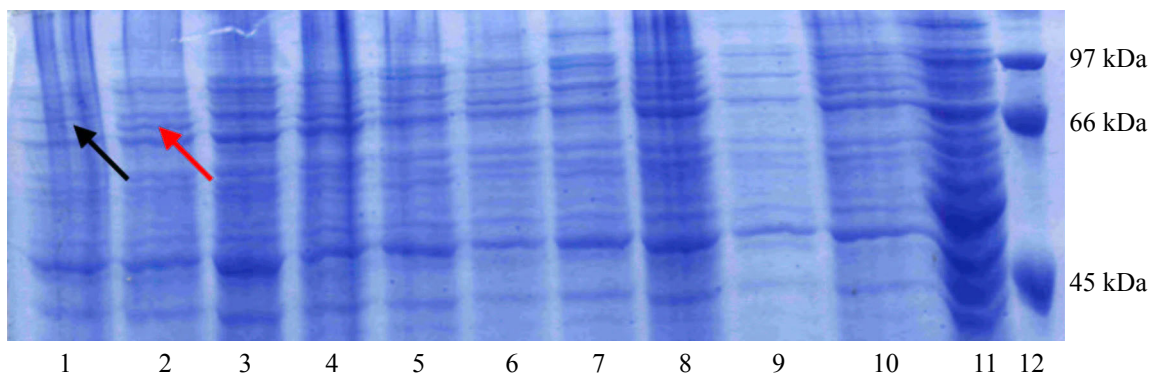


Abbildung 3.2 SDS-PAGE zur Überprüfung der Pyridoxal-Kinaseexpression fünf verschiedener Klone des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X-PKH) und der Kontrolle XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X)

Spur 1:	Klon 9 vor Induktion	Spur 7:	Klon 20 vor Induktion
Spur 2:	Klon 9 nach Induktion	Spur 8:	Klon 20 nach Induktion
Spur 3:	Klon 17 vor Induktion	Spur 9:	Klon 21 vor Induktion
Spur 4:	Klon 17 nach Induktion	Spur 10:	Klon 21 nach Induktion
Spur 5:	Klon 19 vor Induktion	Spur 11:	XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X) nach Induktion
Spur 6:	Klon 19 nach Induktion	Spur 12:	Molekulargewichtsstandard

In Spur 1 ist eine Probe vor Induktion der Proteinexpression und in Spur 2 eine Probe nach Induktion der Proteinexpression aufgetragen (Klon 9). Bei positiven Klonen war nach Induktion der Proteinexpression eine Bande von 77,6 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht des Fusionsproteins sichtbar.

3.1.1.3 Überprüfung der Sequenz der Pyridoxal-Kinase im rekombinanten Vektor pMAL-c2X-PKH

Die Überprüfung der DNA-Sequenz erfolgte durch direkte Sequenzierung im Vektor pMAL-c2X. Entsprechend der DNA-Sequenz wurden die Primer so gewählt, dass kontrolliert werden konnte, ob die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA-Sequenz in der richtigen Orientierung und unter Beibehaltung des Leserasters in den Vektor pMAL-c2X inseriert wurde.

Eingesetzte Primer:

Hin-Primer pMAL-c2X:	5'-GGT CGT CAG ACT GTC GAT GAA G-3'
Rück-Primer pMAL-c2X:	5'-TGG CGA AAG GGG GAT GTG CTG C-3'
Hin-Primer innerhalb der PKH:	5'-AAA GTG GTG CCG CTT GC-3'
Rück-Primer innerhalb der PKH:	5'-AGA GTG CAG CAT GTC CAT C-3'

Um die DNA-Sequenz, der nach Kapitel 3.1.1.1 als auch 3.1.1.2 positiven rekombinanten Klone zu überprüfen, wurde die DNA durch Plasmid-Minipräparation (Kapitel 2.4.1) isoliert. Für die Sequenzanalyse wurden 2 µg DNA eingesetzt. Nach Ablauf der Sequenzierreaktion wurde die DNA durch ethanolische Fällung gereinigt und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet (Kapitel 2.4.9).

Insgesamt wurde die Sequenz von fünf der bis dahin positiven Klone (K10, K12, K13, K15 und K24) überprüft. Bei diesen fünf Klonen befand sich die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA-Sequenz in der richtigen Orientierung unter Beibehaltung des Leserasters. Diese Klone wurden bei den weiteren Versuchen der Aktivitätsbestimmung verwendet.

3.1.1.4 Ermittlung der optimalen Expressionszeit des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH)

Zur Erhöhung der Proteinausbeute wurde die optimale Expressionszeit ermittelt. Entsprechend der in Kapitel 2.5.1 beschriebenen Methode wurden *Escherichia coli*-Kulturen gewonnen und die Proteinexpression durch IPTG induziert. Um die Proteinexpression zeitabhängig mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese verfolgen zu können, wurde vor Induktion der Proteinbildung, sowie jeweils 1, 2, 3 und 4 Stunden nach Induktion der Proteinexpression eine Probe entnommen. Die Proben wurden auf ein Proteingel aufgetragen (Abbildung 3.3) und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Brilliant blue G250[®] (Kapitel 2.6.3.2) gefärbt. Auf dem Proteingel war eine kontinuierliche Zunahme der Pyridoxal-Kinasebande erkenn-

bar (Pfeile). In den nachfolgenden Versuchen wurden die Zellen 4 Stunden nach Induktion der Proteinexpression geerntet.

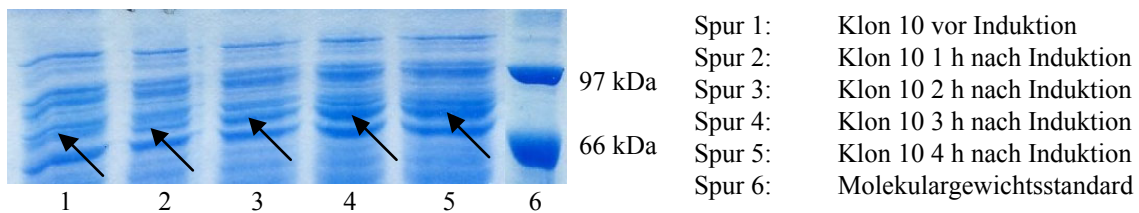


Abbildung 3.3 SDS-PAGE zur Ermittlung der optimalen Expressionszeit des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF⁺ Kan(pMAL-c2X-PKH)

3.1.1.5 Aufreinigung des Maltose-bindenden Fusionsproteins

Zur Expression der Pyridoxal-Kinase als Fusionsprotein diente das pMALTM Protein Fusion und Purification System der Firma New England Biolabs. Hierbei wurde die Pyridoxal-Kinase als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein exprimiert. Die Reinigung erfolgte mit einer Amylose-Matrix, an die das Zielprotein aufgrund seiner Maltose-bindenden Domäne bindet. Für die ersten Versuche erfolgte die Anzucht der *Escherichia coli*-Kulturen in LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5. Anschließend wurde die Expression des Fusionsproteins mit IPTG (0,3 mM) induziert, und die Zellen wurden weiter bei 37 °C und 200 rpm im Rundschüttler inkubiert und nach 4 Stunden geerntet.

Die erfolgreiche Aufreinigung des Fusionsproteins ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Die erhaltenen Fraktionen (Abbildung 3.4, Spur 9, 10, 11 und Abbildung 3.19) bestehen jedoch nicht nur aus der Pyridoxal-Kinase (Pfeil), sondern enthalten weitere Proteine (Banden oberhalb und unterhalb der Pyridoxal-Kinase). Diese Aufreinigungsmethode führte folglich zu keiner sauberen Pyridoxal-Kinase.

Aus diesem Proteingel (Abbildung 3.4) lässt sich außerdem ableiten, dass sich die Pyridoxal-Kinase nach Ultraschallaufschluss sowohl in der löslichen (Spur 6) als auch in der unlöslichen Fraktion das Fusionsprotein befindet (Spur 7). Die Proteinbande der Pyridoxal-Kinase ist jedoch in der löslichen Fraktion (Spur 6) schwächer als in der Fraktion der Gesamtproteine (Spur 5) und schwächer als in der Fraktion der unlöslichen Proteine (Spur 7). Der größere Anteil des gebildeten Fusionsproteins liegt also in unlöslicher Form vor (vergleiche Pfeile). Werden Proteine heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, können sie zu einem hohen intrazellulären, kolloidosmotischen Druck führen. Da diese Fremdproteine für die Zellen toxisch sein können, werden diese in Membranen eingeschlossen (Inclusion Bodies). Das Vorliegen eines großen Teiles der Pyridoxal-Kinase in der unlöslichen Proteinfraction, deutet auf die Bildung von Inclusion Bodies hin.

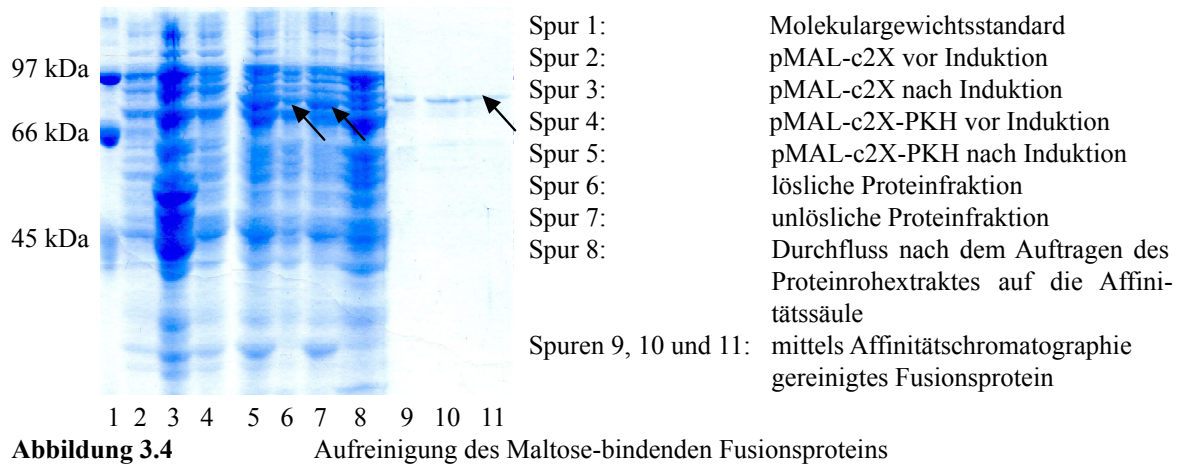


Abbildung 3.4

Aufreinigung des Maltose-bindenden Fusionsproteins

Eine hohe Überexpression von Proteinen führt häufig zur Aggregatbildung (Inclusion Bodies). Da die Bildung von Inclusion Bodies durch die hohe Konzentration des überexprimierten Proteins bedingt ist, kann die Aggregatbildung durch eine limitierte Induktion vermindert werden. Anzucht bei niedrigerer Temperatur sowie die Gabe von nicht-metabolisierbaren Glucose-Homologen zum Zeitpunkt der Induktion limitieren ebenfalls die Bildung von Inclusion Bodies. Nichtmetabolisierbare Zuckeralkohole üben hohen osmotischen Stress auf die Zellen aus, der die Löslichkeit der Proteine erhöhen soll (Blackwell und Horgan, 1991).

In weiteren Versuchen sollte der Anteil des gelöst vorliegenden Fusionsproteins erhöht werden. Dafür wurden die Zellen nach einem modifizierten Protokoll für schwerlösliche oder toxische Proteine in LB/Betain/Sorbitolmedium (Tabelle 2.11) angezogen. Die Überexpression erfolgte bei niedrigerer Temperatur (25 °C), während die Zellernte nach 24 Stunden erfolgte. Die Ausbeute an löslicher Pyridoxal-Kinase konnte dadurch erhöht werden.

3.1.2 EXPRESSION DER PYRIDOXAL-KINASE ALS NATIVES PROTEIN MIT DEM REKOMBINANTEN STAMM BL21(DE3)(pET-11A-PKH)

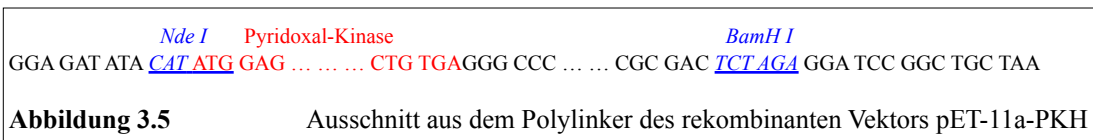
Der Maltose-bindende Anteil des Fusionsproteins ist größer als die Pyridoxal-Kinase (MBP: 42,5 kDa und PKH: 35,1 kDa). Ein Einfluss des Maltose-bindenden Proteins auf die Aktivität der Kinase ist daher nicht auszuschließen. Um diesen möglichen Einfluss zu untersuchen, wurde die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA-Sequenz in einen zweiten Expressionsvektor pET-11a (Novagen) inseriert, um eine Expression als natives Protein ohne Fusionsanteil zu ermöglichen.

Die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA wurde zwischen die *Nde I* und *BamH I* Schnittstellen des Vektors pET-11a ligiert. Hierzu wurden durch PCR eine *Nde I*

Schnittstelle außerhalb des für die Pyridoxal-Kinase codierenden Bereiches am 5'- Ende und eine *BamH I* Schnittstelle am 3'-Ende erzeugt. Als Matrize diente der Vektor pCDM8-PKH (Hanna et al., 1997). Zur Amplifikation der DNA und Erzeugung der Klonierungsstellen fanden die hier angeführten Oligonukleotide (Primer) Verwendung:

Primer zur Erzeugung der *Nde I*-Schnittstelle: 5'–ATC CAG GCC CCA TAT GGA GGA GGA–3'
 Primer zur Erzeugung der *BamH I*-Schnittstelle: 5'–TCA CAA GGA TCC TCT AGA GTC G–3'

Die PCR wurde entsprechend der in Kapitel 2.4.7 beschriebenen Methode durchgeführt. Als Polymerase wurde die *Pfx*-Polymerase (aus *Thermococcus* species *KOD*) eingesetzt. Das PCR Programm wurde entsprechend den Herstellerangaben auf die *Pfx*-Polymerase angepasst (Kapitel 2.4.8.2). Das erhaltene PCR-Produkt wurde durch Restriktionshydrolyse mittels *BamH I* und *Nde I* hydrolysiert, über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und anschließend aus dem Gel isoliert (Kapitel 2.6.2). Der Vektor pET-11a wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonucleasen *BamH I* und *Nde I* hydrolysiert und über Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion gereinigt. Durch Ligation (Kapitel 2.4.4) des vorbereiteten Vektors mit der für die Pyridoxal-Kinase codierenden DNA-Sequenz wurde der rekombinante Vektor pET-11a-PKH erzeugt. Abbildung 3.5 zeigt den Polylinker des Vektors pET-11a-PKH mit der inserierten Pyridoxal-Kinase-Sequenz (rot dargestellt). Die vollständige Vektorkarte befindet sich im Anhang (Abbildung 7.4).



Der Vektor pET-11a enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen, das die Selektion der rekombinanten Klone ermöglicht. Die Transkription des Zielproteins wird durch den T7-Promotor gesteuert und durch Zugabe von IPTG induziert. Der Stamm BL21(DE3) wurde mit dem erzeugten rekombinanten Plasmid pET-11a-PKH transformiert (Kapitel 2.4.5, Bezeichnung des rekombinanten Stammes: BL21(DE3)(pET-11a-PKH)). Die erfolgreiche Bildung des rekombinanten Plasmides pET-11a-PKH wurde mit Restriktionshydrolyse (Kapitel 2.4.3) und durch Sequenzierung der für die Pyridoxal-Kinase codierenden DNA (Kapitel 2.4.9) überprüft. Die Expression der Pyridoxal-Kinase wurde mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.6.3) untersucht.

3.1.2.1 Überprüfung der Klone des rekombinanten Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH) durch Restriktionshydrolyse

Die Inserterung der Pyridoxal-Kinase in den Vektor pET-11a wurde durch Restriktionshydrolyse mit *BamH I* und *Nde I* bei 100 Klonen getestet. Bei den positiven Klonen wurde das rekombinante Plasmid mit weiteren Restriktionsenzymen (*EcoR I*, *Pvu II*, *Pst I*) kontrolliert. Von den 100 überprüften Klonen enthielten 12 ein DNA-Fragment, das in der Größe und dem Restriktionsschnittmuster dem inserierten Pyridoxal-Kinase-Gen entsprach.

3.1.2.2 Überprüfung der Klone des rekombinanten Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH) auf Expression der nativen Pyridoxal-Kinase

Die Klone mit Insertion der Pyridoxal-Kinase wurden im nächsten Schritt auf die Proteinexpression getestet. Hauptkulturen wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0,5$ bei 37 °C im Schüttler angezogen. Vor Induktion der Proteinexpression mit IPTG ("nicht-induzierte Probe") und 4 Stunden nach Induktion ("induzierte Probe") wurde jeweils eine Probe genommen. Nach entsprechender Probenaufbereitung wurde eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Abbildung 3.6 zeigt beispielhaft ein Proteingel zur Überprüfung der Expression der Pyridoxal-Kinase.

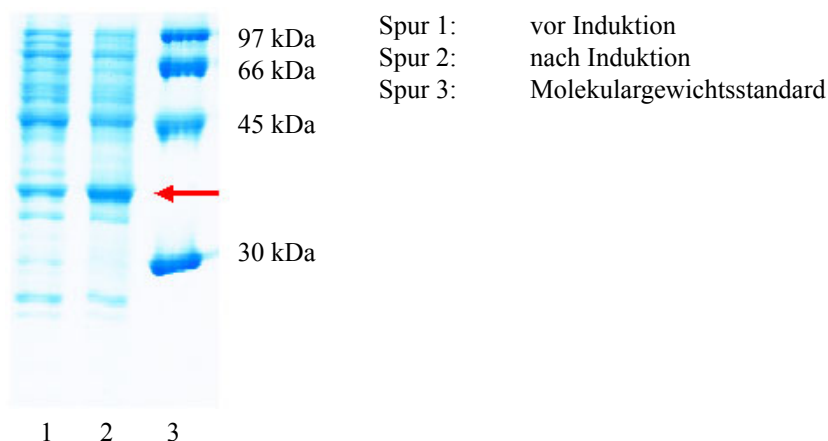


Abbildung 3.6 SDS-PAGE (Trenngel 10 %) zur Überprüfung der Expression der Pyridoxal-Kinase von Klon T1/7 [BL21(DE3)(pET-11a-PKH)]. Spur 1 zeigt eine Probe vor Induktion der Proteinexpression ("nicht induzierte Probe") und in Spur 2 ist eine Probe der selben Kultur 4 Stunden nach Induktion ("induzierte Probe") der Proteinexpression aufgetragen. Die Lage der Pyridoxal-Kinasebande ist mit einem roten Pfeil markiert. Die Pyridoxal-Kinase hat ein Molekulargewicht von 35,1 kDa. Die Stärke der Proteinbande hat nach 4 Stunden signifikant zugenommen.

Die Pyridoxal-Kinase hat ein Molekulargewicht von 35,1 kDa. Das Proteingel (Abbildung 3.6) zeigt, dass ein Protein überexprimiert wurde, dessen Größe zwischen 30 und 45 kDa liegt. Die mit einem Pfeil markierte Proteinbande hatte in ihrer Stärke 4 Stunden nach

Induktion deutlich zugenommen, während die Stärke der übrigen Proteinbanden gleich blieb. Da das überexprimierte Protein ein Molekulargewicht zwischen 30 und 45 kDa hatte und ein deutlicher Unterschied in der Bandenstärke vor und nach Induktion vorliegt, wurde angenommen, dass die Pyridoxal-Kinase in Klon T1/7 überexprimiert worden war. Die 12 der nach Restriktionshydrolyse positiven Klonen exprimierten ein Protein der korrekten Größe.

3.1.2.3 Überprüfung der Sequenz der Pyridoxal-Kinase im rekombinanten Vektor BL21(DE3)(pET-11a-PKH)

Die Überprüfung der DNA-Sequenz erfolgte durch direkte Sequenzierung (Kapitel 2.4.9) im Vektor pET-11a. Entsprechend der DNA-Sequenz wurden die Primer so gewählt, dass analysiert werden konnte, ob die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA-Sequenz in der richtigen Orientierung und unter Beibehaltung des Leserasters in den Vektor pET-11a inseriert wurde und ob bei der PCR keine falschen Basen eingebaut wurden. Um die DNA-Sequenz der nach Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2 positiven rekombinanten Klone zu überprüfen, wurde die DNA durch Plasmid-Minipräparation (Kapitel 2.4.1) isoliert. Für die Sequenzanalyse wurden 2 µg doppelsträngige DNA (~ 250 ng zu sequenzierendes Insert) eingesetzt. Nach Ablauf der Sequenzierreaktion wurde die DNA durch ethanolische Fällung gereinigt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet. Es wurden zwei "Primer"-Paare eingesetzt. Das eine "Primer"-Paar flankiert die Pyridoxal-Kinase, und das andere "Primer"-Paar ist homolog zu Bereichen, die in der Mitte des für die Pyridoxal-Kinase codierenden Genes liegen.

Eingesetzte Primer:

Hin-Primer pET-11a:	5' – ATA GGG GAA TTG TGA GCG GA – 3'
Rück-Primer pET-11a:	5' – CTT TGT TAG CAG CCG GA – 3'
Hin-Primer innerhalb der PKH:	5' – AAA GTG GTG CCG CTT GC – 3'
Rück-Primer innerhalb der PKH:	5' – AGA GTG CAG CAT GTC CAT C – 3'

Insgesamt wurden die Sequenzen von vier der bis dahin als positiv erkannten Klone überprüft. Bei drei von vier Klonen befand sich die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA-Sequenz in der richtigen Orientierung unter Beibehaltung des Leserasters. Es wurden keine falschen Basenpaare eingebaut. Mit den drei Klonen, die die für die Pyridoxal-Kinase codierende DNA-Sequenz in der richtigen Orientierung und unter Beibehaltung des Leserasters enthielten und die ein Protein der korrekten Größe exprimierten, wurden die nachfolgenden Versuche durchgeführt.

3.1.2.4 Aufreinigung der Pyridoxal-Kinase als natives Protein

Die native Pyridoxal-Kinase wurde in zwei Schritten gereinigt. Im ersten Schritt erfolgte die Reinigung mit der in Kapitel 2.5.1.4.2 beschriebenen Affinitätschromatographie. Im zweiten Schritt wurde der pyridoxinhaltige Elutionspuffer durch Gelfiltration (Kapitel 2.5.1.4.3) entfernt, da dieser die nachfolgenden enzymkinetischen Messungen stört.

3.1.2.4.1 Verteilung der Pyridoxal-Kinase auf die einzelnen Aufreinigungsfractionen

Der nach Kapitel 2.5.1.2 erzeugte Proteinrohextrakt wurde entsprechend der in Kapitel 2.5.1.4 beschriebenen Methode gereinigt. In Abbildung 3.7 ist beispielhaft dargestellt, wie sich die Pyridoxal-Kinase auf die einzelnen Fraktionen der Affinitätschromatographie verteilte.

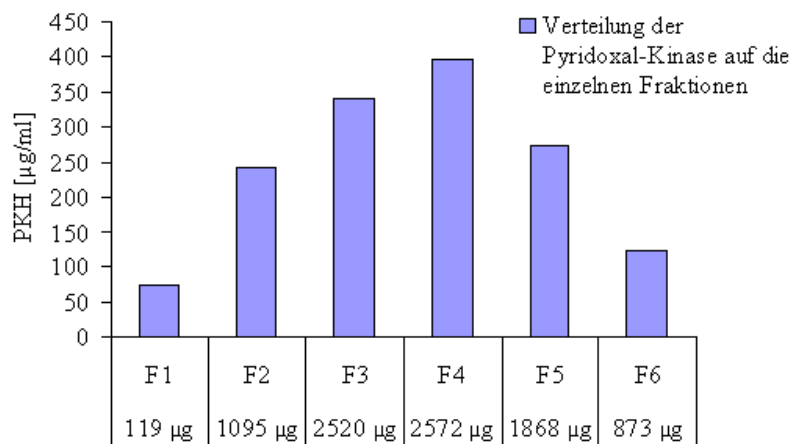


Abbildung 3.7 Verteilung der Pyridoxal-Kinase auf die einzelnen Fraktionen nach Affinitätschromatographie. Angegeben sind die Proteinkonzentration und der Gesamtproteingehalt der erhaltenen Fraktionen.

Sobald die Absorption am UV-Detektor anstieg, wurde die Pyridoxal-Kinase eluiert (Fraktion 1). Innerhalb der ersten 3 Fraktionen steigt der Gehalt der Pyridoxal-Kinase rasch an und fällt dann ebenso rasch wieder ab. Die Pyridoxal-Kinase ist nur auf wenige Fraktionen verteilt. Angegeben ist die Konzentration der Pyridoxal-Kinase (µg/ml) in den einzelnen Fraktionen und der Gesamtproteingehalt der einzelnen nach Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktionen.

3.1.2.4.2 Aufreinigungsschema

Tabelle 3.1 zeigt das Aufreinigungsschema für die nativ exprimierte Pyridoxal-Kinase. Es wurde der Proteingehalt vom zellfreien Proteinrohextrakt nach Affinitätschromatographie

und Gelfiltration bestimmt. Die Aktivität wurde im Rohextrakt und nach Gelfiltration bestimmt. Nach Affinitätschromatographie konnte die Aktivität nicht bestimmt werden, da das im Elutionspuffer enthaltene Pyridoxin die Aktivitätsmessungen störte.

Aufreinigungsschritt	Gesamtprotein [mg]	Enzymaktivität [nmol/mg*min ⁻¹]	Reinigungsfaktor
Proteinrohextrakt	219	22,1	1
Affinitätschromatographie	1,58	entfällt, da in dieser Fraktion das anwesende Pyridoxin die Aktivitätsmessungen stört	entfällt, da in dieser Fraktion das anwesende Pyridoxin die Aktivitätsmessungen stört
Gelfiltration	0,445	1262	57,1

Tabelle 3.1 Aufreinigungsschema

Die Enzymaktivität ist angegeben als Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat in nmol pro mg Protein pro Minute. Die angegebenen Proteinmengen entsprechen der aus einem Liter Kultur gewonnenen Proteinmenge. Aus einem Liter Hauptkultur konnten circa 0,445 mg Pyridoxal-Kinase gewonnen werden. Der Reinigungsfaktor wurde bestimmt, indem die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat pro mg Protein pro Minute des Proteinrohextraktes gleich 1 gesetzt und anschließend mit der Reaktionsgeschwindigkeit nach Gelfiltration ins Verhältnis gesetzt wurde. Die Aktivität ließ sich um den Faktor 57 steigern.

3.1.2.4.3 Überprüfung der Reinigung der nativen Pyridoxal-Kinase mit SDS-PAGE

Der Erfolg der Aufreinigung der nativen Pyridoxal-Kinase wurde durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft und ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit der sehr empfindlichen Silberfärbung (Kapitel 2.6.3.3). Mit dieser Methode können noch circa 5 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden. Das Proteingel zeigt Proben der Gesamtproteine vor Induktion und nach Induktion der Proteinexpression (lösliche und unlösliche Proteine), den auf die Affinitätssäule aufgegebenen Proteinrohextrakt (lösliche Proteine), der nach Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinfraction und der nach Gelfiltration erhaltenen reinen Pyridoxal-Kinase. Das Proteingel zeigt beispielhaft jeweils die Probe einer nach Affinitätschromatographie (Spur 4) und Gelfiltration (Spur 5) erhaltenen Fraktion. Der gezeigte Reinheitsgrad der Pyridoxal-Kinase entspricht dem Reinheitsgrad, der für die enzymkinetischen Untersuchungen eingesetzten gereinigten Pyridoxal-Kinase.

Die Pyridoxal-Kinase hat ein Molekulargewicht von 35,1 kDa. In Spur 4 sind neben der bereits sehr deutlichen Bande der Pyridoxal-Kinase nur noch sehr wenige dünne Banden

von Begleitproteinen detektierbar. Somit führte die Aufreinigung mit Hilfe der Pyridoxal-Sepharose-Matrix zu einem sehr reinen Enzym.



Abbildung 3.8 SDS-PAGE der in *Escherichia coli* (BL21(DE3)(pET-11a-PKH)) über-exprimierten nativen Pyridoxal-Kinase

Eine weitere Reinigung erfolgte mit der sich anschließenden Gelfiltration, durch die die restlichen nach Affinitätschromatographie noch vorhandenen Begleitproteine entfernt werden konnten (Spur 5). Die eingesetzte Methode zur Gewinnung der nativen Pyridoxal-Kinase führt also zu einer reinen Proteinfraction, die nur aus einem Protein besteht. Diese Methode der Aufreinigung wurde zur Gewinnung der Pyridoxal-Kinase für die enzymkinetischen Untersuchungen eingesetzt.

3.1.2.4.4 Untersuchung der menschlichen rekombinant exprimierten Pyridoxal-Kinase mittels MALDI-TOF

Das Molekulargewicht und der Reinheitsgrad der nach Affinitätschromatographie und Gelfiltration erhaltenen Pyridoxal-Kinase wurde mittels MALDI-TOF (Kapitel 2.6.6) überprüft. Die Messungen wurden mit dem Gerät Typ SpecTof E (Micromass, Manchester, GB) durchgeführt. Die Messungen erfolgten unter Reflektion im Positiv-Modus. Die Beschleunigungsspannung betrug 29 kV und das Flugrohr hatte eine Länge von 1000 mm. Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet (Tabelle 2.10).

Für die MALDI-TOF-Bestimmung wurde die mittels Affinitätschromatographie (Kapitel 2.5.1.4.2) und Gelfiltration (Kapitel 2.5.1.4.3) gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Bei der Gelfiltration wurde abweichend Wasser als Elutionsmittel eingesetzt. Der Gehalt der Pyridoxal-Kinase wurde entsprechend der Methode nach Bradford bestimmt (Kapitel 2.6.1.3) und die Proben mit Acetonitril und Wasser (Verhältnis 1:1) auf 10–20 pmol/µl

eingestellt.

Das Spektrum (Abbildung 3.9) zeigt das einfach geladene Molekül $[M+H]^+$ (Peak 35035 Da), das zweifach geladene Monomer $[M+2H]^{2+}$ (Peak 17470 Da), das einfach geladene Dimer $[2M+H]^+$ (Peak 70092 Da) und das zweifach geladene Trimer $[3M+2H]^{2+}$ (Peak 52694 Da). Das MALDI-TOF-Spektrum verdeutlicht, dass mit der entwickelten Aufreinigungsmethode eine sehr reine Pyridoxal-Kinase erhalten wurde.

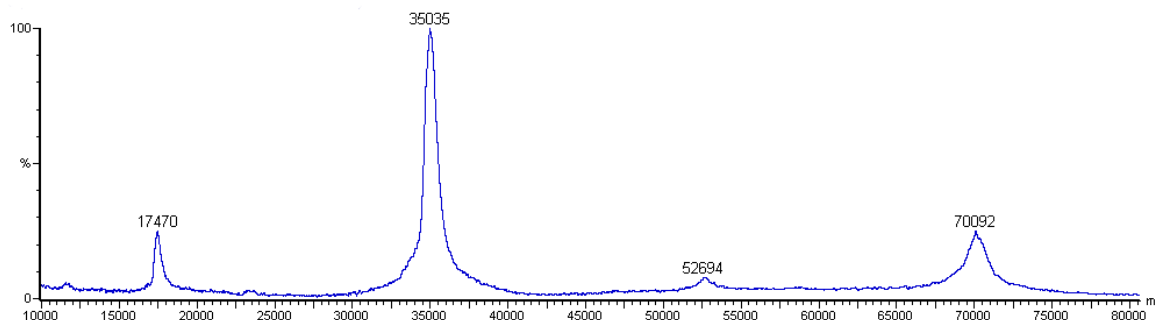


Abbildung 3.9 Abbildung des MALDI-TOF-Spektrums der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Das mittels MALDI-TOF ermittelte Molekulargewicht stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht (35,1 kDa) überein. Es wurde folglich ein Protein der korrekten Größe exprimiert. Neben dem einfach geladenen Monomer wurde auch das einfach geladene Dimer detektiert. Das Vorhandensein des Dimers gibt jedoch nur einen Hinweis auf die Quartärstruktur der Pyridoxal-Kinase, da sich das Dimer auch bei der Analyse gebildet haben kann. Um genauere Informationen über die Quartärstruktur zu erhalten, sind weitere Analysen (Gelfiltration) durchzuführen.

3.1.3 EXPRESSION DER PYRIDOXAL-KINASE IN HEK-ZELLEN

Die Pyridoxal-Kinase wurde zusätzlich zu der heterologen Expression in *Escherichia coli* in menschlichen Nierenzellen (HEK-293-Zellen) exprimiert, um Unterschiede in der Expression und der Aktivität zu untersuchen. HEK-293-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Matthias Kassack, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Bonn, mit dem rekombinanten Vektor pCDM8-PKH transient transfiziert (Kapitel 2.4.6). Die Expression der Pyridoxal-Kinase wurde durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abbildung 3.10) überprüft.

Mit diesem Expressionssystem konnten nur geringe Proteinmengen gewonnen werden, was die weitere Aufreinigung unmöglich machte. Zudem zeigte der Proteinrohextrakt der in HEK-Zellen exprimierten Pyridoxal-Kinase keine Aktivität, so dass weitere Versuche mit

diesem Expressionssystem nicht durchgeführt wurden.

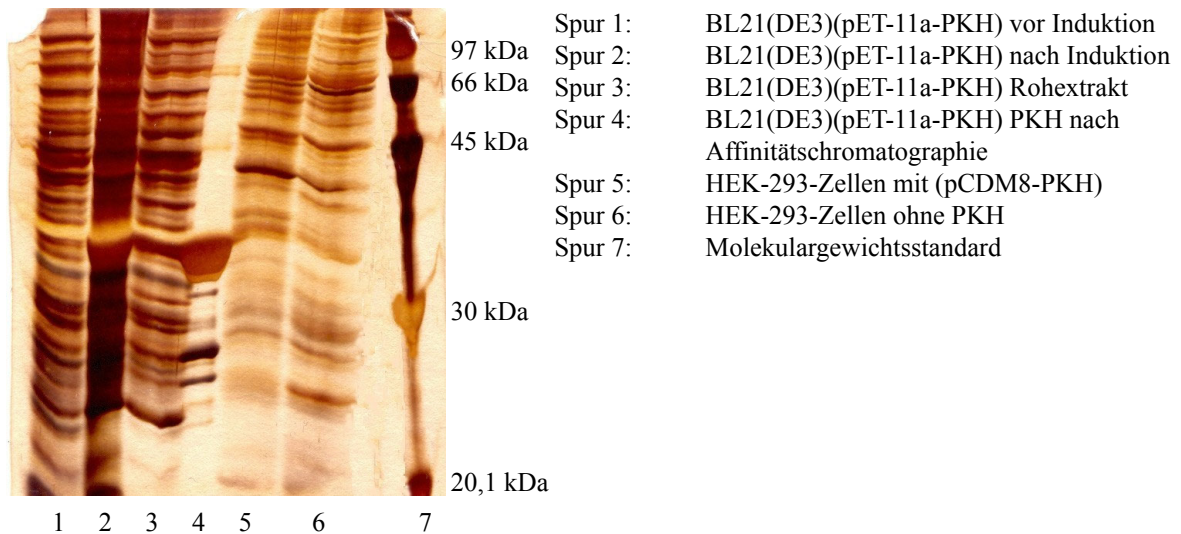


Abbildung 3.10 SDS-PAGE von Proben der in HEK-293(pCDM8-PKH)-Zellen exprimierten Pyridoxal-Kinase (Spur 5) und einer Kontrolle (HEK-293-Zellen ohne PKH-Gen, Spur 6). Im Vergleich hierzu wurden Proben der in *Escherichia coli* (BL21(DE3)(pET-11a-PKH)) heterolog exprimierten Pyridoxal-Kinase aufgetragen.

3.2 Analytik von Vitamin B₆ und Strukturanaloga

Die Pyridoxal-Kinase setzt Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin zu den entsprechenden 5'-Phosphateestern um. Zur enzymkinetischen Charakterisierung der Pyridoxal-Kinase und um den Einfluss der Antivitamine auf die Aktivität zu bestimmen, mussten die Reaktionsprodukte der enzymatischen Umsetzung quantifiziert werden.

Mit Hilfe eines optischen Tests konnte die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat kontinuierlich erfasst werden. Die Umsetzung der anderen Vitamere der B₆-Gruppe und deren Strukturanaloga ließ sich so nicht erfassen, da deren 5'-Phosphate kein zusätzliches Absorptionsmaximum im Vergleich zu den nicht phosphorylierten Verbindungen aufweisen (vergleiche Kapitel 7.4). Um den Umsatz aller Vitamere und deren Antivitamere Ginkgotoxin und Desoxypyridoxin zu untersuchen, wurde die Hochleistungs-Flüssigchromatographie eingesetzt.

3.2.1 PHOTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON PYRIDOXAL-5'-PHOSPHAT

Der in Kapitel 2.6.1.4 beschriebene photometrische Test ermöglicht die Erfassung von Pyridoxal-5'-phosphat. Pyridoxal wird unter ATP-Verbrauch zu Pyridoxal-5'-phosphat umgesetzt. Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat kann photometrisch durch Messen der Absorption bei 388 nm verfolgt werden. Die Absorptionsänderung ist der im Ansatz

befindlichen Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration proportional. Der Vorteil der photometrischen Quantifizierung von Pyridoxal-5'-phosphat ist, dass die Messung kontinuierlich erfolgen kann und die Messungen schnell, einfach und genau durchzuführen sind. Daher wurde diese Methode zur schnellen Überprüfung der Enzymaktivität und zur Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums sowie zur Untersuchung des Einflusses von zweiwertigen Kationen auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Die Untersuchungen erfolgten mit einem Zweistrahl-Photometer (Uvikon[®] 810, Kontron Biotek, München). Die Messungen wurden durch Zugabe des Substrates in die Messküvette gestartet.

3.2.1.1 Optimierung der Bedingungen für die photometrische Quantifizierung von Pyridoxal-5'-phosphat

Um die Messanordnung zu überprüfen, wurde die Änderung des Absorptionsspektrums in An- und Abwesenheit der Pyridoxal-Kinase bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11a und 3.11b dargestellt.

Abbildung 3.11a zeigt die zeitabhängige Änderung des Absorptionsspektrums von Pyridoxal in Abwesenheit der Pyridoxal-Kinase (Blindwert, Absorptionsänderung zwischen 0 Minuten und 20 Minuten) und Abbildung 3.11b in Anwesenheit der Pyridoxal-Kinase. Aufgenommen wurden jeweils UV-Vis-Spektren (180–500 nm) vor Zugabe von Pyridoxal (Blindwert, unterste Kurve), sofort nach Zugabe von Pyridoxal (0 Minuten) und 5, 10, 15 und 20 Minuten nach Zugabe von Pyridoxal. Die beiden Abbildungen zeigen, dass zeitabhängig die Absorption bei 388 nm zunimmt und das bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum liegt.

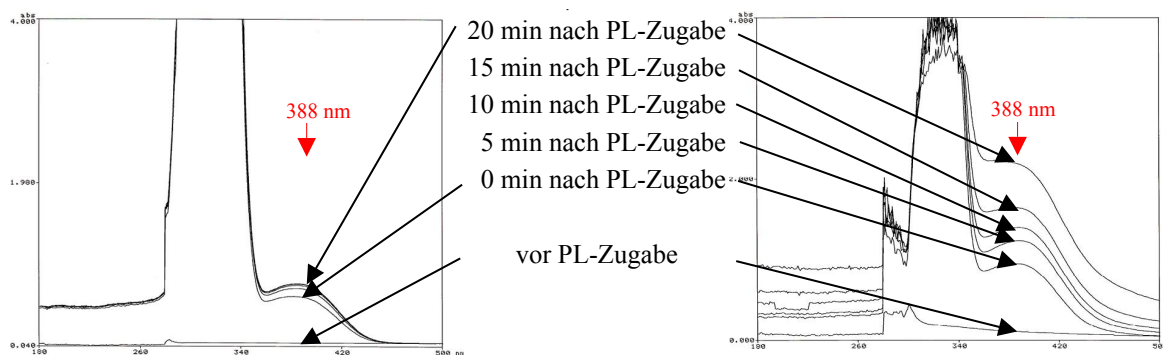


Abbildung 3.11a
Absorptionsänderung von Pyridoxal

Abbildung 3.11b
Absorptionsänderung durch den enzymatischen Umsatz von Pyridoxal zu Pyridoxal-5'-phosphat

Die Wellenlänge von 388 nm ist also geeignet, die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat

photometrisch zu verfolgen und ermöglicht die exakte Quantifizierung des gebildeten Pyridoxal-5'-phosphates. Der Vergleich der Abbildung 3.11a mit 3.11b zeigt, dass in Anwesenheit der Pyridoxal-Kinase (Abbildung 3.11b) eine größere Änderung der Absorption erfolgt, es aber auch in Abwesenheit der Pyridoxal-Kinase zu einer Absorptionzunahme bei 388 nm kommt (Abbildung 3.11a). Die in diesem Versuch gezeigte Absorptionsänderung bei 388 nm in Abwesenheit der Pyridoxal-Kinase (Blindwert) wurde in den nachfolgenden Auswertungen der enzymkinetischen Daten berücksichtigt.

Optimierung des Puffers

Für die Messungen wurde Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH-Wert 6,0) verwendet. Bei der Überprüfung des Testsystems stellte sich heraus, dass bereits ohne Vorliegen des Enzyms eine Absorptionsänderung allein mit dem Substrat Pyridoxal bei Konzentrationen höher als 0,25 mM erfolgte und die Absorption bei 388 nm zeitabhängig zunimmt (Abbildung 3.11a). Eine mögliche Erklärung ist die enzymunabhängige Phosphorylierung des Pyridoxals in Anwesenheit von ATP, die durch einen Phosphatpuffer möglicherweise noch weiter begünstigt wird. Eine Möglichkeit, diesen Effekt zu unterdrücken, schien die Wahl eines neuen Puffersystems. Es wurde daher MES-Puffer (0,1M, pH-Wert 6,0) eingesetzt. In diesem Puffer nahm die Absorption bei 388 nm zeitabhängig noch stärker zu, als bei Verwendung des Phosphatpuffers.

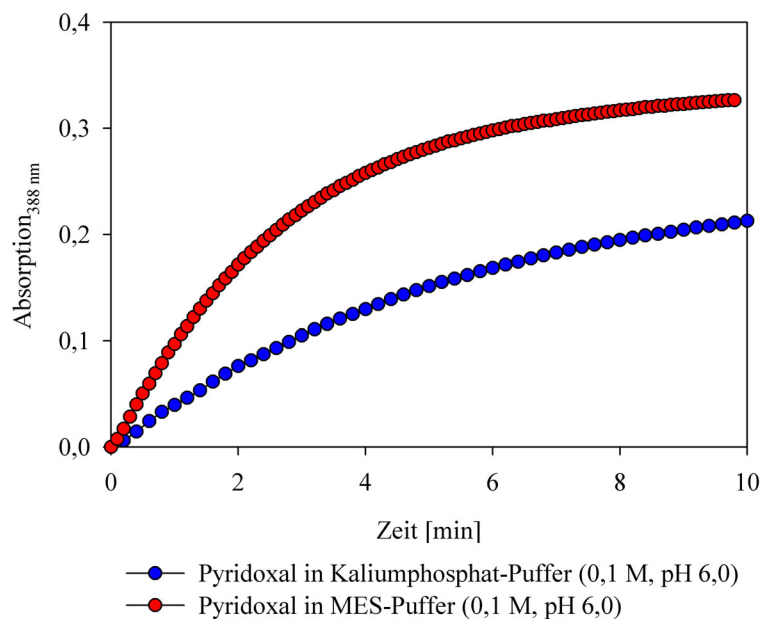


Abbildung 3.12 Vergleich der enzymunabhängigen Phosphorylierung von Pyridoxal in Kaliumphosphat- und MES-Puffer

Der MES-Puffer war also nicht geeignet, die enzymunabhängige Phosphorylierung des Pyridoxals zu vermindern. In Abbildung 3.12 ist dies graphisch dargestellt. Aufgrund des negativen Einflusses des MES-Puffers und aufgrund der Tatsache, dass die nicht enzymatische Phosphorylierung erst bei Pyridoxal-Konzentrationen größer 0,25 mM einen Einfluss auf das Messergebnis hat, wurde der Phosphatpuffer in den nachfolgenden Versuchen beibehalten und das Ausmaß der nicht enzymatischen Phosphorylierung bei der Auswertung berücksichtigt.

3.2.2 *QUANTIFIZIERUNG DER UMSETZUNG VON PYRIDOXAL UND STRUKTURANALOGA DURCH DIE PYRIDOXAL-KINASE ZU DEN 5'-PHOSPHATEN MITTELS HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIG-CHROMATOGRAPHIE*

Nur die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat aus Pyridoxal lässt sich photometrisch verfolgen. Daher wurde zur Quantifizierung des Umsatzes der anderen Vitamere und deren Strukturanaloga die HPLC eingesetzt. Angewandt wurde eine von Mahuren und Coburn (1990) entwickelte und von Arenz (1996) modifizierte Methode zur Bestimmung von Vitamin B₆ und Strukturanaloga (Kapitel 2.6.5). Zur Detektion der einzelnen Verbindungen wurde deren Eigenfluoreszenz ausgenutzt. Zur Detektion von Ginkgotoxin/Ginkgotoxin-5'-phosphat erfolgte, wie von Mahuren und Coburn (1990) beschrieben, die Fluoreszenz-anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm und die Emissionsmessung bei $\lambda_{\text{em}} = 400$ nm. Bei Pyridoxal, Pyridoxamin, Pyridoxin, Desoxypyridoxin und den entsprechenden 5'-Phosphaten erfolgte die Detektion bei $\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm (Rizzolo und Polesello, 1992). Die HPLC-Chromatogramme der untersuchten Verbindungen sind in Kapitel 7.5 abgebildet.

3.3 Charakterisierung der rekombinanten menschlichen Pyridoxal-Kinase

3.3.1 *CHARAKTERISIERUNG DES MALTOSE-BINDENDEN FUSIONSPROTEINS*

Für die Untersuchungen wurde der zellfreie Proteinrohextrakt (Kapitel 2.5.1.2) entweder direkt oder nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Kapitel 2.5.1.3) eingesetzt. Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat wurde mit dem in Kapitel 2.6.1.4 beschriebenen photometrischen Test untersucht. Die Proteinmenge wurde entsprechend der Methode nach Bradford quantifiziert (Kapitel 2.6.1.3).

3.3.1.1 Vergleichende Aktivitätsmessungen der Rohextrakte des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X-PKH) und des Kontrollstammes XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X)

Vergleichende Aktivitätsmessungen mit dem Kontrollstamm XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X) sollten klären, ob die durch den rekombinanten Stamm XL1-Blue MRF' Kan(pMAL-c2X-PKH) überexprimierte Pyridoxal-Kinase aktiv war. Die Pyridoxal-Kinaseaktivität des überexprimierten Fusionsproteins, wurde mit der *Escherichia coli* eigenen Pyridoxal-Kinaseaktivität verglichen. Die Messungen wurden im zellfreien Proteinrohextrakt durchgeführt. Für diese Messungen wurden jeweils 1500 µg Protein eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 4,0 mM. Die Absorptionszunahme wurde bei 388 nm über 20 Minuten verfolgt. In Abbildung 3.13 ist das Ergebnis der Messungen graphisch dargestellt.

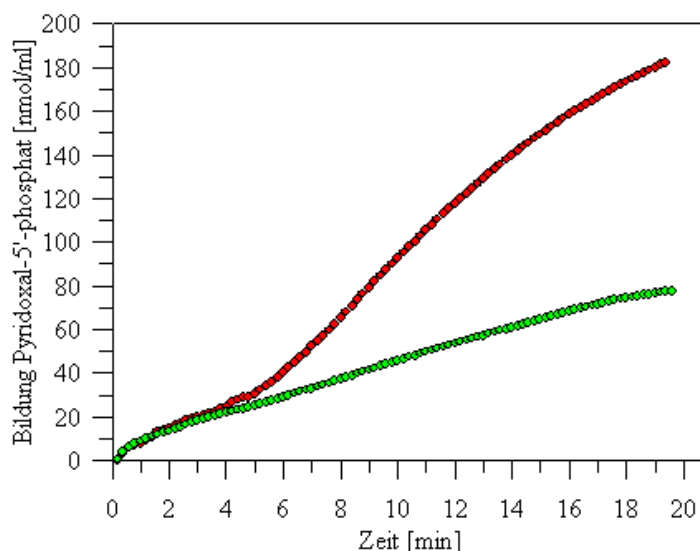


Abbildung 3.13 Vergleich der Pyridoxal-Kinaseaktivität des Rohextraktes des Kontrollstammes XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X) (grüne Kurve) mit der Aktivität des rekombinanten Stammes XL1-Blue MRF' Kan (pMAL-c2X-PKH) (rote Kurve)

Die Abbildung zeigt, dass der Proteinrohextrakt mit der rekombinanten Pyridoxal-Kinase eine deutlich höhere Aktivität aufwies als der Proteinrohextrakt ohne rekombinante Pyridoxal-Kinase. Daraus lässt sich schließen, dass das überexprimierte Fusionsprotein aktiv ist. Die Absorptionszunahme in der Kontrollinkubation beruht auf den in *Escherichia coli* vorkommenden Pyridoxal-Kinasen *PdxK* und *PdxY*.

3.3.1.2 Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung des Maltose-bindenden Fusionsproteins

In Abbildung 3.14 und 3.15 ist die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung in Abhängigkeit von der

Menge des eingesetzten Proteinrohextraktes des Fusionsproteins dargestellt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 4 mM. In den Messungen wurden 250 μg , 500 μg , 750 μg , 1000 μg und 1500 μg Proteinrohextrakt eingesetzt. Die Absorptionsänderung wurde bei 388 nm über 20 Minuten verfolgt. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 3.14 graphisch dargestellt.

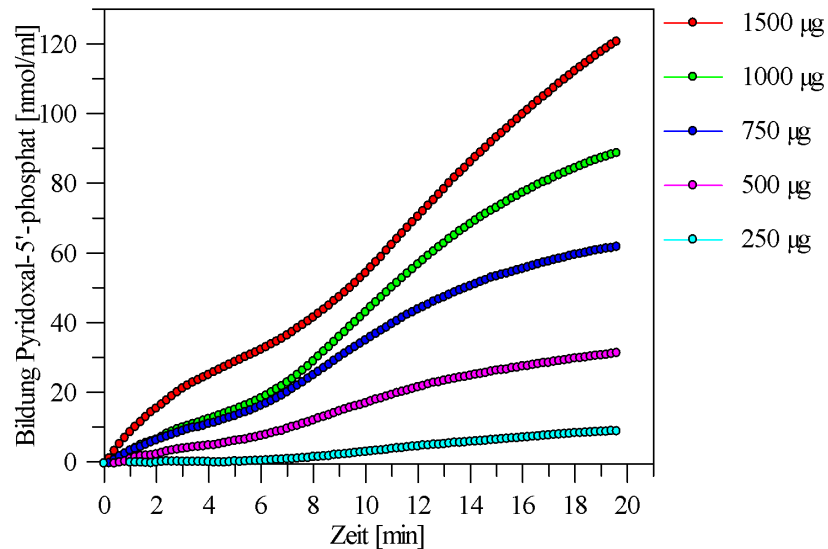


Abbildung 3.14 Abhängigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung von der eingesetzten Menge Proteinrohextrakt und der Zeit

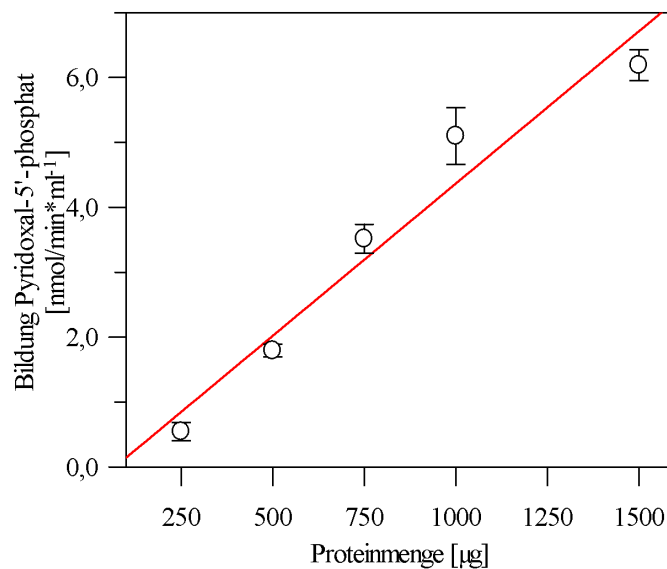


Abbildung 3.15 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Menge Proteinrohextrakt

Mit steigender Proteinmenge nahm die Geschwindigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung zu (Abbildung 3.14). Die Messergebnisse zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Proteinmenge und der Menge des gebildeten Pyridoxal-5'-phosphates pro Minute (Abbildung 3.15). Aussagekräftige Werte für die Aktivität eines

Enzyms werden nur erhalten, wenn die Enzymkonzentration der limitierende Faktor der Reaktionsgeschwindigkeit im Testsystem ist und die Messwerte zur eingesetzten Enzymmenge proportional sind. Die weiteren Versuche mit dem Maltose-bindenden Fusionsprotein konnten unter den hier vorliegenden Bedingungen durchgeführt werden.

3.3.1.3 Untersuchung der Stabilität des Pyridoxal-Kinasefusionsproteins im Proteinrohextrakt

Der Einfluss der Lagerung bei -20 °C auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase wurde im Proteinrohextrakt untersucht. Eingesetzt wurden $1500\text{ }\mu\text{g}$ des Proteinrohextraktes der als Fusionsprotein exprimierten Pyridoxal-Kinase. Der entsprechend Kapitel 2.5.1.2 erzeugte Rohextrakt wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

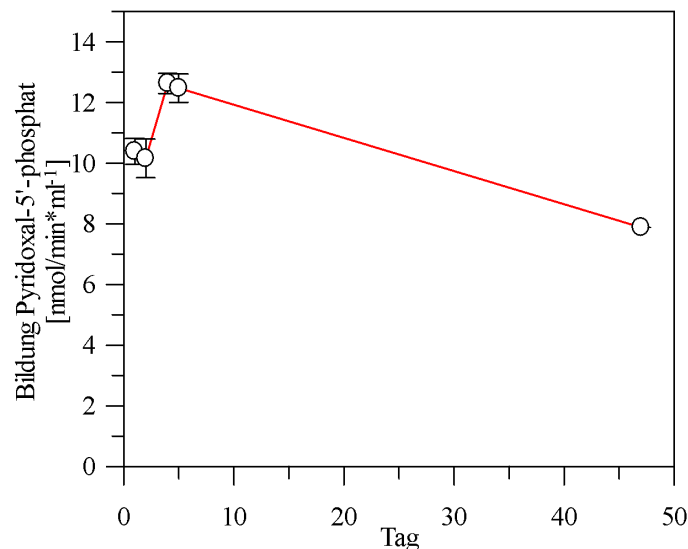


Abbildung 3.16 Untersuchung der Stabilität des Pyridoxal-Kinasefusionsprotein im Proteinrohextrakt

Ein Aliquot der Pyridoxal-Kinase wurde am Messtag auf Eis aufgetaut und die Aktivität gemessen. Die Pyridoxal-Konzentration betrug $4,0\text{ mM}$. Die Absorptionsänderung wurde bei 388 nm über 20 Minuten verfolgt. Das Ergebnis der Stabilitätsuntersuchung ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass der Proteinrohextrakt über mehrere Wochen eine ausreichend hohe Aktivität aufwies. Für die nachfolgenden enzymkinetischen Untersuchungen wurde ein Proteinrohextrakt eingesetzt, der nicht älter als 3 Wochen war.

3.3.1.4 Photometrische Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Rohextrakt des Fusionsproteins

Die Michaelis-Konstante K_m ist ein wichtiges Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat. Es ist die Substratkonzentration, bei der die Umsetzung des Substrates mit halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit erfolgt. Je höher der K_m -Wert ist, desto höher muss die Substratkonzentration sein, damit die Reaktion bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit abläuft. Ein niedriger K_m -Wert bezeichnet damit eine hohe Substrataffinität des Enzyms. Die Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten nach Michaelis und Menten wurden unter den zuvor ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen der Pyridoxal-Kinase durchgeführt. Zur photometrischen Bestimmung der K_m -Werte wurde bei 388 nm die Absorptionsänderung bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen verfolgt. Die Werte für die Absorption wurden in nmol Pyridoxal-5'-phosphat umgerechnet. Aus diesen Werten wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten berechnet (Bildung PLP in $\text{nmol/mg}\cdot\text{min}^{-1}$) und in der Michaelis-Menten-Kurve und im Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt.

Für die Bestimmung des K_m -Wertes wurden 1500 μg Proteinrohextrakt berechnet als BSA eingesetzt. Die Absorptionsänderung bei 388 nm wurde über 20 Minuten beobachtet. Die Pyridoxal-Konzentration variierte bei den Messungen zwischen 1,0 mM und 12,0 mM.

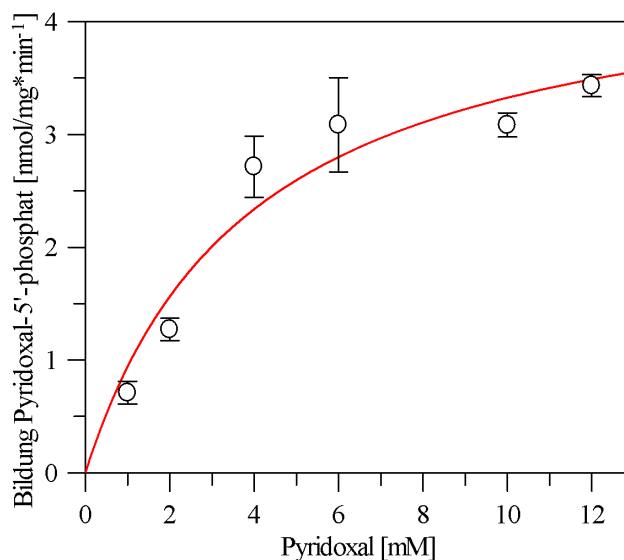


Abbildung 3.17 Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Rohextrakt der als Fusionsprotein überexprimierten Pyridoxal-Kinase

Die Absorptionsänderung pro Zeiteinheit wurde in Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung pro Zeit umgerechnet. Die entsprechende Michaelis-Menten-Kurve ist in Abbildung 3.17, das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.18 dargestellt.

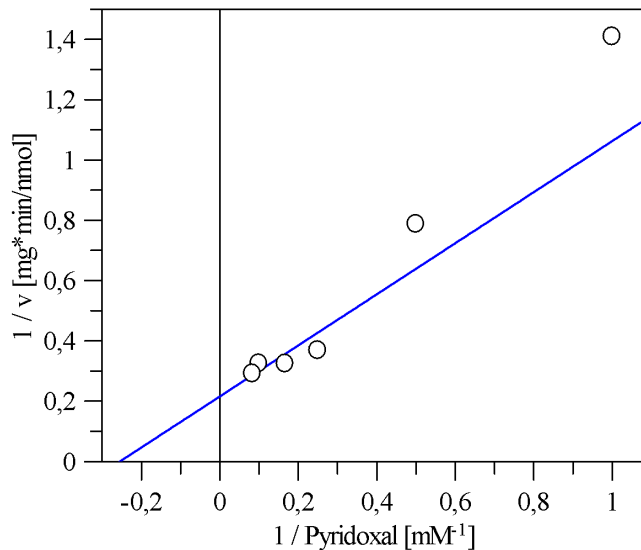


Abbildung 3.18 Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Rohextrakt der als Fusionsprotein überexprimierten Pyridoxal-Kinase

Im Rohextrakt mit überexprimiertem Pyridoxal-Kinasefusionsprotein wurde photometrisch ein K_m -Wert von $3,92 \pm 1,51 \times 10^{-3}$ M für Pyridoxal ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $4,63 \pm 0,68 \times 10^{-9}$ mol/mg*min⁻¹. Auffällig ist, dass der K_m -Wert hoch und der V_{max} -Wert vergleichsweise klein ist (vergleiche Kapitel 3.3.2.1.7 und 3.3.2.2.6). Das Pyridoxal-Kinasefusionsprotein hat eine geringere Affinität zu Pyridoxal im Vergleich zur nativ exprimierten Pyridoxal-Kinase.

3.3.1.5 Einfluss der Abspaltung des Maltose-bindenden Proteins von dem Pyridoxal-Kinasefusionsprotein auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase

In vielen Fällen weisen Fusionsproteine eine höhere Stabilität auf als das reine Zielprotein. Trotzdem sollte das Maltose-bindende Protein von der Pyridoxal-Kinase abgespalten werden, da der Fusionsanteil die Aktivität der Pyridoxal-Kinase durch sterische Behinderung mindern kann. Durch die Hydrolyse lässt sich auch die korrekte Translation überprüfen. Wird das Fusionsprotein in Fusionsanteil und Zielprotein der richtigen Größen gespalten, kann davon ausgegangen werden, dass das Fusionstranskript korrekt translatiert wurde und kein Leserasterfehler aufgetreten ist. Die Abspaltung des Fusionsanteils vom Zielprotein erfolgte nach vorheriger Aufreinigung des Fusionsproteins mit der in Kapitel 2.5.1.3.1 beschriebenen Methode. Zu Beginn der Hydrolyse, nach 2, 4, 6, 8, 16 und 24 Stunden Inkubation mit Faktor Xa wurde jeweils ein Aliquot des Hydrolyseansatzes als Probe für die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und für Aktivitätsmessungen (Abbildung 3.20 und 3.21) entnommen. Das Proteingel zu Überprüfung der Abspaltung des Maltose-bindenden Proteins von der Pyridoxal-Kinase mit Faktor Xa ist in

Abbildung 3.19 dargestellt.

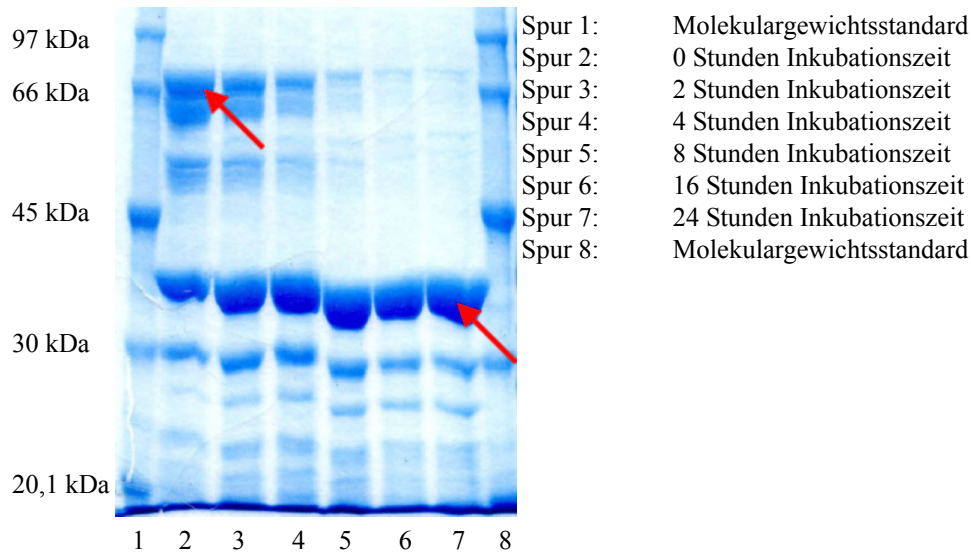


Abbildung 3.19 SDS-PAGE zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit des Fusionsproteins mit Faktor Xa zur Abspaltung des Maltose-bindenden Proteins von der Pyridoxal-Kinase. Die roten Pfeile markieren das Fusionsprotein und die Pyridoxal-Kinase

Während zu Beginn der Hydrolyse noch ein großer Teil des Fusionsproteins (Spur 2, roter Pfeil) vorhanden war, lag nach 8 Stunden fast das gesamte Fusionsprotein hydrolysiert vor (Spur 8, roter Pfeil) und die Stärke der Bande des Fusionsproteins hatte deutlich abgenommen. Das Proteingel zeigt die erfolgreiche Abspaltung des Maltose-bindenden Proteins und dass ein Protein der korrekten Größe (Pyridoxal-Kinase 35,1 kDa) erhalten wurde.

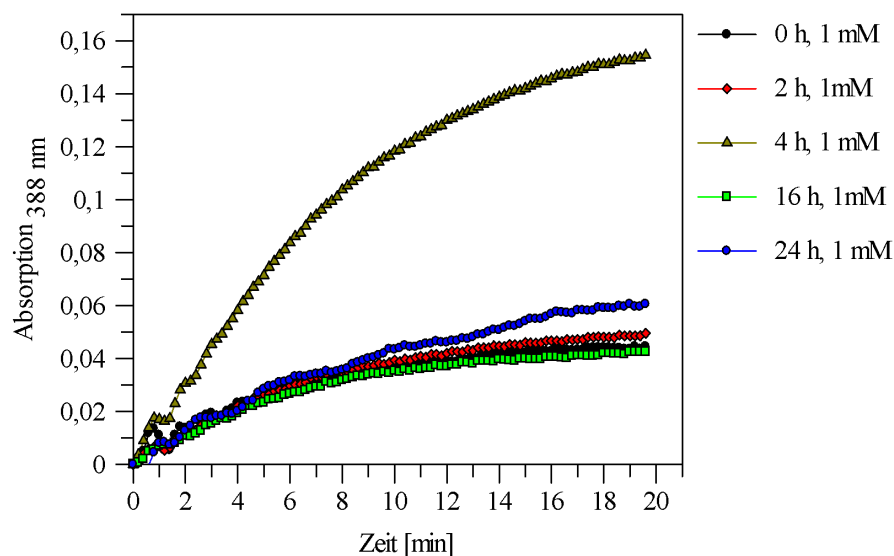


Abbildung 3.20 Aktivität der Pyridoxal-Kinase in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer mit Faktor Xa, Pyridoxal-Konzentration im Ansatz: 1,0 mM

Abbildung 3.20 und 3.21 zeigen den Einfluss der Inkubation mit Faktor Xa auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase. Abweichend vom Standardassay wurde die Absorptionsänderung bei 388 nm mit Pyridoxal-Konzentrationen von 1,0 mM (Abbildung 3.20) und 4,0 mM (Abbildung 3.21) über 20 Minuten verfolgt. Für die Aktivitätsmessungen wurden 100 µg Protein eingesetzt. Die Abbildungen zeigen, dass das Aktivitätsmaximum bei beiden Substratkonzentrationen nach 4 Stunden Inkubation erreicht wurde, obwohl zu diesem Zeitpunkt die Hydrolyse noch nicht vollständig abgeschlossen war (Abbildung 3.19). Die nach 16 und 24 Stunden Inkubation signifikant geringere Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu der Aktivität nach 4 Stunden Inkubation zeigt, dass das Protein bei 4 °C nicht ausreichend stabil ist.

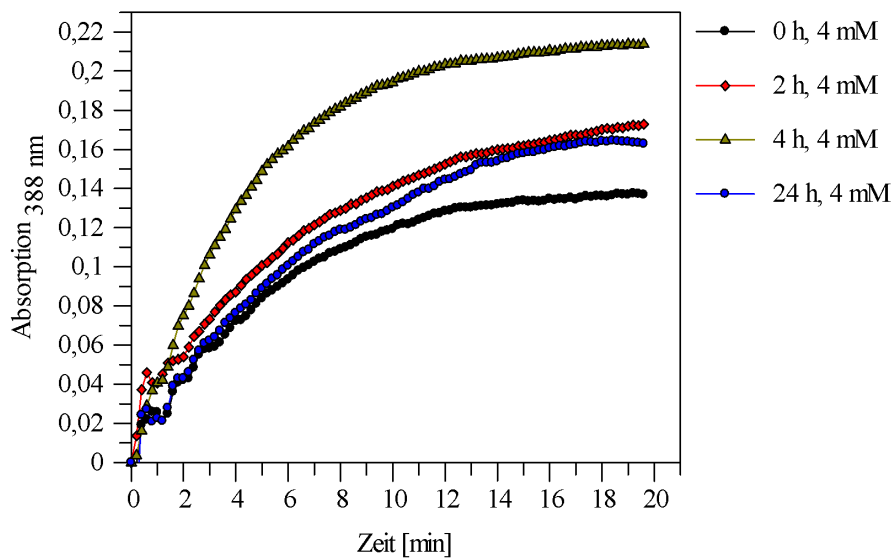


Abbildung 3.21 Aktivität der Pyridoxal-Kinase in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer mit Faktor Xa, Pyridoxal-Konzentration im Ansatz: 4,0 mM

Zeit [h]	Bildung PLP [nmol/min*mg ⁻¹]	Bildung PLP [nmol/min*mg ⁻¹]
	1,0 mM Pyridoxal	4,0 mM Pyridoxal
0	7,28	22,6
2	8,13	24,5
4	25,2	35,1
16	7,21	---
24	8,14	25

Tabelle 3.2 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit des Pyridoxal-Kinasefusionsproteins mit Faktor Xa. Bestimmt wurde die Reaktionsgeschwindigkeit bei zwei verschiedenen Pyridoxal-Konzentrationen (1 mM und 4 mM)

Die Änderung der Absorption wurde in Reaktionsgeschwindigkeiten umgerechnet und ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben. Nach 4 Stunden Inkubation mit Faktor Xa werden bei einer Substratkonzentration von 1,0 mM 25,2 nmol Pyridoxal-5'-phosphat pro mg Protein pro

Minute gebildet. Dieser Versuch zeigt, dass sich die Aktivität der Pyridoxal-Kinase durch Abspaltung des Maltose-bindenden Proteins signifikant steigern lässt. Die erhaltene Pyridoxal-Kinase weist trotzdem im Vergleich zur nativ exprimierten Pyridoxal-Kinase eine geringere Aktivität (vergleiche Kapitel 3.3.2.2.1) auf. Zudem war es mit dieser Methode nicht möglich, ein sauberes Protein zu erhalten. Für die Charakterisierung der Pyridoxal-Kinase und zur Untersuchung des Einflusses von Ginkgotoxin wurde daher die nativ exprimierte Pyridoxal-Kinase eingesetzt.

3.3.2 CHARAKTERISIERUNG DER NATIVEN PYRIDOXAL-KINASE

Für die Untersuchungen wurde der zellfreie Proteinrohextrakt (Kapitel 2.5.1.2) entweder direkt oder nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Kapitel 2.5.1.4) eingesetzt. Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat wurde mit dem in Kapitel 2.6.1.4 beschriebenen Test untersucht. Die Proteinmenge wurde entsprechend der Methode nach Bradford quantifiziert (Kapitel 2.6.1.3).

3.3.2.1 Charakterisierung der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt

3.3.2.1.1 Vergleich der Aktivität des Kontrollstammes BL21(DE3)(pET-11a) mit der Aktivität des rekombinanten Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH) im Proteinrohextrakt

Die Prüfung, ob die durch den rekombinanten Stamm BL21(DE3)(pET-11a-PKH) überexprimierte Pyridoxal-Kinase aktiv ist, erfolgte durch vergleichende Aktivitätsmessungen mit dem Kontrollstamm BL21(DE3)(pET-11a). Die Messungen wurden im zellfreien Proteinrohextrakt durchgeführt. Es wurde die Aktivität von 12 erzeugten Klonen überprüft. Es wurde also die Pyridoxal-Kinaseaktivität von *Escherichia coli* mit der Aktivität der menschlichen Pyridoxal-Kinase verglichen. Für diese Aktivitätsmessungen wurden jeweils 1500 µg Proteinrohextrakt eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 4,0 mM. Die Absorptionsänderung bei 388 nm wurde über 20 Minuten verfolgt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen bei 37 °C durchgeführt. Die Proteinrohextrakte mit der nativ überexprimierten Pyridoxal-Kinase weisen eine signifikant höhere Aktivität auf, als der Kontrolleextrakt. 10 der 12 Klone zeigten Aktivität. In Abbildung 3.22 sind beispielhaft die Ergebnisse der Messungen der Klone T1/7 (rot), T1/13 (blau) und der Kontrolle (grün) graphisch dargestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeit betrug $7,16 \pm 0,25 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$ für Klon T1/7, $7,83 \pm 0,22 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$ für Klon T1/13 und $0,78 \pm 0,33 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$ für

die Kontrolle.

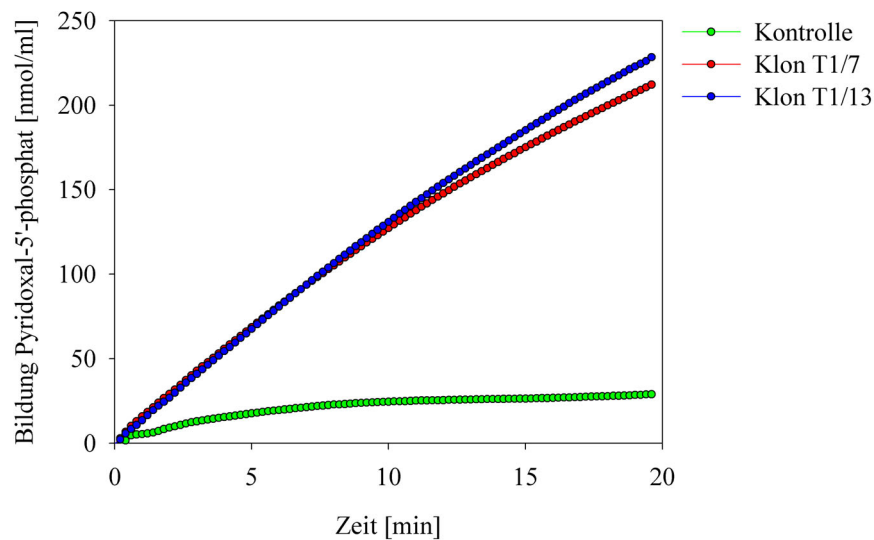


Abbildung 3.22 Vergleich der Pyridoxal-Kinaseaktivität im Rohextrakt des Kontrollstammes BL21(DE3)(pET-11a) (grüne Kurve) mit den Aktivitäten der Klone T1/7 (rote Kurve) und T1/13 (blaue Kurve) des rekombinanten Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH)

Die Pyridoxal-Kinase konnte also erfolgreich überexprimiert werden und ist aktiv im Proteinrohextrakt. Klon T1/7, mit der Bezeichnung BL21(DE3)(pET-11a-PKH-T1/7), wurde für die enzymkinetische Charakterisierung der Pyridoxal-Kinase und die nachfolgenden Hemmstudien eingesetzt.

3.3.2.1.2 Expression der Pyridoxal-Kinase im *Escherichia coli* Stamm Rosetta(DE3)

Der *Escherichia coli* Stamm Rosetta(DE3) wurde mit dem Plasmid pET-11a-PKH transformiert, um die Überexpression der Pyridoxal-Kinase in *Escherichia coli* zu steigern. Dieser Stamm wurde gewählt, weil er für die Expression von eukaryotischen Proteinen, die Codons benötigen, die in *Escherichia coli* kaum verwendet werden, optimiert wurde. Es wurden Aktivitätsmessungen mit dem Rohextrakt des so erhaltenen Stammes Rosetta(DE3)(pET-11a-PKH) durchgeführt. Die Hauptkulturen wurden 4, 24 und 72 Stunden nach Induktion der Proteinexpression geerntet. Mit dem nach Kapitel 2.5.1.2 gewonnenen Proteinrohextrakt wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt, um die optimale Expressionszeit zu ermitteln. Für die Inkubationen wurden 100 µg Proteinrohextrakt eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 0,05 mM. Nach 4 Stunden betrug die Reaktionsgeschwindigkeit $25,7 \pm 2,93 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$ und nach 24 Stunden $27,9 \pm 0,69 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Reaktionsgeschwindigkeit war 4 beziehungsweise 24 Stunden nach Induktion der Proteinexpression durch IPTG deutlich höher als 72 Stunden nach Induktion. Die Kulturen für die folgenden Versuche wurden deshalb 24 Stunden nach Induktion der

Proteinexpression geerntet, da die Aktivität bei einer längeren Inkubationszeit wieder sinkt. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3.23 graphisch dargestellt.

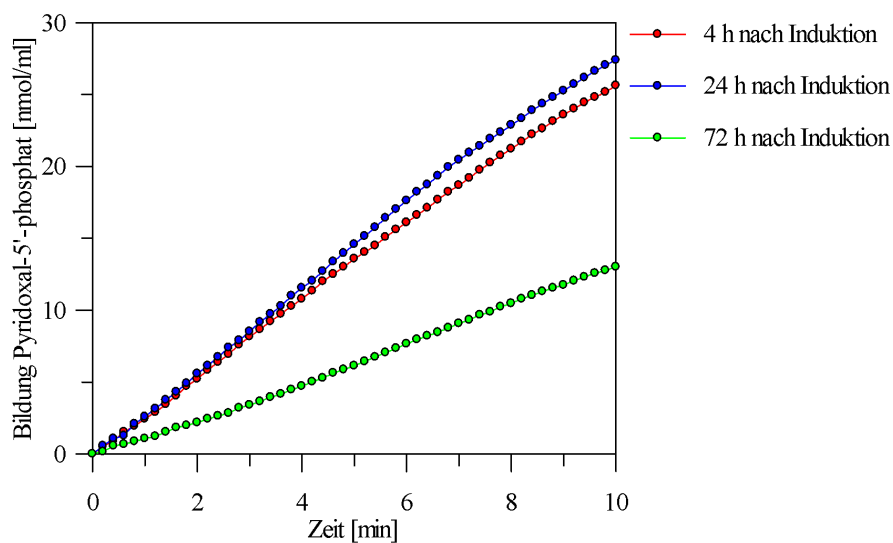


Abbildung 3.23 Abhängigkeit der Aktivität des Proteinrohextraktes von der Expressionszeit im Stamm Rosetta(DE3)(pET-11a-PKH)

Die im Stamm Rosetta(DE3) überexprimierte Pyridoxal-Kinase hatte bei Messungen im Proteinrohextrakt keine signifikant höhere Aktivität im Vergleich zum Stamm BL21(DE3) (Abbildung 3.24, rote Kurve, $v = 31,4 \pm 0,04 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$). Für alle weiteren Versuche wurden Hauptkulturen des Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH) eingesetzt, die nach 24 Stunden geerntet wurden.

3.3.2.1.3 Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung im Rohextrakt der nativen Pyridoxal-Kinase

In Abbildung 3.24 und 3.25 ist die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Proteinrohextrakt dargestellt. Es wurden 100 μg , 250 μg und 500 μg Proteinrohextrakt eingesetzt. Mit steigender Proteinmenge steigt auch die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat. Die Messergebnisse zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Proteinmenge und der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung pro Minute. Aussagekräftige Werte für die Aktivität eines Enzyms werden nur erhalten, wenn die Enzymkonzentration der limitierende Faktor der Reaktionsgeschwindigkeit im Testsystem ist und das Messsignal zur eingesetzten Enzymmenge direkt proportional ist. Die weiteren Versuche mit dem Proteinrohextrakt der nativ exprimierten Pyridoxal-Kinase konnten unter den hier vorliegenden Bedingungen durchgeführt werden.

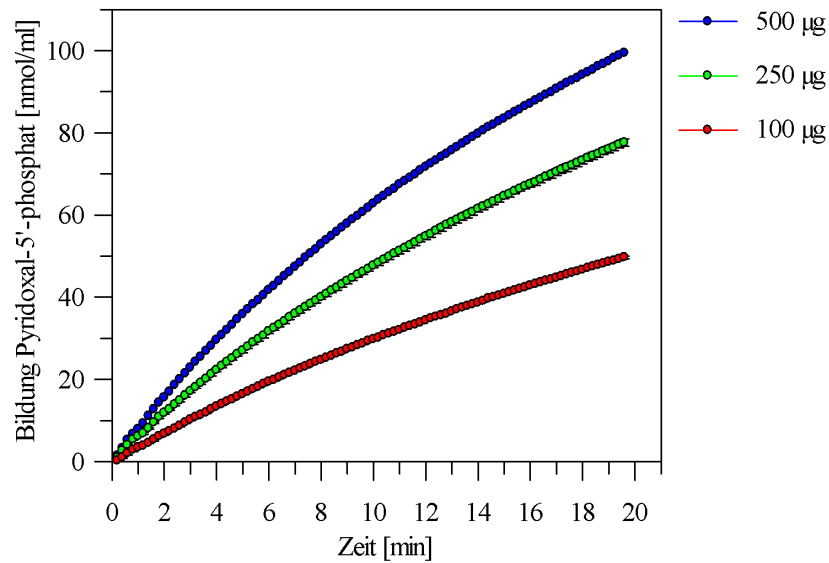


Abbildung 3.24
Proteinrohextrakt

Abhängigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung von der eingesetzten Menge

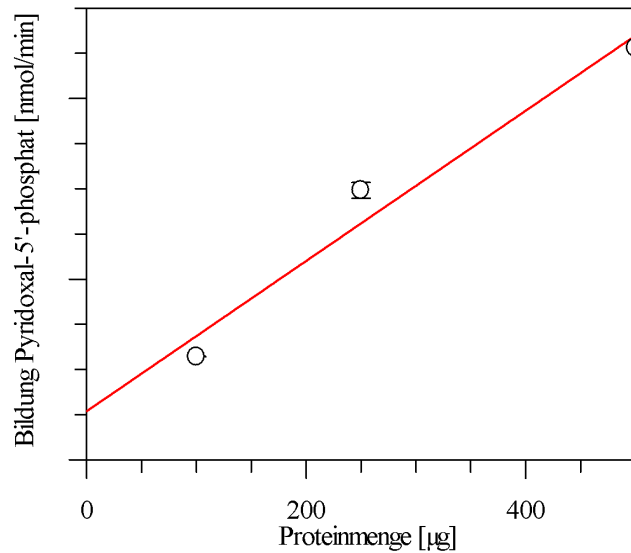


Abbildung 3.25
Proteinrohextrakt

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Menge

3.3.2.1.4 Untersuchung der Stabilität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt

Im Proteinrohextrakt wurde der Einfluss der Lagerung bei -20 °C auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase untersucht. Der nach Kapitel 2.5.1.2 erzeugte Rohextrakt wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Am Messtag wurde ein Aliquot der Pyridoxal-Kinase auf Eis aufgetaut und die Aktivität gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeit am ersten Messtag wurde als 100 % definiert. Aus Abbildung 3.26 ist ersichtlich, dass die Pyridoxal-Kinaseaktivität des Rohextraktes über die ersten 3 Wochen nahezu gleich blieb und dann kontinuierlich abnahm. Aktivitätsmessungen konnten daher noch bis zu drei Wochen nach Gewinnung des Rohextraktes durchgeführt werden.

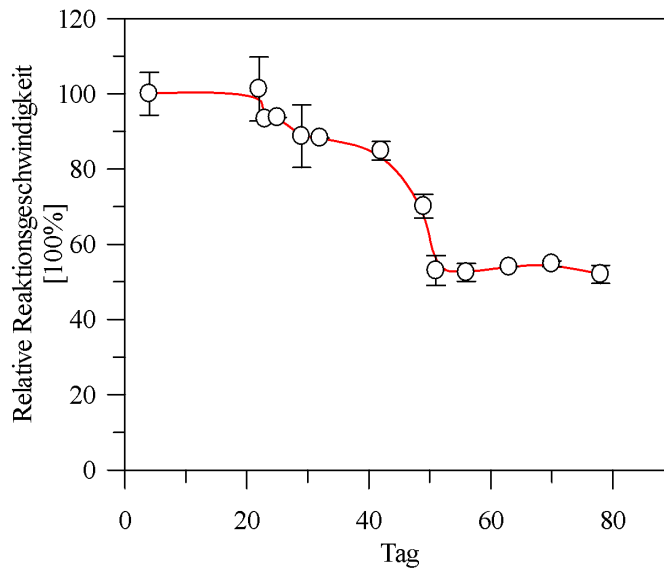


Abbildung 3.26 Untersuchung der Stabilität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt

3.3.2.1.5 Bestimmung des pH-Optimums der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt

Das pH-Optimum der Pyridoxal-Kinase wurde im Proteinrohextrakt für den pH-Bereich von 5,5 bis 8,0 bestimmt.

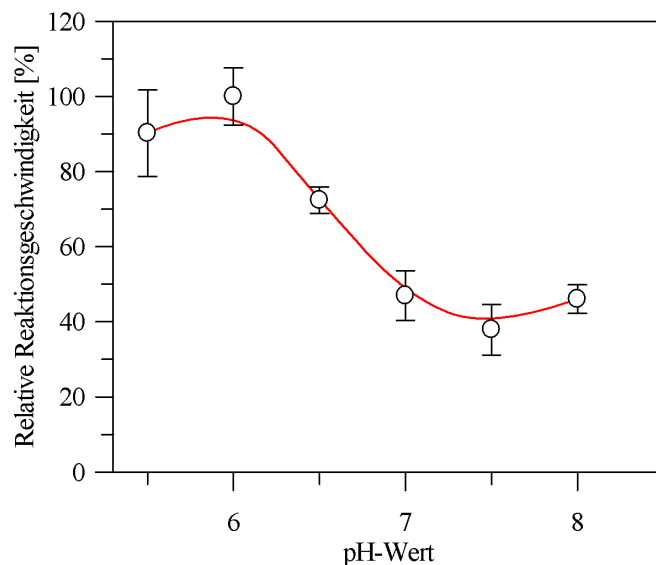


Abbildung 3.27 Bestimmung des pH-Optimums im Rohextrakt der nativen Pyridoxal-Kinase

Es wurde die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat aus Pyridoxal über 20 Minuten bei 388 nm verfolgt. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei pH-Wert 6,0 wurde als 100 % definiert. Die bei den weiteren pH-Werten ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden 100 µg Proteinrohextrakt eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 0,05 mM. Das Ergebnis

der Untersuchung ist in Abbildung 3.27 dargestellt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die native Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt ein Reaktionsoptimum bei pH-Wert 6,0 hat.

3.3.2.1.6 Bestimmung des Temperatur-Optimums der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt

Das Temperatur-Optimum der nativen Pyridoxal-Kinase wurde im Proteinrohextrakt für den Temperaturbereich von 10 bis 60 °C bestimmt. Um eine genaue Temperatureinstellung zu gewährleisten, erfolgte die Inkubation in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen). Vor Substratzugabe wurden die Reaktionsansätze bei der Untersuchungstemperatur 3 Minuten temperiert. Nach Substratzugabe erfolgte die Inkubation für 5 Minuten. Zur Inaktivierung der Kinase wurden die Messansätze anschließend für 15 Minuten im Thermoblock auf 100 °C erhitzt. Die denaturierten Proteine wurden abzentrifugiert (20000xg, 5 Minuten) und die Absorption bei 388 nm im Überstand bestimmt.

Die Messergebnisse zeigten, dass die Aktivität des Pyridoxal-Kinaserohextraktes im Bereich um 37 °C ein lokales Maximum hat. Auffällig bei den Messergebnissen waren die großen Standardabweichungen. Die Instabilität von Pyridoxal-5'-phosphat ist eine mögliche Ursache für die hohen Standardabweichungen. Zur Verdeutlichung der Instabilität von Pyridoxal-5'-phosphat ist im Anhang das Spektrum einer frischen Pyridoxal-5'-phosphatlösung (Abbildung 7.7) und einer 24 Stunden alten Pyridoxal-5'-phosphatlösung (Abbildung 7.8) abgebildet. Es ist zu erkennen, dass das Maximum von Pyridoxal-5'-phosphat bei 388 nm nach 24 Stunden Lagerung bei -20 °C deutlich gesunken ist und Pyridoxal-5'-phosphat sich zu Pyridoxal zersetzt. Das Erhitzen der Proben zur Inaktivierung der Pyridoxal-Kinase (100 °C, 15 Minuten) hat in diesem Versuch zu einem teilweisen Abbau des gebildeten Pyridoxal-5'-phosphates und damit zu sehr hohen Standardabweichungen geführt. Da weitere im Proteinrohextrakt vorhandene Proteine einen Einfluss auf die Aktivität der Kinase haben können, wurde das Temperatur-Optimum ebenfalls für die gereinigte Pyridoxal-Kinase (Kapitel 3.3.2.2.4) bestimmt.

3.3.2.1.7 Photometrische Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Rohextrakt der nativen Pyridoxal-Kinase

Für die Bestimmung des K_m -Wertes im Proteinrohextrakt der nativen Pyridoxal-Kinase wurden 100 µg Gesamtprotein berechnet als BSA eingesetzt. Die Absorptionsänderung bei 388 nm wurde über 20 Minuten beobachtet. Die Pyridoxal-Konzentration variierte bei den

Messungen zwischen 0,025 mM und 4,0 mM. Die Absorptionsänderung pro Zeiteinheit wurde in Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung pro Zeit umgerechnet. Die entsprechende Michaelis-Menten-Kurve ist in Abbildung 3.28, das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.29 dargestellt.

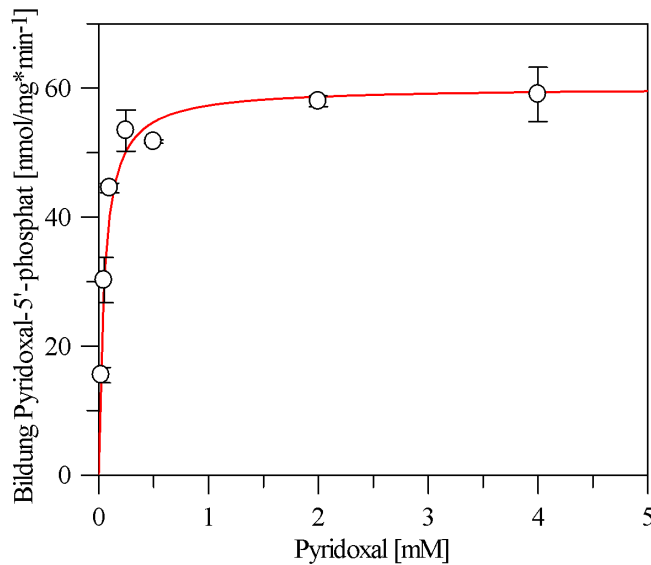


Abbildung 3.28 Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Proteinrohextrakt der nativ überexprimierten Pyridoxal-Kinase

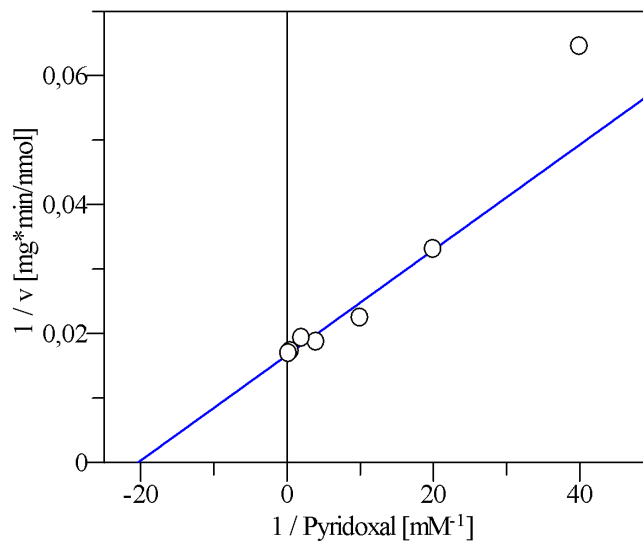


Abbildung 3.29 Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal im Proteinrohextrakt der nativ überexprimierten Pyridoxal-Kinase

Im Rohextrakt mit nativ überexprimierter Pyridoxal-Kinase wurde photometrisch ein K_m -Wert von $4,91 \pm 0,86 \times 10^{-5}$ M für Pyridoxal ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $6,01 \pm 0,22 \times 10^{-8}$ mol/mg*min⁻¹. Der Vergleich mit dem für den Proteinrohextrakt des Fusionsproteins ermittelten K_m -Wert ($3,92 \pm 1,51 \times 10^{-3}$ M) zeigt, dass die native Pyridoxal-Kinase eine höhere Affinität zu Pyridoxal hat. Das Maltosebindende Protein beeinflusst also die Affinität der Pyridoxal-Kinase zum Substrat. Die

maximale Reaktionsgeschwindigkeit des nativ exprimierten Enzyms ist ebenfalls deutlich höher als die des Fusionsproteins. Dies kann auf den Einfluss des Maltose-bindenden Proteins und auf den möglicherweise unterschiedlichen prozentualen Anteil der Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt zurückgeführt werden.

3.3.2.2 Charakterisierung der nativen Pyridoxal-Kinase nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration

3.3.2.2.1 Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Enzymaktivität der gereinigten Pyridoxal-Kinase

In Abbildung 3.30 und 3.31 ist die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung in Abhängigkeit von der eingesetzten Pyridoxal-Kinase-Menge dargestellt.

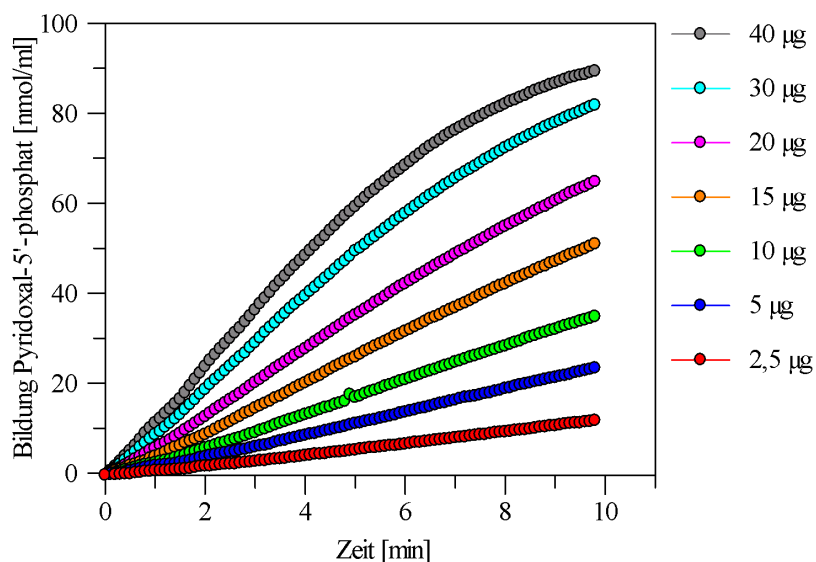


Abbildung 3.30
Abhängigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung von der eingesetzten Pyridoxal-Kinase-Menge

Abhängigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung von der eingesetzten Pyridoxal-Kinase-Menge

Die Pyridoxal-Konzentration betrug in den Messungen 0,1 mM und es wurden 2,5–40 µg Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Mit steigender Proteinmenge steigt auch die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung an (Abbildung 3.30). Die Messergebnisse zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Proteinmenge und der Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat pro Minute (Abbildung 3.31). Unter den Versuchsbedingungen ist die Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Enzymmenge abhängig und das Enzym ist mit Pyridoxal gesättigt. Aussagekräftige Werte für die Aktivität eines Enzyms werden nur erhalten, wenn die Enzymkonzentration der limitierende Faktor der Reaktionsgeschwindigkeit im Testsystem ist und das Messsignal zur eingesetzten Enzymmenge direkt pro-

portional ist.

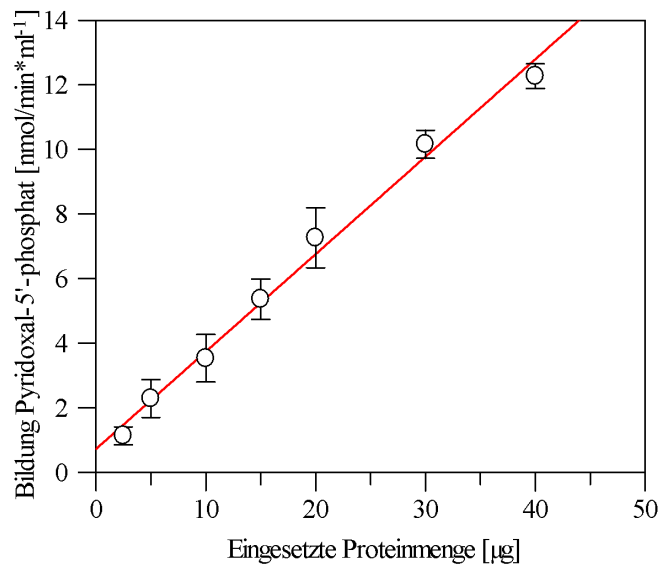


Abbildung 3.31 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Pyridoxal-Kinase-Menge

Die weiteren Versuche mit gereinigter nativ exprimierter Pyridoxal-Kinase konnten unter den hier vorliegenden Bedingungen durchgeführt werden. Für die nachfolgenden Versuche wurden 2,5–10 µg gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt, da bei diesen Konzentrationen das Enzym mit dem Substrat gesättigt ist.

3.3.2.2.2 Untersuchung der Stabilität der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Es wurde der Einfluss der Lagerung bei -20 °C auf die Aktivität der gereinigten Pyridoxal-Kinase untersucht. Das nach Kapitel 2.5.1.4 gereinigte Enzym wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Am Messtag wurde ein Aliquot der Pyridoxal-Kinase aufgetaut und Aktivitätsmessungen durchgeführt. Für die Messungen wurden 10 µg gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 0,05 mM. Das Ergebnis der Stabilitätsuntersuchung ist in Abbildung 3.32 dargestellt. Die Stabilitätsuntersuchung erfolgte über 42 Tage. Die Aktivität der Pyridoxal-Kinase war über den gesamten Untersuchungszeitraum ausreichend hoch. Für die nachfolgenden enzymkinetischen Untersuchungen wurde maximal 35 Tage alte Kinase eingesetzt, um den Einfluss der Lagerung auf die Messergebnisse möglichst zu minimieren.

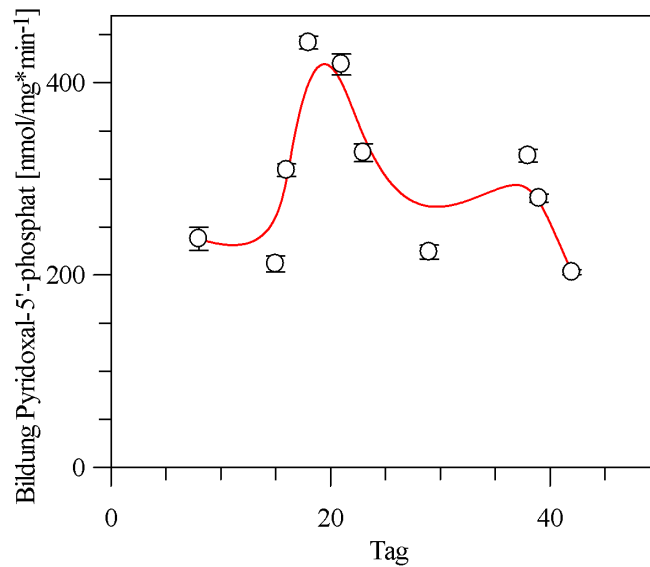


Abbildung 3.32 Untersuchung der Stabilität der gereinigten Pyridoxal-Kinase

3.3.2.2.3 Bestimmung des pH-Optimums der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Das pH-Optimum der gereinigten Pyridoxal-Kinase wurde für den pH-Bereich von 5,0 bis 8,0 bestimmt.

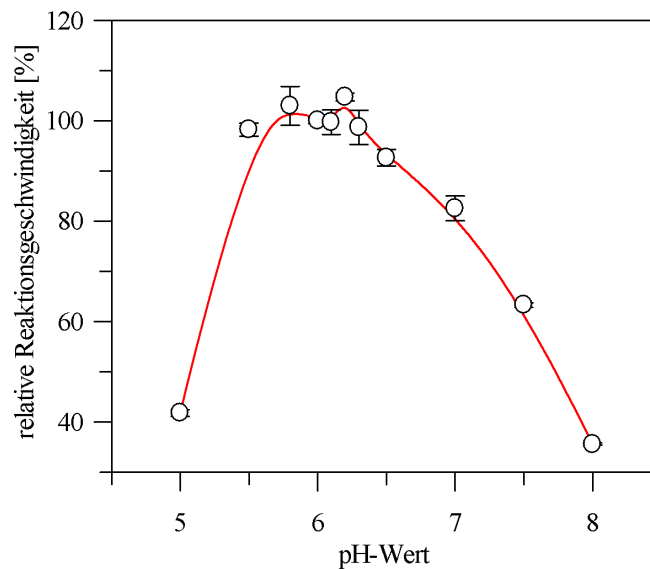


Abbildung 3.33 Bestimmung des pH-Optimums der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Als Puffer wurde 0,1 M Kaliumphosphatpuffer verwendet. Für die Messungen wurden jeweils 2,5 µg Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 0,05 mM. Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat aus Pyridoxal wurde über 10 Minuten photometrisch bei 388 nm verfolgt. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei pH-Wert 6,0 wurde als 100 % definiert. Die bei den weiteren pH-Werten ermittelten Reaktionsgeschwindig-

keiten wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 3.33 dargestellt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die gereinigte Pyridoxal-Kinase ein Reaktionsoptimum im Bereich pH-Wert 5,8-6,3 hat. Das pH-Optimum liegt also unterhalb des Blut-pH (pH-Wert 7,41). Alle weiteren Messungen wurden bei pH-Wert 6,2 durchgeführt, da bei diesem pH-Wert die höchste Aktivität gemessen wurde.

3.3.2.2.4 Bestimmung des Temperatur-Optimums der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Die Reaktionsgeschwindigkeit bei enzymkatalysierten Reaktionen steigt mit der Temperatur um den Faktor 2–3 pro 10 °C (Bisswanger, 2000). Der Anstieg verzögert sich jedoch bei höheren Temperaturen und durchläuft ein Maximum, oberhalb dessen die Reaktionsgeschwindigkeit wieder sinkt. Es kommt zu einer Inaktivierung des Enzyms aufgrund der Thermoinstabilität von Proteinen. Um eine gute Wärmeübertragung bei geringen Temperaturschwankungen und eine exakte Einstellung der Temperatur zu gewährleisten, erfolgten die Inkubationen im Thermoblock, wie bei den Messungen im Proteinrohextrakt (Kapitel 3.3.2.1.6). Vor Substratzugabe wurden die Inkubationsansätze für 3 Minuten bei der Untersuchungstemperatur temperiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Pyridoxal und die Proben inkubierten 5 Minuten im Thermoblock.

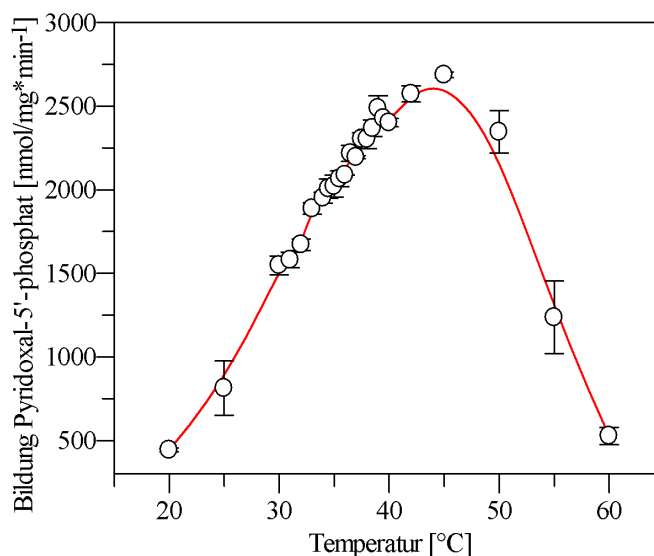


Abbildung 3.34 Bestimmung des Temperatur-Optimums der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Nach Ablauf der 5 Minuten wurde sofort die Absorption gemessen. Für die Inkubationen wurden 2,5 µg Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 0,05 mM. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt zunächst an, durchläuft ein Maximum bei 45 °C und fällt anschließend steil ab. Abbildung 3.34 zeigt, dass die Pyridoxal-Kinase auch bei höheren Temperaturen als 37 °C aktiv ist. Um physiologische Bedingungen für die

Untersuchung der Wirkung von Ginkgotoxin auf die menschliche Pyridoxal-Kinase zu schaffen, wurden alle weiteren Messungen bei 37 °C durchgeführt.

3.3.2.2.5 Untersuchung des Einflusses verschiedener zweiwertiger Kationen auf die Enzymaktivität der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Für die Pyridoxal-Kinasen unterschiedlicher Spezies wurde eine Steigerung der Enzymaktivität durch den Zusatz von verschiedenen zweiwertigen Kationen beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Zink-, Cobalt-, Mangan-, Magnesium- und Calciumchlorid auf die menschliche rekombinante Pyridoxal-Kinase untersucht. Die Metallchloride wurden den Inkubationsansätzen in einer Konzentration von 0,1 mM zugesetzt. Wie Abbildung 3.35 zeigt, ist die Enzymaktivität stark von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen abhängig.

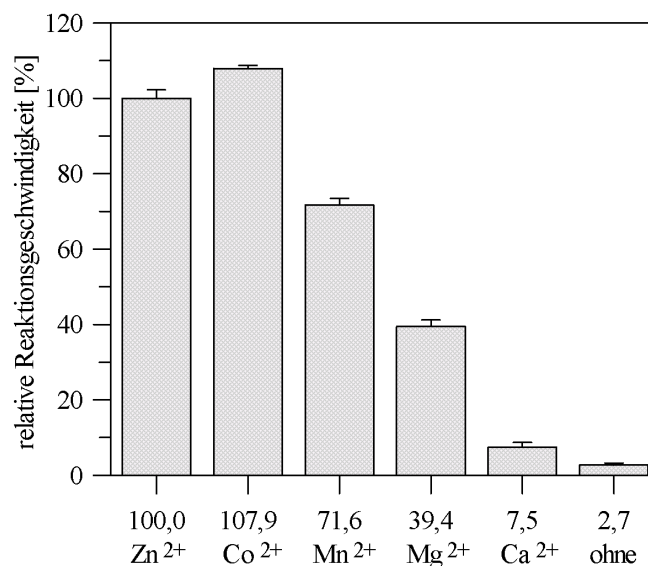


Abbildung 3.35 Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase

In Abwesenheit von zweiwertigen Kationen sinkt die relative Reaktionsgeschwindigkeit der Pyridoxal-Kinase auf 2,7 % im Vergleich zur Reaktionsgeschwindigkeit in Anwesenheit von Zinkchlorid (100 %) ab. Die geringste Steigerung der Aktivität der Pyridoxal-Kinase erbrachte der Zusatz von Calciumchlorid und die größte Steigerung bewirkten Cobaltchlorid und Zinkchlorid. Da Cobalt im menschlichen Körper nur in Spuren vorhanden ist (~ 0,005 g, Pschyrembel, 1994), wird dessen Einfluss auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase vermutlich nur gering sein. Daher wurde für die weiteren Versuche Zinkchlorid in einer Konzentration von 0,1 mM eingesetzt, um möglichst physiologische Untersuchungsbedingungen zu erhalten. Dieses kommt im menschlichen Körper in wesentlich höheren Konzentrationen vor (1,4 -2,3 g im Körper, Pschyrembel,

1994) und kann daher stärker mit der Pyridoxal-Kinase interagieren. Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen der Pyridoxal-Kinase wurden ebenfalls in Anwesenheit von Zinkchlorid durchgeführt.

3.3.2.2.6 Photometrische Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Für die Bestimmung des K_m -Wertes der gereinigten Pyridoxal-Kinase wurden 10 μg Gesamtprotein berechnet als BSA eingesetzt. Die Absorptionsänderung bei 388 nm wurde über 10 Minuten beobachtet. Die Pyridoxal-Konzentration variierte bei den Messungen zwischen 0,005 mM und 5,0 mM. Die Absorptionsänderung pro Zeiteinheit wurde in Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung pro Zeit umgerechnet. Die entsprechende Michaelis-Menten-Kurve ist in Abbildung 3.36, das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.37 dargestellt.

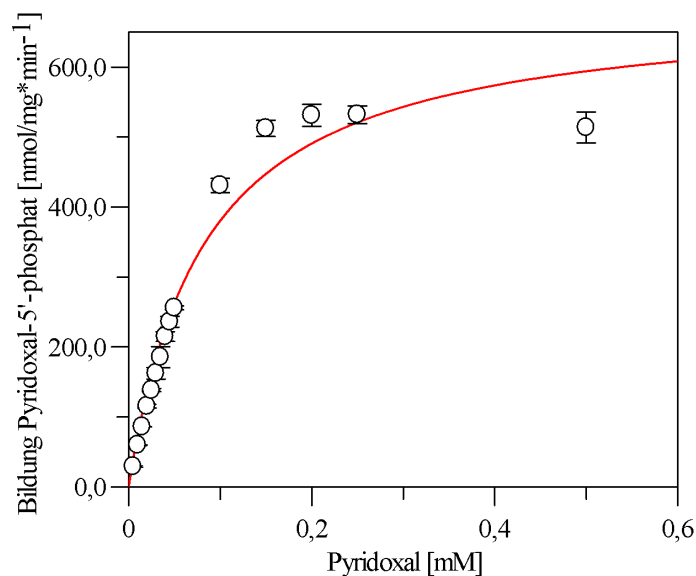


Abbildung 3.36 Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Dargestellt sind hier nur die Reaktionsgeschwindigkeiten bis zu einer Substratkonzentrationen von 0,5 mM, da es bei höheren Substratkonzentrationen zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit kommt. Die Pyridoxal-Kinase wird also durch das Substrat gehemmt. Die Substrathemmung ist in Kapitel 3.4.10 näher beschrieben.

Für die gereinigte Pyridoxal-Kinase wurde für Pyridoxal photometrisch ein K_m -Wert von $7,01 \pm 1,01 \times 10^{-5}$ M ermittelt. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der photometrisch bestimmte K_m -Werte für den Proteinrohextrakt der nativ überexprimierten Pyridoxal-Kinase (Kapitel 3.3.2.1.7). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug

$6,42 \pm 0,51 \times 10^{-7} \text{ mol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$ und war damit um den Faktor 10 höher als für den Proteinrohextrakt (Kapitel 3.3.2.1.7), bedingt durch die Enzymreinigung.

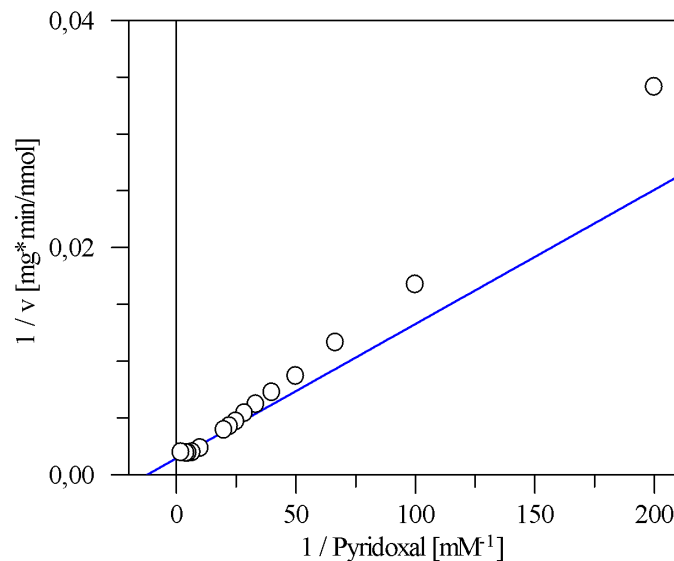


Abbildung 3.37 Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase

3.3.2.2.7 Bestimmung des K_m -Wertes der gereinigten Pyridoxal-Kinase mittels HPLC

Photometrisch kann nur die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat aus Pyridoxal verfolgt werden. Die Bestimmung der K_m -Werte und die Untersuchung des Einflusses aller anderen Substrate erfolgte mittels HPLC. Zur besseren Vergleichbarkeit der Messergebnisse wurde der bereits photometrisch bestimmte K_m -Wert der gereinigten Pyridoxal-Kinase für Pyridoxal (Kapitel 3.3.2.2.6) zusätzlich mittels HPLC bestimmt. Die Pyridoxal-Konzentration variierte bei den Messungen zwischen 0,01 mM und 0,4 mM. Für die K_m -Bestimmung wurden 2,5 μg Pyridoxal-Kinase für 6 Minuten beziehungsweise 5 μg für 3 Minuten mit Pyridoxal inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 50 μl der Inkubationsansätze mittels HPLC aufgetrennt. Aus den Peakflächen von Pyridoxal-5'-phosphat wurde die Reaktionsgeschwindigkeit (Bildung PLP in $\text{nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$) ermittelt und gegen die Pyridoxal-Konzentrationen aufgetragen. Die entsprechende Michaelis-Menten-Kurve ist in Abbildung 3.38, das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.39 dargestellt.

Für die gereinigte Pyridoxal-Kinase wurde für Pyridoxal ein K_m -Wert von $5,87 \pm 0,28 \times 10^{-5} \text{ M}$ mittels HPLC ermittelt. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der photometrisch bestimmte K_m -Wert für die gereinigte Pyridoxal-Kinase. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $1,70 \pm 0,36 \times 10^{-6} \text{ mol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$.

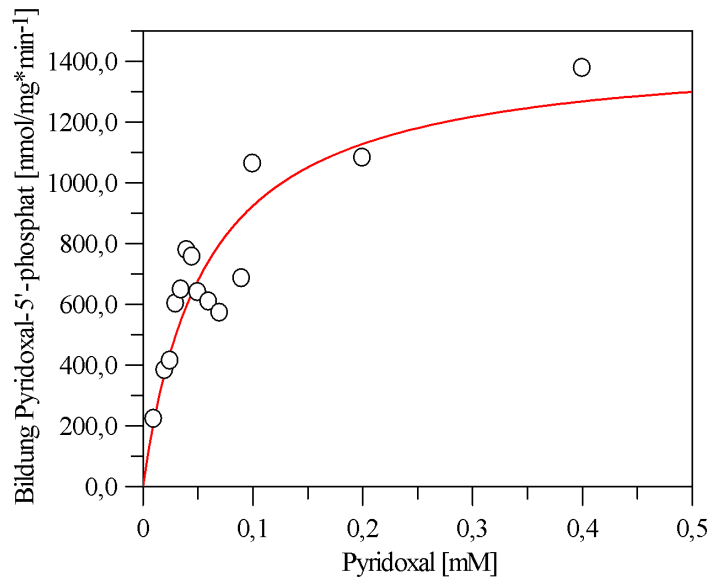


Abbildung 3.38 Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal der gereinigten Pyridoxal-Kinase mittels HPLC

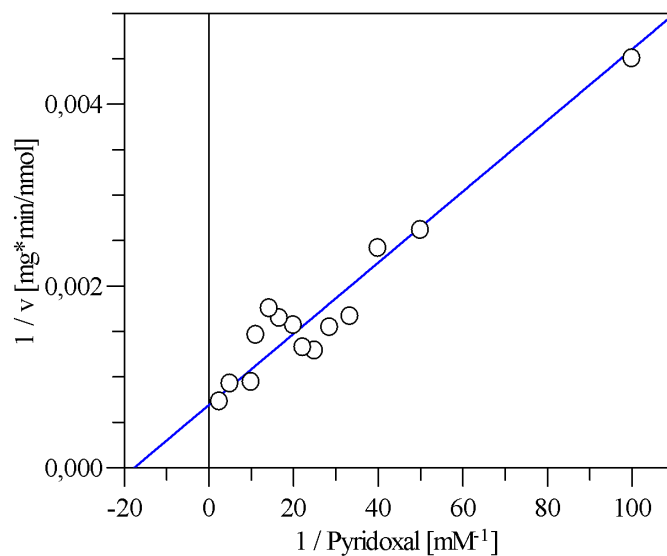


Abbildung 3.39 Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal der gereinigten Pyridoxal-Kinase mittels HPLC

3.3.2.2.8 Photometrische Bestimmung des K_m -Wertes für ATP mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Der K_m -Wert der gereinigten Pyridoxal-Kinase für das Cosubstrat ATP wurde ebenfalls bestimmt. Die Bestimmung erfolgte photometrisch. Es wurden 10 μg Pyridoxal-Kinase eingesetzt und die Pyridoxal-Konzentration betrug 0,05 mM. Die ATP-Konzentration variierte bei den Messungen zwischen 0,01 mM und 0,4 mM. Die Absorptionsänderung bei 388 nm wurde über 10 Minuten beobachtet. Die Absorptionsänderung pro Zeiteinheit wurde in Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung pro Zeit umgerechnet. Die entsprechende

Michaelis-Menten-Kurve ist in Abbildung 3.40, das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.41 dargestellt.

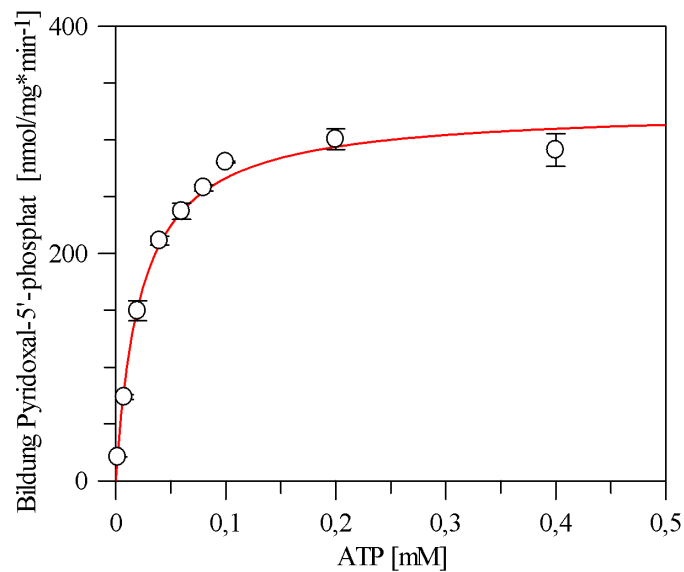


Abbildung 3.40 Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für ATP der gereinigten Pyridoxal-Kinase

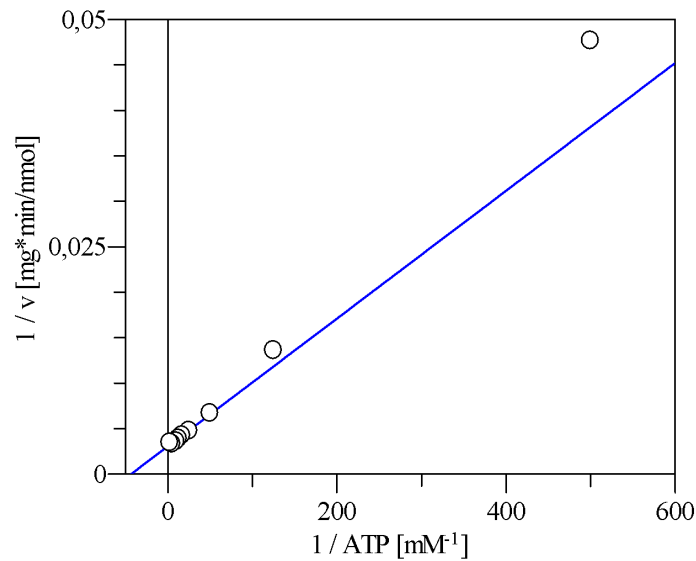


Abbildung 3.41 Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für ATP der gereinigten Pyridoxal-Kinase

Der ermittelte K_m -Wert beträgt $2,30 \pm 0,25 \times 10^{-5}$ M. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $3,28 \pm 0,09 \times 10^{-7}$ mol/mg*min⁻¹. ATP wurde in allen Versuchen in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt.

3.3.2.2.9 Vergleich der Cosubstrateigenschaften von GTP und ATP

Es wurde untersucht, ob GTP neben ATP als Cosubstrat von der Pyridoxal-Kinase als

Donor der Phosphatgruppe akzeptiert wird. Für die Inkubationen wurden 10 µg gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt und die ATP beziehungsweise GTP-Konzentration betrug 1 mM. Die Absorptionsänderung wurde bei 388 nm über 10 Minuten verfolgt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 0,05 mM. Abbildung 3.42 zeigt das Ergebnis des Versuches.

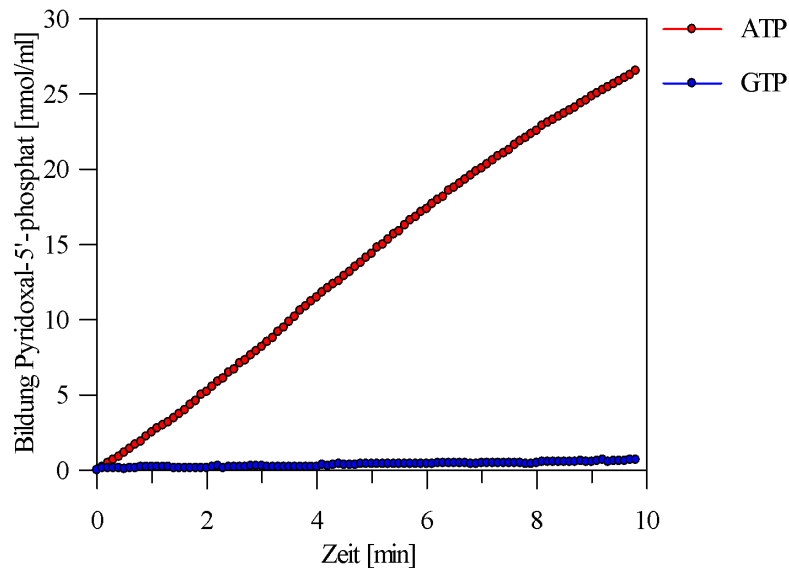


Abbildung 3.42 Darstellung der unterschiedlichen Cosubstrateigenschaften von ATP (rote Kurve) und GTP (blaue Kurve)

In Anwesenheit von ATP kommt es zu einer deutlichen Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung, während es in Anwesenheit von GTP nur zu einer sehr geringen Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung kommt ($5,47 \pm 4,97 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$). ATP und GTP lassen sich also nicht gegeneinander austauschen. Unter den hier herrschenden Reaktionsbedingungen wird Pyridoxal-5'-phosphat in Anwesenheit von ATP mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von $282 \pm 2,37 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$ gebildet.

3.3.2.2.10 Untersuchung der Rückreaktion von Pyridoxal-5'-phosphat zu Pyridoxal

Die Bildung von Pyridoxal aus Pyridoxal-5'-phosphat (Rückreaktion) durch die Pyridoxal-Kinase wurde untersucht. Für diesen Versuch wurden 10 µg Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Als Substrat diente Pyridoxal-5'-phosphat in einer Konzentration von 0,05 mM. Als Cosubstrat wurden ADP beziehungsweise ATP in einer Konzentration von 1,0 mM den Inkubationsansätzen zugesetzt. Die Absorptionsänderung bei 388 nm wurde über 10 Minuten beobachtet. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 3.43 graphisch dargestellt. Die blaue Kurve zeigt die Abnahme des Pyridoxal-5'-phosphates in Anwesenheit von ATP, und die rote Kurve stellt die Rückreaktion in Anwesenheit von ADP dar. Der

Absorptionswert zu Beginn der Reaktion wurde als 100 % definiert. Die weiteren Absorptionswerte wurden entsprechend umgerechnet.

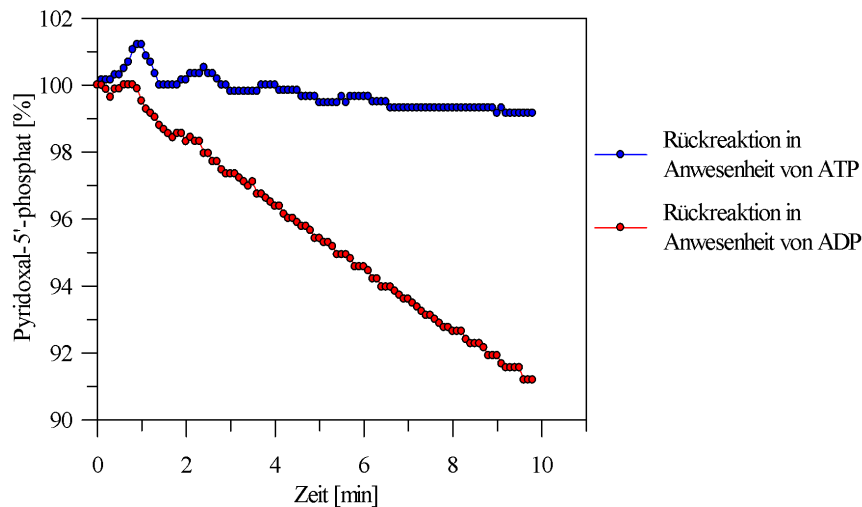


Abbildung 3.43 Untersuchung der Rückreaktion in Anwesenheit von ATP (blaue Kurve) und in Anwesenheit ADP (rote Kurve)

Abbildung 3.43 zeigt, dass in Anwesenheit von ATP die Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration nahezu konstant bleibt. In Gegenwart von ADP nimmt die Konzentration an Pyridoxal-5'-phosphat linear ab und sinkt nach 10 Minuten auf 91 %. In Anwesenheit von ADP betrug die Abnahme von Pyridoxal-5'-phosphat $52,8 \pm 1,72 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$. In Anwesenheit von ATP nimmt die Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration mit einer Geschwindigkeit von $8,96 \pm 1,16 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$ ab. Die Abnahme der Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration in Anwesenheit von ADP läuft also wesentlich langsamer ab als die Hinreaktion (Kapitel 3.3.2.2.1).

Die Abnahme der Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration kann auf der Rückreaktion oder einer hydrolytischen Spaltung von Pyridoxal-5'-phosphat beruhen. Ist im Reaktionsansatz ATP anwesend, kann das gebildete Pyridoxal durch ATP wieder zu Pyridoxal-5'-phosphat umgewandelt werden, so dass sich ein Gleichgewicht einstellt und die Konzentration an Pyridoxal-5'-phosphat konstant bleibt. Ist nur ADP vorhanden, kann gebildetes Pyridoxal nicht rephosphoryliert werden, da ATP als Donor für die Phosphatgruppe fehlt. Sowohl im Falle einer hydrolytischen Spaltung als auch bei einer echten Rückreaktion nimmt die Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration in Anwesenheit von ADP ab. Um zwischen einer hydrolytischen Spaltung von Pyridoxal-5'-phosphat und der Rückreaktion unterscheiden zu können, müssten weitere Inkubationen ohne ATP und ohne ADP durchgeführt werden. Gleichzeitig müssten die Änderungen der ADP- und ATP-Konzentration untersucht werden.

3.4 Einfluss verschiedener Vitamin B₆-Analoga auf die Aktivität der menschlichen Pyridoxal-Kinase

3.4.1 *EINFLUSS VON GINGGOTOXIN AUF DIE AKTIVITÄT DER PYRIDOXAL-KINASE*

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Ginkgotoxin auf die menschliche Pyridoxal-Kinase. Diese Versuche sollten zur Aufklärung des Mechanismus der durch Ginkgotoxin und Ginkgosamen ausgelösten Krampfanfälle beitragen.

Um den Einfluss von Ginkgotoxin (Abbildung 1.1) auf die Pyridoxal-Kinase und die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung zu untersuchen, wurden Enzyminkubationen durchgeführt. Hierbei wurde die Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin und Pyridoxal versetzt.

Der erste Versuch fand bei konstanter Pyridoxal-Konzentration und steigenden Ginkgotoxin-Konzentrationen statt und zeigte, wie Ginkgotoxin die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat hemmt (Kapitel 3.4.1.1). Im zweiten Versuch variierte die Pyridoxal-Konzentration und die Ginkgotoxin-Konzentration blieb konstant. Mit diesem Versuch sollte geklärt werden, ob sich die Wirkung von Ginkgotoxin durch steigende Pyridoxal-Konzentrationen aufheben lässt.

In beiden Fällen wurden die Inkubationsansätze vor Zugabe von Pyridoxal und Ginkgotoxin wie in Kapitel 2.6.1.4 beschrieben 3 Minuten bei 37 °C temperiert. Anschließend wurden Ginkgotoxin und Pyridoxal zugegeben und die Ansätze gemischt. Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat wurde photometrisch durch Messen der Absorption bei 388 nm kontinuierlich verfolgt.

3.4.1.1 *Einfluss steigender Ginkgotoxin-Konzentrationen bei konstanter Pyridoxal-Konzentration auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung*

3.4.1.1.1 Einfluss von Ginkgotoxin auf die Aktivität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt

Abbildung 3.44 zeigt den Einfluss steigender Ginkgotoxin-Konzentrationen auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung pro Zeiteinheit. Die Pyridoxal-Konzentration betrug bei allen Versuchen 0,05 mM. Ginkgotoxin wurde in Konzentrationen von 0,025–0,25 mM eingesetzt. Für die Inkubationen wurden 100 µg Proteinrohextrakt der nativ im Stamm BL21(DE3)(pET-11a-PKH) exprimierten Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Die graue Kurve

(links) zeigt den Reaktionsverlauf in Abwesenheit von Ginkgotoxin. Es ist erkennbar, dass die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung nach Zugabe von Pyridoxal beginnt. In Anwesenheit von Ginkgotoxin erfolgt in der ersten Reaktionsphase (lag-Phase) nur eine sehr geringe Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung (alle weiteren Kurven).

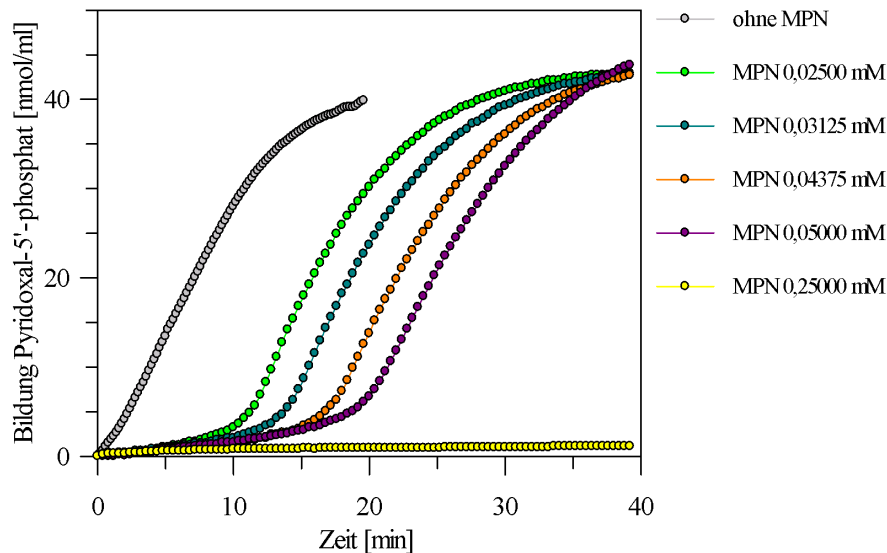


Abbildung 3.44 Einfluss von Ginkgotoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal im Proteinrohextrakt des Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH). Die Pyridoxal-Konzentration betrug bei allen Messungen 0,05 mM.

In der zweiten Reaktionsphase erfolgt auch in Gegenwart von Ginkgotoxin eine deutliche Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat. Je höher die Ginkgotoxin-Konzentration, desto länger ist die lag-Phase. Nach der anfänglichen lag-Phase erfolgt die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung in der zweiten Reaktionsphase mit der gleichen Reaktionsgeschwindigkeit wie in Abwesenheit von Ginkgotoxin (linear ansteigender Kurventeil). In Anwesenheit von Ginkgotoxin sind die Kurven parallel nach rechts verschoben (zweite Reaktionsphase). Die Kurven sind umso weiter nach rechts verschoben, je höher die Ginkgotoxin-Konzentration ist. Wird die Ginkgotoxin-Konzentration wesentlich erhöht, erfolgt im Beobachtungszeitraum keine Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung (gelbe Kurve). Die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung lässt sich durch eine ausreichend hohe Ginkgotoxin-Konzentration unterdrücken.

3.4.1.1.2 Einfluss von Ginkgotoxin auf die Aktivität der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase

In Abbildung 3.45 ist das Ergebnis der Enzyminkubationen der gereinigten Pyridoxal-Kinase mit steigenden Konzentrationen von Ginkgotoxin dargestellt. Für die Inkubationsansätze wurden 2,5 µg gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzen-

tration betrug bei allen Versuchen 0,05 mM.

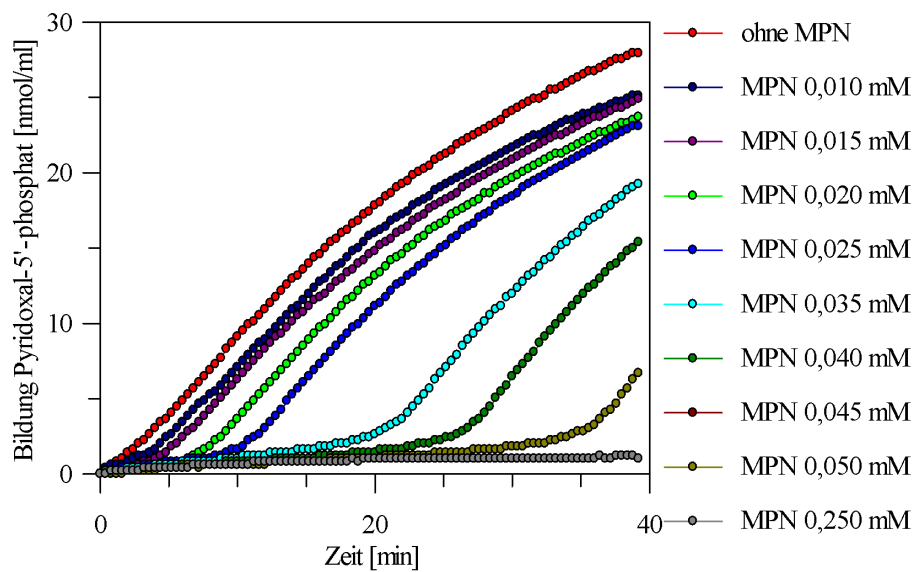


Abbildung 3.45 Einfluss von Ginkgotoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal durch die gereinigte Pyridoxal-Kinase des Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH). Die Pyridoxal-Konzentration betrug bei allen Messungen 0,05 mM.

Ginkgotoxin wurde in Konzentrationen von 0,01–0,25 mM eingesetzt. Die linke Kurve (rot) zeigt den Reaktionsverlauf in Abwesenheit von Ginkgotoxin. Die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung beginnt sofort nach Substratzugabe und erfolgt linear. In Anwesenheit von Ginkgotoxin hat die Kurve der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung wieder einen zweiphasigen Verlauf. Zunächst kommt es wieder zur Ausbildung der lag-Phase, wie bereits für den Proteinrohextrakt gezeigt (Kapitel 3.4.1.1.1) und anschließend zur linearen Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat.

Die lag-Phase ist wiederum umso länger, je höher die Ginkgotoxin-Konzentration ist. Mit steigenden Ginkgotoxin-Konzentrationen sind die Kurven nach rechts verschoben. Die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung wird durch Ginkgotoxin verzögert. Nach Ablauf der lag-Phase erfolgt die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung mit der gleichen Reaktionsgeschwindigkeit, wie in Abwesenheit von Ginkgotoxin, erkennbar an der parallelen Rechtsverschiebung der Kurven. Ist die Ginkgotoxin-Konzentration ausreichend hoch, lässt sich die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung nahezu ganz unterdrücken (graue Kurve). Die gezeigten Ergebnisse mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase (Abbildung 3.45) stimmen mit den Ergebnissen im Proteinrohextrakt (Abbildung 3.44) überein.

Die beobachtete Verzögerung der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung führte zu der Hypothese, dass Ginkgotoxin aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu den Vitameren der B₆-Gruppe ebenfalls als Substrat von der Pyridoxal-Kinase akzeptiert wird und eine höhere Affinität zur Pyridoxal-Kinase hat. Durch eine höhere Affinität der Pyridoxal-Kinase zu

Ginkgotoxin würde Pyridoxal in Anwesenheit von Ginkgotoxin vom aktiven Zentrum der Pyridoxal-Kinase verdrängt werden. Ginkgotoxin würde dann zuerst durch die Pyridoxal-Kinase umgesetzt werden (lag-Phase der Kurve) und so die Umsetzung des eigentlichen Substrates, Pyridoxal inhibieren. Das entspräche der Eigenschaft eines "silent substrate" (Case et al., 2003). Erst wenn Ginkgotoxin nahezu vollständig umgesetzt wurde, kann das natürliche Substrat Pyridoxal zu Pyridoxal-5'-phosphat umgesetzt werden (linearer Anstieg der Kurven). Die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung erfolgt dann mit der gleichen Reaktionsgeschwindigkeit wie in Abwesenheit von Ginkgotoxin.

Diese Hypothese, dass Ginkgotoxin als Substrat von der Pyridoxal-Kinase umgesetzt wird, wurde mittels Dünnschichtchromatographie (3.4.6.1) und HPLC (Bestimmung des K_m -Wertes für Ginkgotoxin Kapitel 3.4.7.4 und durch Coinkubation der Pyridoxal-Kinase mit Pyridoxal und Ginkgotoxin 3.4.9) untersucht.

3.4.1.2 Einfluss steigender Pyridoxal-Konzentrationen auf die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Ginkgotoxin

3.4.1.2.1 Untersuchung mit der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase

Mit diesem Versuch sollte überprüft werden, ob sich die Wirkung von Ginkgotoxin auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase mit steigenden Pyridoxal-Konzentrationen aufheben lässt. Die Ginkgotoxin-Konzentration betrug bei allen Messungen 0,2 mM. Pyridoxal wurde in Konzentrationen von 0,1 mM bis 1,0 mM eingesetzt. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 3.46 graphisch dargestellt. Der rote Graph zeigt die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat bei der niedrigsten Pyridoxal-Konzentration in Anwesenheit von Ginkgotoxin.

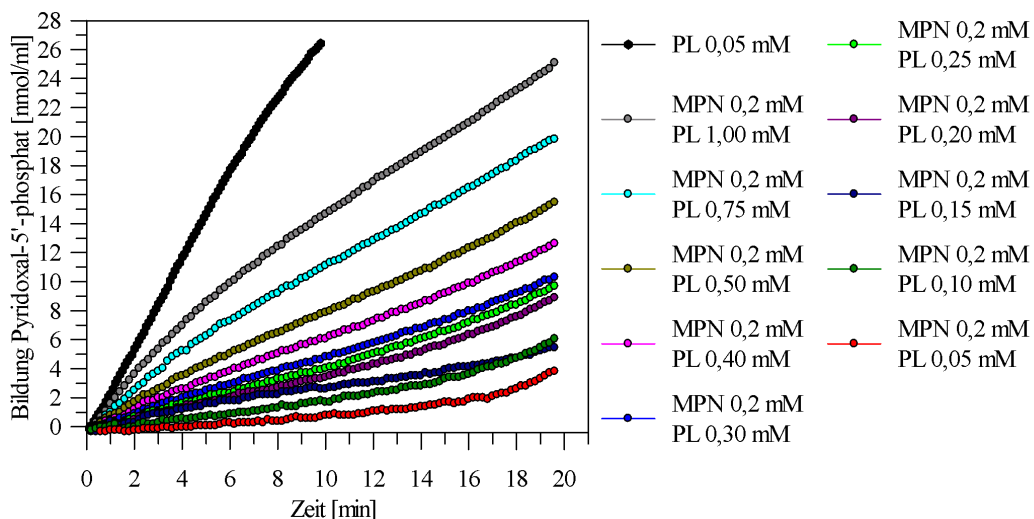


Abbildung 3.46 Aufhebung des Einflusses von Ginkgotoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch Pyridoxal. Ginkgotoxin wurde in einer Konzentration von 0,2 mM zugesetzt.

Wird die Pyridoxal-Konzentration erhöht, steigt die Geschwindigkeit, mit der Pyridoxal-5'-phosphat gebildet wird, an. Der Kurvenverlauf wird steiler. Pyridoxal verdrängt also Ginkgotoxin von der Pyridoxal-Kinase. Der Versuch zeigt, dass die Wirkung von Ginkgotoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung mit Pyridoxal aufgehoben werden kann.

3.4.2 *EINFLUSS VON PYRIDOXIN AUF DIE AKTIVITÄT DER PYRIDOXAL-KINASE*

Pyridoxin ist ein Vitamer der B₆-Gruppe (Abbildung 1.1). Mit diesem Versuch sollte getestet werden, ob die Aktivität der Pyridoxal-Kinase durch Pyridoxin beeinflusst wird.

3.4.2.1 *Einfluss steigender Pyridoxin-Konzentrationen bei konstanter Pyridoxal-Konzentration auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung*

3.4.2.1.1 Einfluss von Pyridoxin auf die Aktivität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt

In Abbildung 3.47 ist der Einfluss steigender Pyridoxin-Konzentrationen auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung dargestellt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug bei allen Versuchen 0,05 mM. Pyridoxin wurde in Konzentrationen von 0,05 mM bis 5,00 mM eingesetzt. Für die Inkubationen wurden 100 µg Proteinrohextrakt verwendet. Die Absorptionsänderung bei 388 nm wurde 20 Minuten verfolgt. Die graue Kurve (links) zeigt den Reaktionsverlauf in Abwesenheit von Pyridoxin.

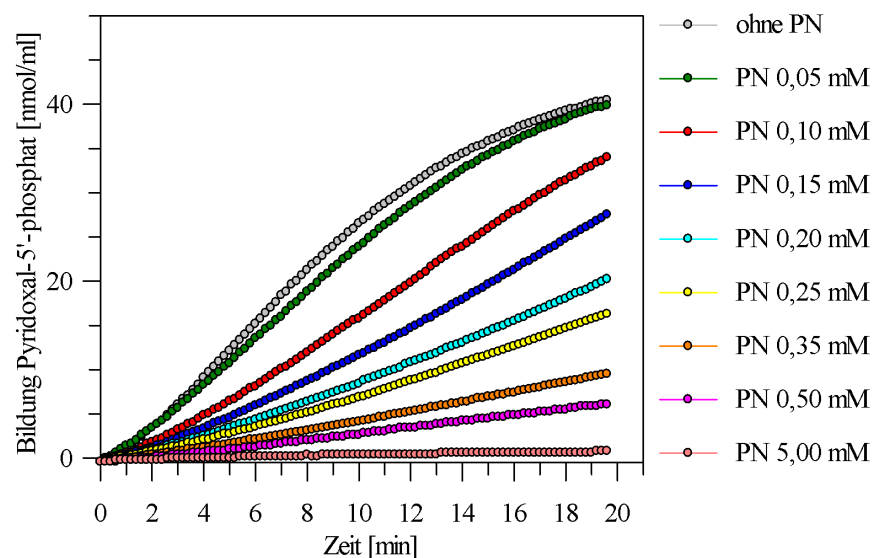


Abbildung 3.47 Einfluss von Pyridoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal im Proteinrohextrakt des Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH). Die Pyridoxal-Konzentration betrug bei allen Messungen 0,05 mM.

Es ist erkennbar, dass die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung mit konstanter Geschwindigkeit beginnt, sobald Pyridoxal zugegeben wird. Wird neben dem Pyridoxal den Inkubationsansätzen Pyridoxin zugesetzt, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigenden Pyridoxin-Konzentrationen ab. In Anwesenheit von Pyridoxin folgt die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat einer anderen Reaktionskinetik als in Anwesenheit von Ginkgotoxin. In Gegenwart von Ginkgotoxin haben die Kurven einen zweiphasigen Verlauf. In Anwesenheit von Pyridoxin ist die Reaktionsgeschwindigkeit konstant.

3.4.2.2 Einfluss steigender Pyridoxal-Konzentrationen auf die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Pyridoxin

3.4.2.2.1 Untersuchung im Rohextrakt der nativ exprimierten Pyridoxal-Kinase

Der Test erfolgte bei einer konstanten Pyridoxin-Konzentration von 0,5 mM. Die Pyridoxal-Konzentration wurde von 0,05 mM (blaue Kurve) bis 2,00 mM (olivfarbene Kurve) erhöht. Der Versuch sollte klären, ob sich die Wirkung von Pyridoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung durch den Zusatz von steigenden Pyridoxal-Konzentrationen aufheben lässt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 3.48 graphisch dargestellt. Wird die Pyridoxal-Konzentration erhöht, steigt die Geschwindigkeit mit der Pyridoxal-5'-phosphat gebildet wird an. Der Kurvenverlauf wird steiler. Die Wirkung von Pyridoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung lässt sich durch steigende Pyridoxal-Konzentrationen im Inkubationsansatz aufheben. Pyridoxal verdrängt also Pyridoxin von der Pyridoxal-Kinase.

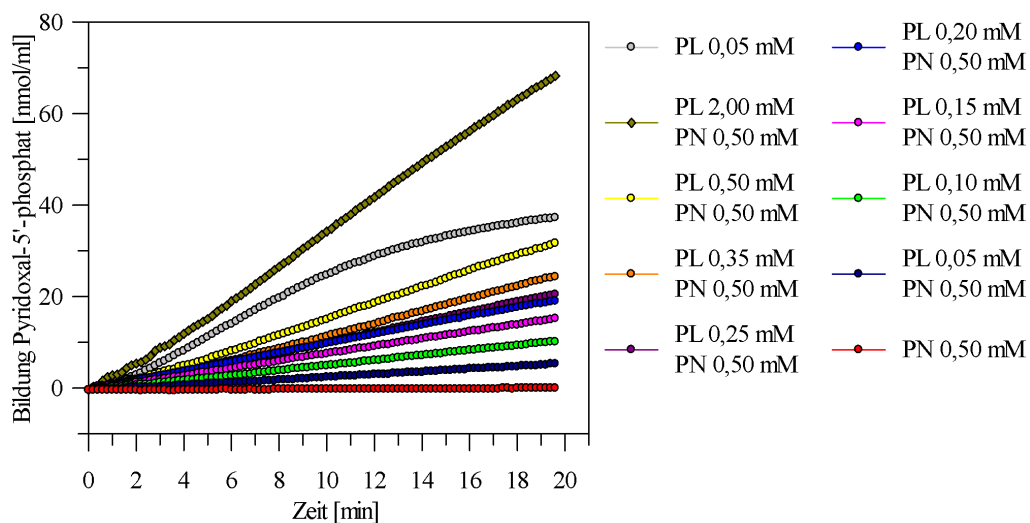


Abbildung 3.48 Aufhebung des Einflusses von Pyridoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat. Pyridoxin wurde in einer Konzentration von 0,2 mM zugesetzt.

3.4.3 *EINFLUSS VON DESOXYPYRIDOXIN AUF DIE AKTIVITÄT DER PYRIDOXAL-KINASE*

Desoxypyridoxin (Abbildung 1.1) ist wie Ginkgotoxin ein Vitamin B₆-Antivitamin. Es sollten eventuell bestehende Unterschiede in der Wirkung von Desoxypyridoxin und Ginkgotoxin auf die Pyridoxal-Kinase untersucht werden.

3.4.3.1 *Einfluss steigender Desoxypyridoxin-Konzentrationen bei konstanter Pyridoxal-Konzentration auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung*

3.4.3.1.1 Einfluss von Desoxypyridoxin auf die Aktivität der nativen Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt

Abbildung 3.49 zeigt den Einfluss steigender Desoxypyridoxin-Konzentrationen auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung im Proteinrohextrakt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug bei allen Messungen 0,05 mM. Desoxypyridoxin wurde in Konzentrationen von 0,005 mM bis 0,5 mM verwendet. Für die Inkubationen wurden 100 µg Pyridoxal-Kinaserohextrakt eingesetzt. Die graue Kurve (links) zeigt den Reaktionsverlauf in Abwesenheit von Desoxypyridoxin.

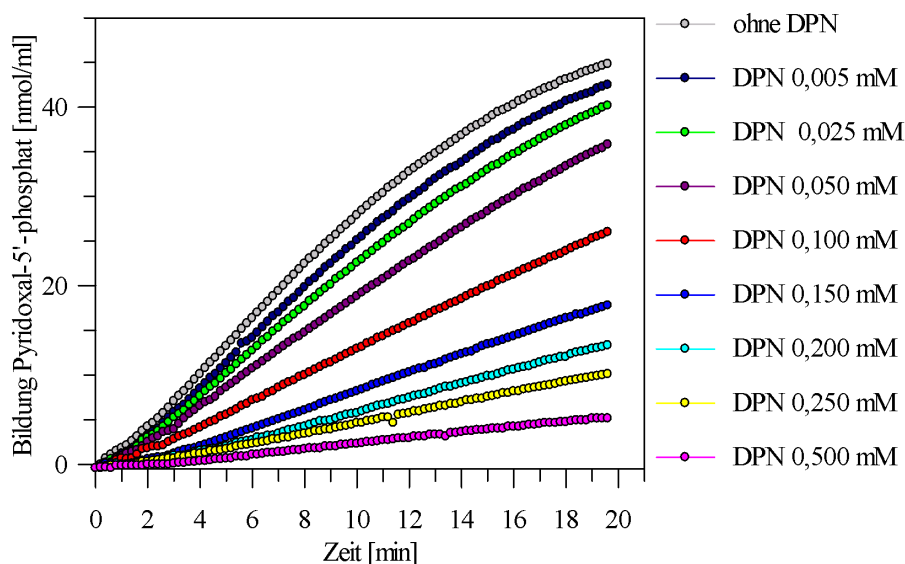


Abbildung 3.49 Einfluss von Desoxypyridoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal im Proteinrohextrakt des Stammes BL21(DE3)(pET-11a-PKH). Die Pyridoxal-Konzentration betrug bei allen Messungen 0,05 mM.

Es ist erkennbar, dass die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung mit konstanter Geschwindigkeit beginnt, sobald Pyridoxal zugegeben wird. In Anwesenheit von Desoxypyridoxin erfolgt die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung langsamer. Je höher die Desoxypyridoxin-Konzen-

tration, desto geringer ist die Geschwindigkeit, mit der Pyridoxal-5'-phosphat gebildet wird. Die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung erfolgt jedoch wie nach Zusatz von Pyridoxin (Kapitel 3.4.2) linear mit konstanter Geschwindigkeit. Im Gegensatz dazu erfolgt in Anwesenheit von Ginkgotoxin die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat nicht linear (Kapitel 3.4.1).

3.4.3.1.2 Einfluss von Desoxypyridoxin auf die Aktivität der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase

In Abbildung 3.50 ist der Einfluss steigender Desoxypyridoxin-Konzentrationen auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch die gereinigte Pyridoxal-Kinase graphisch dargestellt. Für die Inkubationen wurden 10 µg gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt.

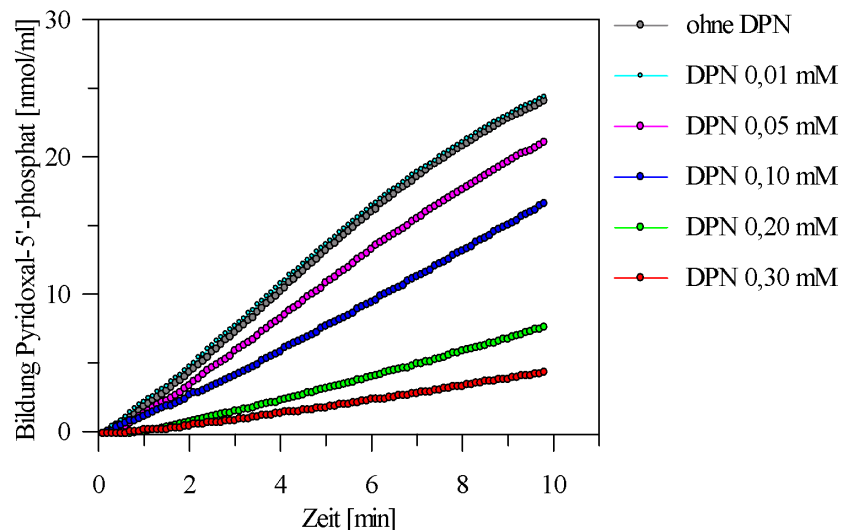


Abbildung 3.50 Einfluss von Desoxypyridoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus Pyridoxal durch die gereinigte Pyridoxal-Kinase. Die Pyridoxal-Konzentration betrug bei den Versuchen 0,05 mM.

Die Pyridoxal-Konzentration betrug bei allen Messungen 0,05 mM und Desoxypyridoxin wurde in Konzentrationen von 0,01 bis 0,3 mM eingesetzt. Die graue Kurve zeigt den Reaktionsverlauf in Abwesenheit von Desoxypyridoxin. Die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung beginnt sofort nach Substratzugabe und die Bildung erfolgt linear. In Anwesenheit von Desoxypyridoxin sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit und die Kurven werden flacher. Je höher die Desoxypyridoxin-Konzentration ist, desto geringer ist die Geschwindigkeit, mit der Pyridoxal-5'-phosphat gebildet wird. Desoxypyridoxin verlangsamt also die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung. Die hier für die gereinigte Pyridoxal-Kinase gezeigte Verlangsamung der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung durch Desoxypyridoxin stimmt mit dem für den Proteinrohextrakt ermittelten Ergebnis (Kapitel 3.4.3.1.1) überein.

3.4.3.2 Einfluss steigender Pyridoxal-Konzentrationen auf die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Desoxyypyridoxin

3.4.3.2.1 Untersuchung mit der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase

Mit diesem Versuch sollte geklärt werden, ob sich die Wirkung von Desoxyypyridoxin auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase mit steigenden Pyridoxal-Konzentrationen aufheben lässt. Bei diesem Versuch betrug die Desoxyypyridoxin-Konzentration bei allen Messungen 0,05 mM. Pyridoxal wurde in Konzentrationen von 0,01 mM bis 0,15 mM eingesetzt. In Abbildung 3.51 ist das Ergebnis dieses Versuches graphisch dargestellt.

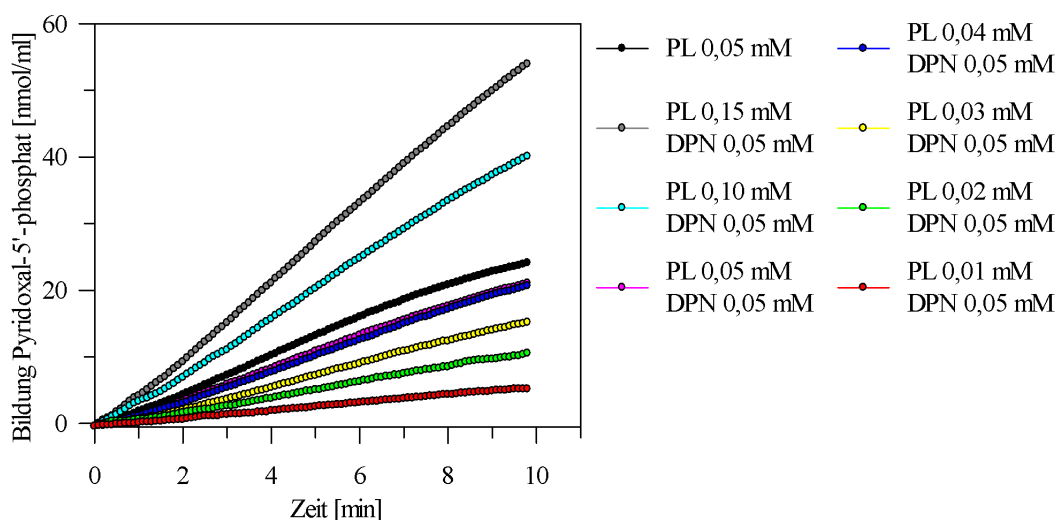


Abbildung 3.51 Aufhebung der Desoxyypyridoxin-Wirkung auf die Pyridoxal-Kinase durch steigende Pyridoxal-Konzentrationen

Der rote Graph stellt das Ergebnis der Enzyminkubation mit der niedrigsten Pyridoxal-Konzentration unter Zusatz von 0,05 mM Desoxyypyridoxin dar. Wird die Pyridoxal-Konzentration erhöht, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit, mit der Pyridoxal-5'-phosphat gebildet wird. Der Kurvenverlauf wird steiler. Pyridoxal verdrängt Desoxyypyridoxin von der Pyridoxal-Kinase. Die Wirkung von Desoxyypyridoxin auf die Pyridoxal-Kinase lässt sich also ebenso wie die Wirkung von Ginkgotoxin (Kapitel 3.4.1.2) mit Pyridoxal aufheben.

3.4.4 GEGENÜBERSTELLUNG DES EINFLUSSES VERSCHIEDENER STRUKTURANALOGA DES PYRIDOXALS AUF DIE PYRIDOXAL-KINASE

Abbildung 3.52 und 3.53 zeigen den unterschiedlichen Einfluss verschiedener Pyridoxal-Strukturanaloga auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung durch die Pyridoxal-Kinase. Die

Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat wurde durch Messen der Absorptionszunahme bei 388 nm verfolgt (Kapitel 2.6.1.4). In Abbildung 3.52 ist der Einfluss von Desoxyypyridoxin, Pyridoxin und Ginkgotoxin auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung durch die Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt und in Abbildung 3.53 durch das gereinigte Enzym dargestellt.

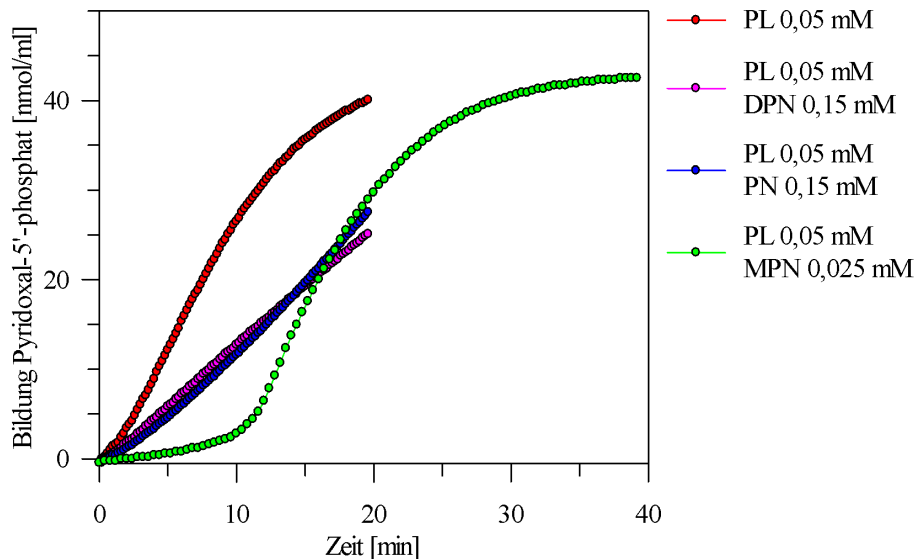


Abbildung 3.52 Einfluss von Desoxyypyridoxin, Pyridoxin und Ginkgotoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch die Pyridoxal-Kinase im Proteinrohextrakt

Der Kurvenverlauf der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung im Proteinrohextrakt ist mit dem Kurvenverlauf der gereinigten Pyridoxal-Kinase vergleichbar.

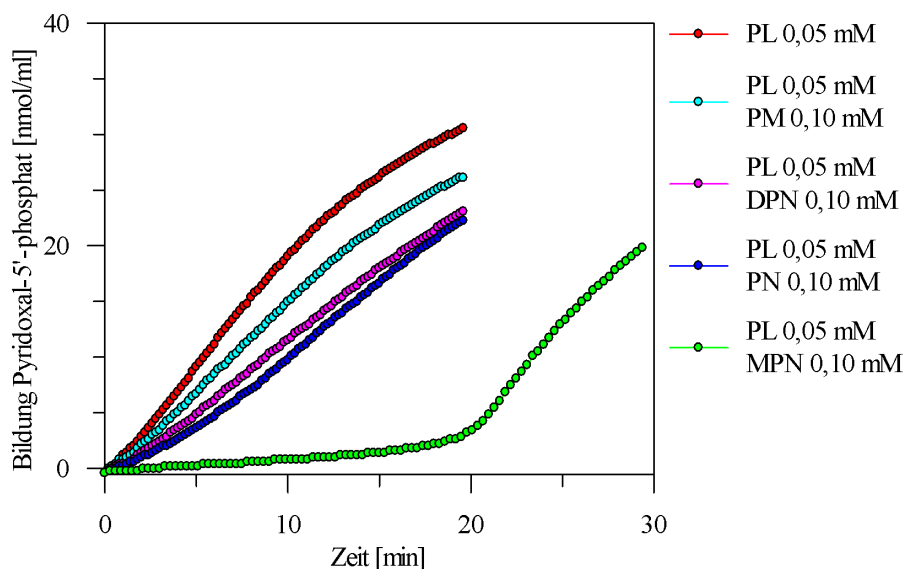


Abbildung 3.53 Einfluss von Desoxyypyridoxin, Pyridoxin, Pyridoxamin und Ginkgotoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch die gereinigte Pyridoxal-Kinase

Diese Gegenüberstellung verdeutlicht, dass sich der Einfluss von Ginkgotoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch die menschliche Pyridoxal-Kinase von dem Einfluss unterscheidet, den Pyridoxin, Pyridoxamin und Desoxypyridoxin auf sie ausüben. Pyridoxamin, Pyridoxin und Desoxypyridoxin haben einen ähnlichen Einfluss auf die Pyridoxal-Kinase. Alle drei Verbindungen senken die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat beginnt sofort nach Zugabe von Pyridoxal und einem der drei genannten Strukturanaloga mit konstanter Geschwindigkeit. Demgegenüber erfolgt die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat in Anwesenheit von Ginkgotoxin nicht linear. Es gibt einen zweiphasigen Reaktionsverlauf. In der ersten Phase (lag-Phase) erfolgt nur eine sehr geringe Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat. In einer zweiten Reaktionsphase verläuft die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat mit der gleichen Geschwindigkeit wie in Abwesenheit von Ginkgotoxin (linearer Teil der Kurve). In Abbildung 3.53 ist der Einfluss von Ginkgotoxin, Pyridoxamin, Pyridoxin und Desoxypyridoxin jeweils in einer Konzentration von 0,1 mM auf die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung durch die gereinigte Pyridoxal-Kinase dargestellt. Pyridoxal wurde in einer Konzentration von 0,05 mM eingesetzt. In Anwesenheit von Ginkgotoxin ist die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat innerhalb der ersten 20 Minuten nahezu unterdrückt, wohingegen in Anwesenheit der anderen Verbindungen eine deutlich Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat erfolgt.

3.4.5 *BESTIMMUNG DER K_i -WERTE*

Zur Charakterisierung der Enzym-Inhibitor Wechselwirkung wurde der K_i -Wert für Pyridoxin und für Desoxypyridoxin bestimmt (Kapitel 2.5.2.2.1). Die Bestimmung der K_i -Werte erfolgte photometrisch (Kapitel 2.6.1.4). Zusätzlich zu Pyridoxal wurden entweder Pyridoxin oder Desoxypyridoxin zu den Inkubationsansätzen gegeben. Nach Zugabe von Substrat und Inhibitor wurde die Messung gestartet. Die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat wurde durch Messen der Absorption bei 388 nm verfolgt. Aus der Absorptionsänderung pro Zeiteinheit wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung berechnet. Die Ergebnisse dieser Messung wurden graphisch dargestellt. Es wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Inhibitorkonzentration und im Hemm-Diagramm nach Dixon die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die K_i -Werte wurden für Pyridoxin und Desoxypyridoxin bestimmt, um die Hemmung der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung durch diese beiden Substanzen miteinander vergleichen zu können.

3.4.5.1 Bestimmung des K_i -Wertes für Pyridoxin

3.4.5.1.1 Bestimmung des K_i -Wertes für Pyridoxin im Proteinrohextrakt

Der K_i -Wert für Pyridoxin wurde im Proteinrohextrakt der nativ im Stamm BL21(DE3)(pET-11a-PKH) überexprimierten Pyridoxal-Kinase bestimmt. Bei den Versuchen wurden 100 μg Pyridoxal-Kinaserohextrakt eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug 50 μM und Pyridoxin wurde in Konzentrationen von 50 μM bis 500 μM eingesetzt. Die Messergebnisse sind in Abbildung 3.54 und 3.55 graphisch dargestellt.

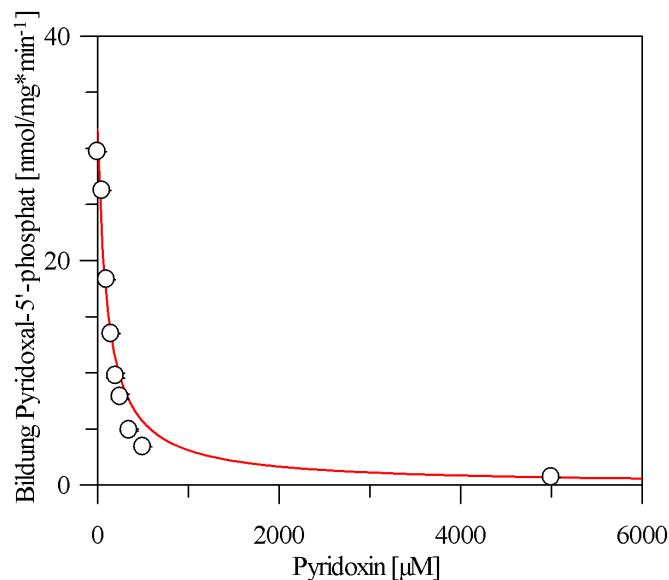


Abbildung 3.54 Bestimmung des K_i -Wertes für Pyridoxin, Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Inhibitorkonzentration

Die Messergebnisse zeigen, dass mit steigender Pyridoxin-Konzentration die Geschwindigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung sinkt (Abbildung 3.54).

Durch Anwendung der in Kapitel 2.5.2.2.1 angegebenen Gleichungen wurden folgende Werte ermittelt:

$$K_{i\text{app}} = 108 \pm 21,4 \mu\text{M}$$

$$v_i = 31,8 \pm 2,40 \text{ nmol/mg}\cdot\text{min}^{-1}$$

Aus dem apparenten K_i -Wert von 108 μM für Pyridoxin, der Substratkonzentration von 50 μM und dem bereits photometrisch bestimmten K_m -Wert für Pyridoxal (70,1 μM , Kapitel 3.3.2.2.6) wurde der K_i -Wert für Pyridoxin berechnet. Der K_i -Wert für Pyridoxin

beträgt $63,0 \mu\text{M}$.

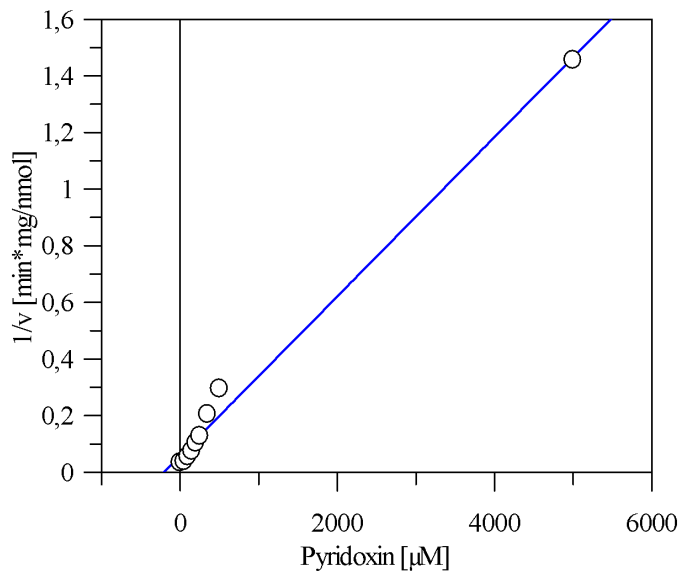


Abbildung 3.55 Bestimmung des K_i -Wertes für Pyridoxin, Hemm-Diagramm nach Dixon

3.4.5.2 Bestimmung des K_i -Wertes für Desoxypyridoxin

Der K_i -Wert für Desoxypyridoxin wurde im Rohextrakt und an der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase bestimmt.

3.4.5.2.1 Bestimmung des K_i -Wertes für Desoxypyridoxin im Proteinrohextrakt

Der K_i -Wert für Desoxypyridoxin wurde im Proteinrohextrakt der nativ im Stamm BL21(DE3)(pET-11a-PKH) überexprimierten Pyridoxal-Kinase bestimmt. Bei den Versuchen wurden $100 \mu\text{g}$ Pyridoxal-Kinaserohextrakt eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration betrug $50 \mu\text{M}$ und Desoxypyridoxin wurde in Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$ eingesetzt. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 3.56 und 3.57 graphisch dargestellt. Die Messergebnisse zeigen, dass mit steigender Desoxypyridoxin-Konzentration die Geschwindigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung sinkt (Abbildung 3.56).

Durch Anwendung der in Kapitel 2.5.2.2.1 angegebenen Gleichungen wurden folgende Werte ermittelt:

$$\begin{aligned}
 K_{i\text{app}} &= 98,0 \pm 22,8 \mu\text{M} \\
 v_i &= 31,8 \pm 0,42 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}
 \end{aligned}$$

Aus dem apparenten K_i -Wert von $98 \mu\text{M}$ für Desoxyypyridoxin, der Substratkonzentration von $50 \mu\text{M}$ und dem bereits photometrisch bestimmten K_m -Wert für Pyridoxal ($70,1 \mu\text{M}$, Kapitel 3.3.2.2.6) wurde der K_i -Wert für Desoxyypyridoxin berechnet. Der K_i -Wert für Desoxyypyridoxin beträgt $57,2 \mu\text{M}$.

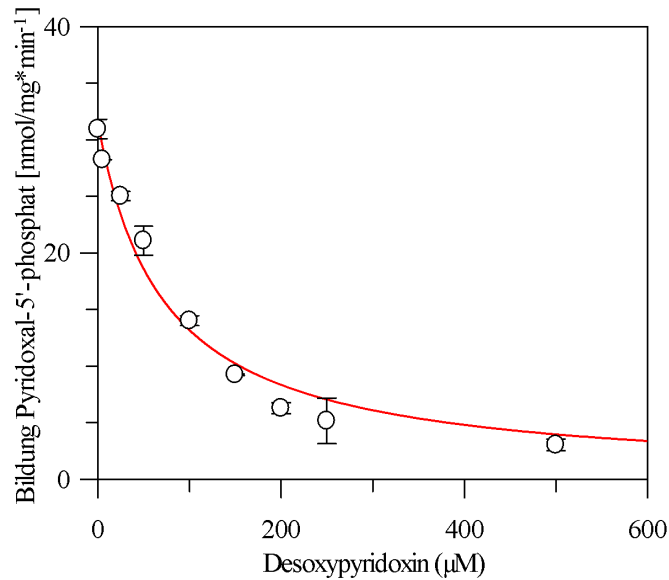


Abbildung 3.56 Bestimmung des K_i -wertes für Desoxyypyridoxin im Proteinrohextrakt, Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Inhibitorkonzentration

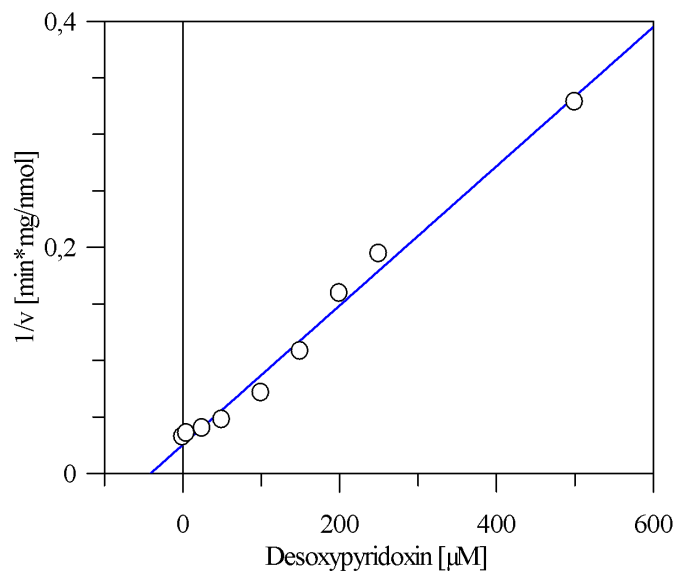


Abbildung 3.57 Bestimmung des K_i -wertes für Desoxyypyridoxin im Proteinrohextrakt, Hemm-Diagramm nach Dixon

Die K_i -Werte für Pyridoxin ($63,0 \mu\text{M}$) und Desoxyypyridoxin ($57,2 \mu\text{M}$) sind ähnlich. Beide Substanzen hemmen die Pyridoxal-Kinase gleich stark.

3.4.5.2.2 Bestimmung des K_i -Wertes für Desoxyipyridoxin an der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase

Der K_i -Wert für Desoxyipyridoxin wurde an der gereinigten nativen Pyridoxal-Kinase bestimmt. Bei den Versuchen wurden $10 \mu\text{g}$ Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Die Pyridoxal-Konzentration wurde von $10 \mu\text{M}$ bis $150 \mu\text{M}$ variiert. Desoxyipyridoxin wurde in Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ bis $300 \mu\text{M}$ eingesetzt. Das Ergebnis der Enzyminkubationen ist in Abbildungen 3.58 und 3.59 graphisch dargestellt.

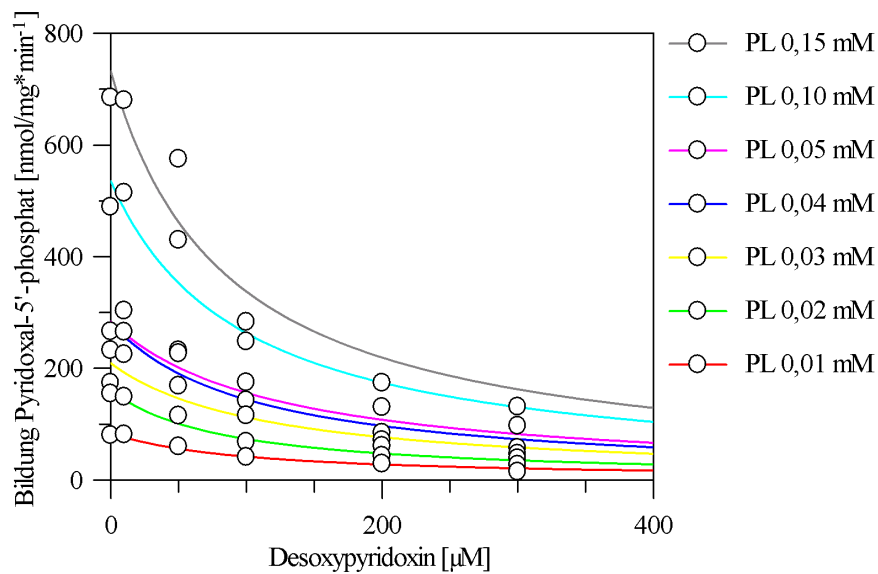


Abbildung 3.58 Bestimmung des K_i -Wertes für Desoxyipyridoxin mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase, Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Inhibitor-Konzentration

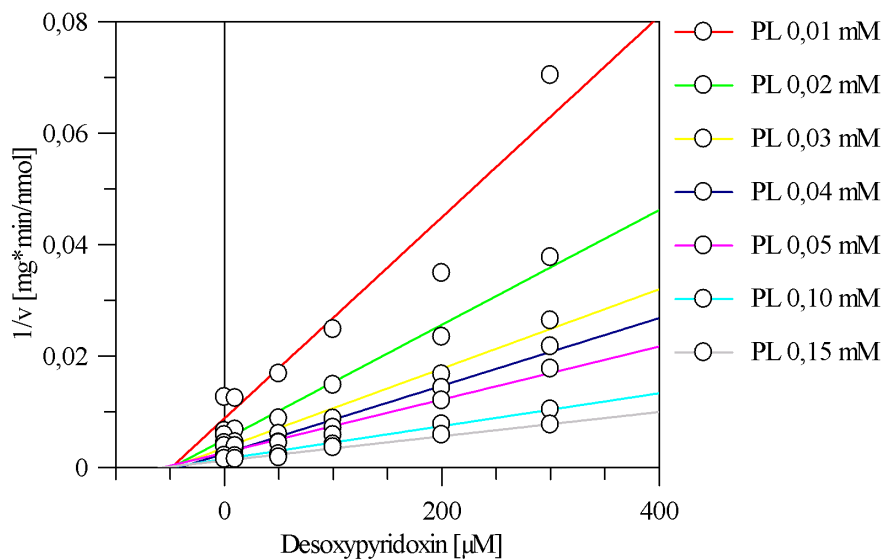


Abbildung 3.59 Bestimmung des K_i -Wertes für Desoxyipyridoxin mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase, Hemm-Diagramm nach Dixon

Die Messergebnisse zeigen, dass mit steigender Desoxyipyridoxin-Konzentration die

Geschwindigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung sinkt (Abbildung 3.58).

Durch Anwendung der in Kapitel 2.5.2.2.1 angegebenen Gleichungen wurden folgende Werte ermittelt:

$$\begin{aligned}K_{iapp} &= 98,4 \pm 3,23 \mu\text{M} \\v_i &= 532 \pm 60,5 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}^{-1}\end{aligned}$$

Aus dem apparenten K_i -Wert von $98,4 \mu\text{M}$ für Desoxypyridoxin, der Substratkonzentration von $50 \mu\text{M}$ und dem bereits photometrisch bestimmten K_m -Wert für Pyridoxal ($70,1 \mu\text{M}$, Kapitel 3.3.2.2.6) wurde der K_i -Wert für Desoxypyridoxin berechnet. Der K_i -Wert für Desoxypyridoxin beträgt $57,5 \mu\text{M}$.

Der für Desoxypyridoxin im Proteinrohextrakt ermittelte K_i -Wert ($57,2 \mu\text{M}$) korreliert mit dem für die gereinigte Pyridoxal-Kinase bestimmten K_i -Wert ($57,5 \mu\text{M}$).

3.4.6 *UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATEIGENSCHAFTEN VON GINKGOTOXIN*

Die in Kapitel 3.4.1.1.2 genannte Hypothese, dass Ginkgotoxin ein Substrat der menschlichen Pyridoxal-Kinase ist, sollte durch Inkubationen der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin untersucht werden. Die Auswertung dieser Enzyminkubationen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC.

3.4.6.1 *Untersuchung der Substrateigenschaften von Ginkgotoxin mittels Dünnschichtchromatographie*

Es wurden Enzyminkubationen mit Pyridoxal in An- und Abwesenheit von Ginkgotoxin durchgeführt. Die Ginkgotoxin-Konzentration betrug $31,25 \mu\text{M}$ oder $250 \mu\text{M}$. Nach der Enzyminkubation erfolgte die dünnschichtchromatographische Trennung der Reaktionsprodukte.

Das Ergebnis ist in Abbildung 3.60 dargestellt. Die Inkubationsansätze entsprachen der für den photometrischen Test verwendeten Assay-Zusammensetzung (Kapitel 2.6.1.4). Von den Inkubationsansätzen wurden jeweils $200 \mu\text{l}$ aufgetragen. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Wasser, Ammoniak (5 %), Tertiärbutanol und Ethylmethylketon im Verhältnis 1:2:4:3 verwendet. Die Detektion erfolgte mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid unter Bildung eines instabilen blauen Indophenol-Farbstoffes. Ginkgotoxin reagierte am empfindlichsten. Die Konzentration von Pyridoxal, Pyridoxal-5'-phosphat und Ginkgotoxin-5'-phosphat war zu gering, um detektiert werden zu können. In Abbildung 3.60 ist

Ginkgotoxin als blauer Fleck erkennbar. Die Lage von Ginkgotoxin wurde mit einem Pfeil markiert.

In Spur 1 wurde der Inkubationsansatz der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin (31,25 μM) und Pyridoxal (50 μM) aufgetragen. In Spur 4 wurde der Inkubationsansatz ohne Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin 31,25 μM aufgetragen (Kontrolle).

In Spur 4 ist ein Ginkgotoxinfleck (blau) erkennbar, in Spur 1 ist jedoch kein Ginkgotoxin detektierbar. Das heißt, bei gleichzeitiger Inkubation von Ginkgotoxin und Pyridoxal mit der Pyridoxal-Kinase wurde Ginkgotoxin umgesetzt, gezeigt durch das Verschwinden des Ginkgotoxinfleckes in Spur 1.

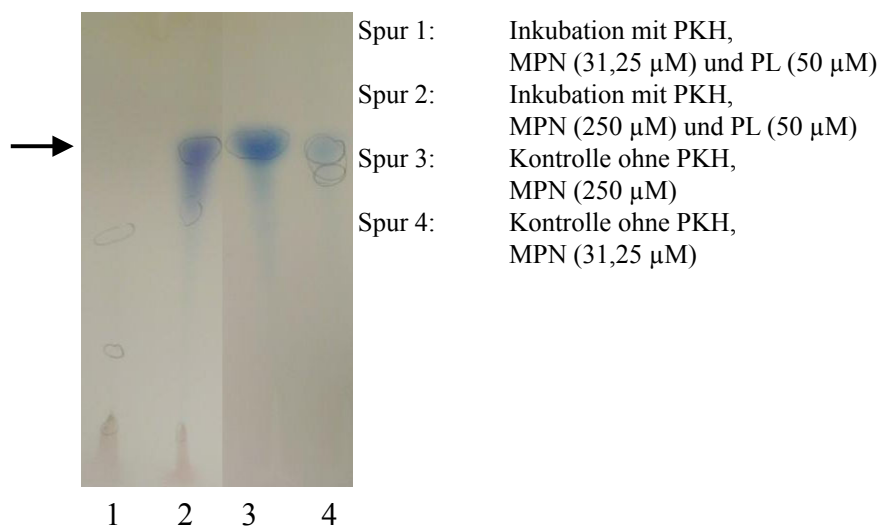


Abbildung 3.60 Dünnschichtchromatogramm zur Überprüfung der Ginkgotoxinumsetzung durch die Pyridoxal-Kinase

Spur 2 unterscheidet sich von Spur 1 durch die höhere Ginkgotoxin-Konzentration (250 μM). In dieser Spur ist Ginkgotoxin noch deutlich zu erkennen. Hier wurde das in wesentlich höherer Konzentration vorliegende Ginkgotoxin nicht vollständig umgesetzt. Die Inkubationsdauer reichte nicht aus, dass gesamte in Ansatz 2 befindliche Ginkgotoxin durch die Pyridoxal-Kinase zu Ginkgotoxin-5'-phosphat umzusetzen. Die Kontrolle für Ansatz 2 wurde in Spur 3 aufgetragen.

Diese dünnschichtchromatographische Untersuchung unterstützt die in Kapitel 3.4.1.1.2 genannte Vermutung, dass Ginkgotoxin ein Substrat der menschlichen Pyridoxal-Kinase ist und von dieser umgesetzt wird. Die Umsetzung von Ginkgotoxin zu Ginkgotoxin-5'-phosphat wurde im Folgenden durch Erfassung der Reaktionsprodukte mittels HPLC genauer charakterisiert (Kapitel 3.4.6.2).

3.4.6.2 Untersuchung der Substrateigenschaft von Ginkgotoxin mittels HPLC

Die Umsetzung von Ginkgotoxin zu Ginkgotoxin-5'-phosphat durch die menschliche Pyridoxal-Kinase wurde mittels HPLC untersucht. Es wurde die in Kapitel 2.6.5 beschriebene Methode eingesetzt. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach der in Kapitel 2.6.1.4 angegebenen Zusammensetzung für die photometrische Bestimmung der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung. Vor Zugabe des Substrates Ginkgotoxin wurden die Inkubationsansätze für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ginkgotoxin wurden die Ansätze bis zur Beendigung der Inkubation bei 37 °C im Wasserbad temperiert.

3.4.6.2.1 Inkubation der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin und zeitabhängige Auftrennung der Reaktionsprodukte

Mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase und Ginkgotoxin wurden Enzyminkubationen durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze direkt auf die HPLC-Säule aufgegeben und das Stoffgemisch getrennt. Für die Inkubationen wurden 2,5 µg gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Die Ginkgotoxin-Konzentration betrug 25 µM.

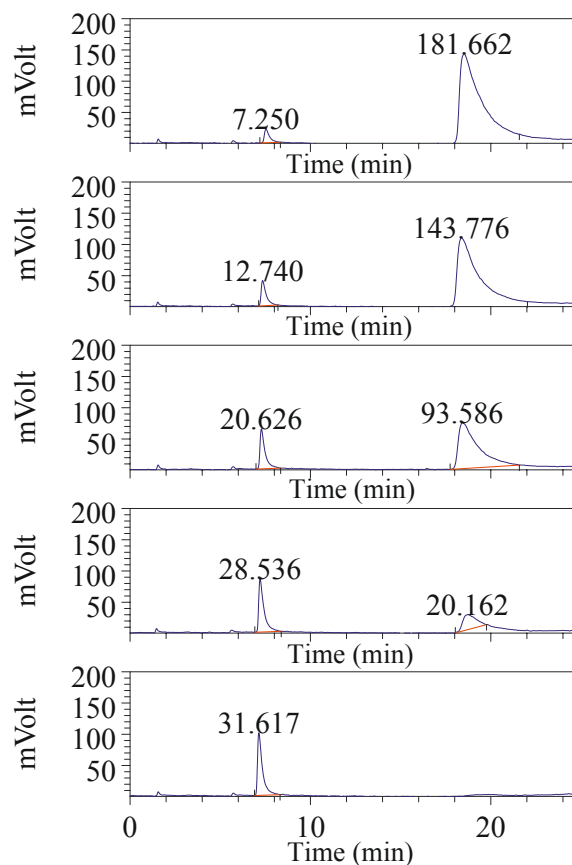


Abbildung 3.61 HPLC-Chromatogramme der Inkubationsansätze der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin. Abgebildet sind die Chromatogramme nach 2, 4, 6, 8 und 10 Minuten Inkubation (von oben nach unten). Angegeben wurden die Peakflächen der eluierten Substanzen.

In Abbildung 3.61 sind die Chromatogramme der Reaktionsansätze nach 2, 4, 6, 8 und 10 Minuten Inkubation abgebildet (Reihenfolge von oben nach unten angegeben). Ginkgotoxin wird nach 18-20 Minuten eluiert. Je länger die Inkubation von Ginkgotoxin mit der Pyridoxal-Kinase erfolgte, desto kleiner wurde dieser Peak. Dieser Versuch zeigte, dass Ginkgotoxin von der Pyridoxal-Kinase umgesetzt wurde. Gleichzeitig erfolgte die Bildung eines neuen Peaks zwischen 7 und 9 Minuten. Dieser nahm mit steigender Inkubationszeit zu.

Ein Vergleich mit synthetisch hergestelltem Ginkgotoxin-5'-phosphat zeigte, dass es sich bei diesem Peak um Ginkgotoxin-5'-phosphat handeln kann, da auch dieser Peak zwischen 7 und 9 Minuten eluiert (vergleiche Abbildung 7.26 und 7.27). Durch anschließende Behandlung der Inkubationsansätze mit alkalischer Phosphatase (Kapitel 3.4.6.2.2) wurde die Annahme überprüft, ob tatsächlich Ginkgotoxin-5'-phosphat durch die Pyridoxal-Kinase gebildet wurde.

3.4.6.2.2 Überprüfung der Bildung von Ginkgotoxin-5'-phosphat durch Behandlung des Inkubationsansatzes mit alkalischer Phosphatase

Die Hypothese, dass Ginkgotoxin durch die menschliche Pyridoxal-Kinase zu Ginkgotoxin-5'-phosphat umgesetzt wird, wurde durch Inkubation von Ginkgotoxin mit dem Enzym und anschließender Hydrolyse mit alkalischer Phosphatase überprüft. Die Auftrennung der Inkubationsansätze erfolgte mittels HPLC. Es wurden 5,0 μg Pyridoxal-Kinase mit 25 μM Ginkgotoxin bei 37 °C inkubiert. Nach 5 und nach 60 Minuten wurden 50 μl des Inkubationsansatzes mittels HPLC aufgetrennt. Die Chromatogramme sind in Abbildung 3.62 und 3.63 gezeigt.

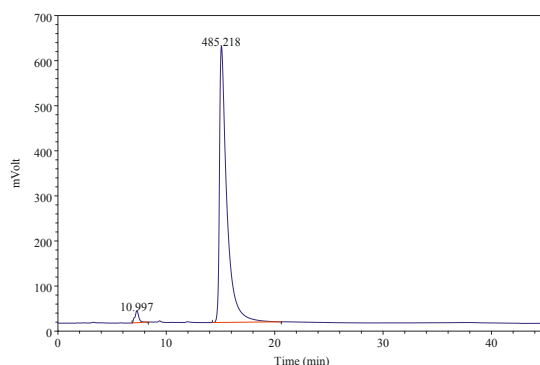


Abbildung 3.62

HPLC Chromatogramm nach 5 minütiger Inkubation der Pyridoxal-Kinase (5 μg) mit Ginkgotoxin (25 μM)

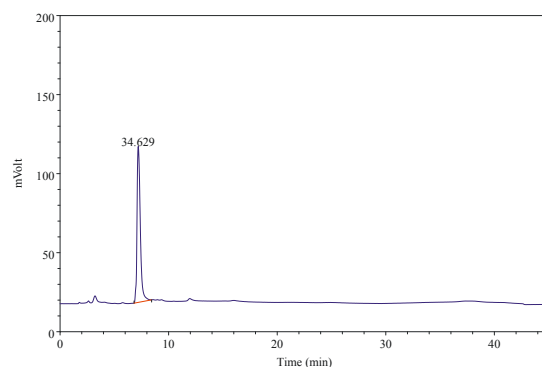


Abbildung 3.63

HPLC Chromatogramm nach 60 minütiger Inkubation der Pyridoxal-Kinase (5 μg) mit Ginkgotoxin (25 μM)

Nach fünf Minuten war nur ein Teil des eingesetzten Ginkgotoxins umgesetzt (Abbildung

3.62) und nach 60 Minuten Inkubation war das gesamte im Ansatz befindliche Ginkgotoxin umgesetzt worden (Abbildung 3.63). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Pyridoxal-Kinase durch Erhitzen (5 Minuten, 100 °C) inaktiviert. Die denaturierte Pyridoxal-Kinase wurden durch Zentrifugieren (20000xg, 5 Minuten) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit alkalischer Phosphatase (100 u) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

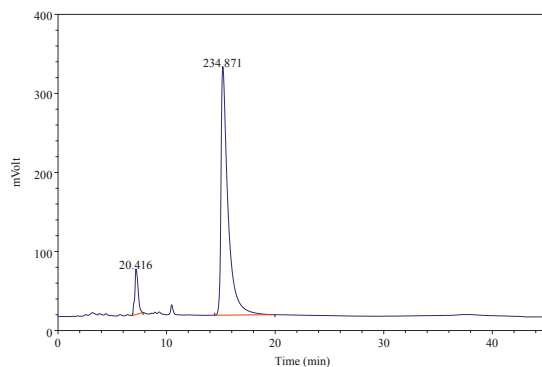


Abbildung 3.64
HPLC Chromatogramm nach 5 minütiger Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem durch die Pyridoxal-Kinase gebildeten Ginkgotoxin-5'-phosphat

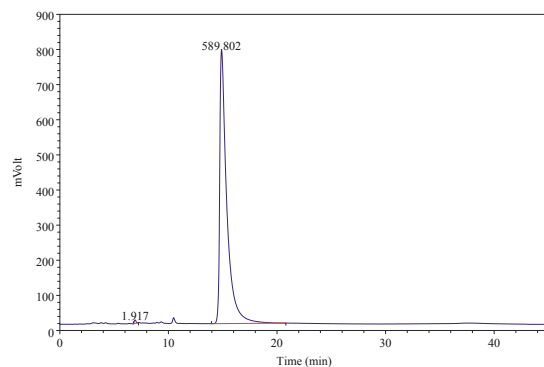


Abbildung 3.65
HPLC Chromatogramm nach 60 minütiger Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem durch die Pyridoxal-Kinase gebildeten Ginkgotoxin-5'-phosphat

Nach 5 und nach 60 Minuten wurden 50 µl des Inkubationsansatzes mittels HPLC aufgetrennt. Abbildung 3.64 und 3.65 zeigen die erhaltenen HPLC-Chromatogramme. Nach 5 Minuten Reaktion mit dem nach Inkubation von Ginkgotoxin mit der Pyridoxal-Kinase erhaltenen Substanzgemisches mit alkalischer Phosphatase war bereits ein Teil des nach 7 Minuten eluierenden Peaks unter Bildung von Ginkgotoxin umgesetzt worden (Abbildung 3.64). Nach 60 Minuten war fast die gesamte Substanzmenge zu Ginkgotoxin hydrolysiert worden (Abbildung 3.65).

Aus den Ergebnissen der Inkubationen von Ginkgotoxin mit der Pyridoxal-Kinase, der Hydrolyse des dabei gebildeten Reaktionsproduktes durch die alkalische Phosphatase und dem Vergleich mit Chromatogrammen des Ginkgotoxin-5'-phosphatstandards, lässt sich folgern, dass Ginkgotoxin unter Bildung von Ginkgotoxin-5'-phosphat durch die menschliche Pyridoxal-Kinase umgesetzt wird. Ginkgotoxin ist also ein Substrat der menschlichen Pyridoxal-Kinase.

3.4.6.3 Bestimmung der logP-Werte für Ginkgotoxin und Pyridoxal

Die Bestimmung des logP-Wertes erfolgte mit der in Kapitel 2.6.1.5 beschriebenen Methode. Die Bestimmung des logP-Wertes ermöglicht eine Bewertung der Lipophilie

einer Substanz. Die Bestimmung wurde durchgeführt, um zu zeigen, dass Ginkgotoxin lipophiler ist als Pyridoxal und deshalb besser mit dem aktiven Zentrum der menschlichen Pyridoxal-Kinase interagieren kann.

Wasser wurde mit n-Octanol versetzt und bei Raumtemperatur im Schüttler für 20 Stunden bei 180 rpm zur Sättigung mit n-Octanol belassen. Nach dem gleichen Prinzip wurde umgekehrt n-Octanol mit Wasser gesättigt. Nach 20 Stunden wurden n-Octanol und Wasser durch Zentrifugieren getrennt (9000xg).

Zur Bestimmung des logP-Wertes wurden von Pyridoxal und Ginkgotoxin jeweils 5 mM Lösungen in n-Octanol gesättigtem Wasser hergestellt (Stocklösungen). Mit diesen Lösungen wurden photometrisch Eichgeraden erstellt, um die Konzentration von Pyridoxal und Ginkgotoxin nach Verteilung in den Phasen ermitteln zu können. Für Pyridoxal erfolgte die Bestimmung bei 290 nm und für Ginkgotoxin bei 327 nm, jeweils in einem Konzentrationsbereich von 0,02 mM bis 0,25 mM (vergleiche UV-Vis-Spektren Abbildung 7.6 und 7.16).

Für die logP-Bestimmung wurden die 5 mM Stocklösungen mit n-Octanol gesättigtem Wasser auf 0,5 mM verdünnt (Ausgangskonzentration). 10 ml der 0,5 mM Substratlösung wurden jeweils mit 10 ml des mit Wasser gesättigten n-Octanol versetzt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt (180 rpm). Um die Phasen zu trennen, wurden die Proben anschließend zentrifugiert (9000xg). Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Konzentration von Pyridoxal beziehungsweise Ginkgotoxin darin bestimmt (Endkonzentration). Aus der Differenz der Ausgangskonzentration und der Endkonzentration wurde die Konzentration des Analyten in der n-Octanol-Phase berechnet. Der Verteilungskoeffizient ($P_{O/W}$) wurde durch Division der Konzentration des Analyten in n-Octanol mit der Konzentration in der wässrigen Phase erhalten. Dieser Versuch belegt, dass Ginkgotoxin einen höheren Verteilungskoeffizienten für das Gemisch n-Octanol/Wasser hat als Pyridoxal.

$$P_{O/W, \text{Ginkgotoxin}}: 0,502$$

$$P_{O/W, \text{Pyridoxal}}: 0,066$$

Aus den Verteilungskoeffizienten ergeben sich folgende logP-Werte:

$$\log P_{\text{Ginkgotoxin}}: -0,299$$

$$\log P_{\text{Pyridoxal}}: -1,182$$

Dieser Versuch zeigte, dass Ginkgotoxin hydrophober ist als Pyridoxal. Ginkgotoxin kann daher umso besser mit Strukturen interagieren, je hydrophober diese sind. Der Bereich der Pyridoxal-Kinasebindetasche, der den 4'-Substituenten des Substrates bindet, ist

hydrophob (Kapitel 3.5.3). Daher kann Ginkgotoxin aufgrund der höheren Hydrophobie besser mit der Pyridoxal-Kinase interagieren als Pyridoxal. Dies korreliert mit den ermittelten K_m -Werten der menschlichen Pyridoxal-Kinase für Pyridoxal und Ginkgotoxin (Tabelle 3.4).

3.4.7 *BESTIMMUNG DER K_m -WERTE VON PYRIDOXIN, PYRIDOXAMIN, DESOXYPYRIDOXIN UND GINKGOTOXIN MITTELS HPLC*

Ginkgotoxin wird von der Pyridoxal-Kinase als Substrat akzeptiert und zu Ginkgotoxin-5'-phosphat umgesetzt (Kapitel 3.4.6). Es inhibiert die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat (Kapitel 3.4.1) durch die Pyridoxal-Kinase. Die Bestimmung des K_m -Wertes der Pyridoxal-Kinase für Ginkgotoxin, Pyridoxin und Pyridoxamin sollte einen Vergleich dieser Substanzen hinsichtlich ihrer Qualität als Substrat für die Pyridoxal-Kinase ermöglichen. Gleichzeitig konnte so überprüft werden, ob die menschliche Pyridoxal-Kinase die Vitamere Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin umsetzt und ob eine dieser Substanzen bevorzugt umgesetzt wird (vergleiche Kapitel 4.3.3). Die Bestimmung der K_m -Werte erfolgte mittels HPLC. Zusätzlich wurde der K_m -Wert für Desoxypyridoxin bestimmt, da diese Verbindung, wie Ginkgotoxin, ein Vitamin B₆-Antivitamin ist.

Entsprechend dem Standardassay wurden Kaliumphosphatpuffer (70 mM, pH-Wert 6,2), Wasser, Zinkchlorid (0,1 mM), ATP (1,0 mM) und die Pyridoxal-Kinase (2,5–5 µg) miteinander gemischt und anschließend im Wasserbad 3 Minuten temperiert (37 °C). Nach der Temperierung wurde das jeweilige Substrat zugegeben und für 1 bis 6 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des Inkubationsansatzes mittels HPLC getrennt. Nach der Umrechnung der Peakflächen der gebildeten 5'-Phosphate mittels Eichgeraden in Reaktionsgeschwindigkeiten [Bildung 5'-Phosphat/mg*min⁻¹] wurden die K_m -Werte bestimmt (Kapitel 2.5.2.1.6).

3.4.7.1 *Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxin*

Für die Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxin mittels HPLC wurden 5 µg gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Diese wurde mit Pyridoxin-Konzentrationen von 0,005 mM bis 0,075 mM für 1 Minute bei 37 °C inkubiert. Die entsprechende Michaelis-Menten-Kurve ist in Abbildung 3.66, das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.67 dargestellt.

Für Pyridoxin wurde ein K_m -Wert von $9,87 \pm 1,20 \times 10^{-6}$ M ermittelt. Die ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $2,11 \pm 0,073 \times 10^{-6}$ mol/mg*min⁻¹.

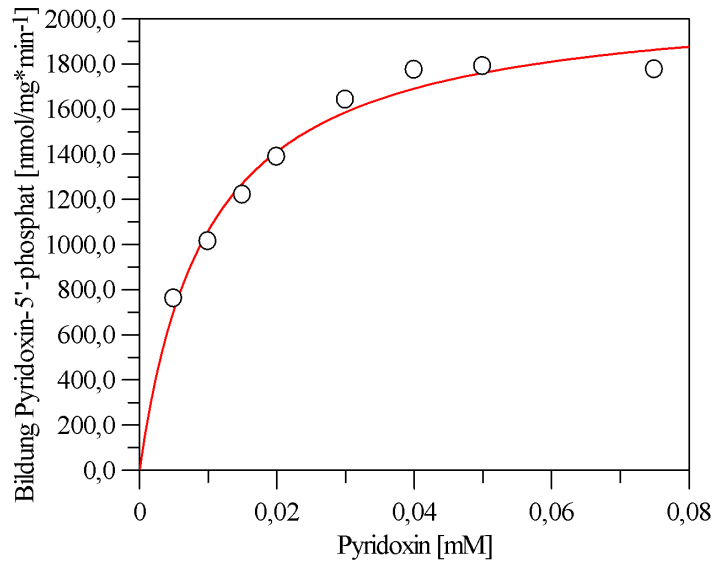


Abbildung 3.66 Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxin

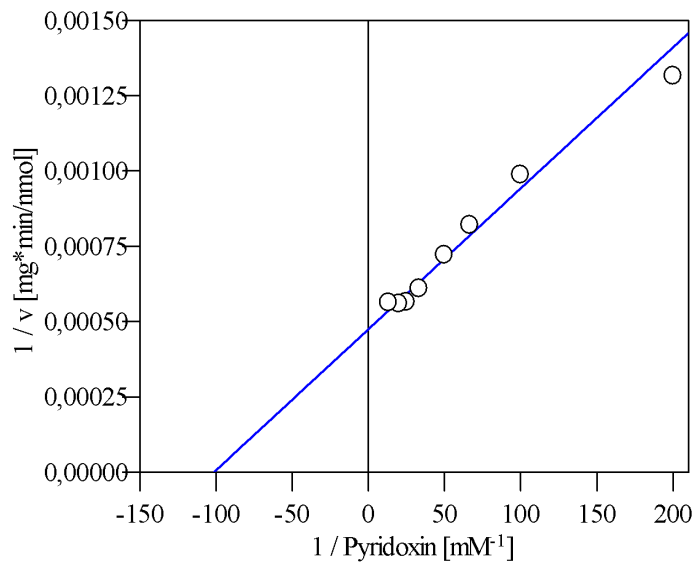


Abbildung 3.67 Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxin

Der K_m -Wert für Pyridoxin ist kleiner als der K_m -Wert für Pyridoxal ($5,87 \times 10^{-5} \text{ M}$). Die Affinität der Pyridoxal-Kinase zu Pyridoxin ist also höher als zu Pyridoxal. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist für Pyridoxin ebenfalls höher als für Pyridoxal ($1,70 \times 10^{-6} \text{ mol/mg} \cdot \text{min}^{-1}$).

3.4.7.2 Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxamin

Für die Bestimmung des K_m -Wertes von Pyridoxamin mittels HPLC wurden $5 \mu\text{g}$ gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Diese wurde mit Pyridoxamin-Konzentrationen von $0,05 \text{ mM}$ bis $0,4 \text{ mM}$ für 1 Minute bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die entsprechende Michaelis-Menten-Kurve ist in Abbildung 3.68, das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm in

Abbildung 3.69 dargestellt.

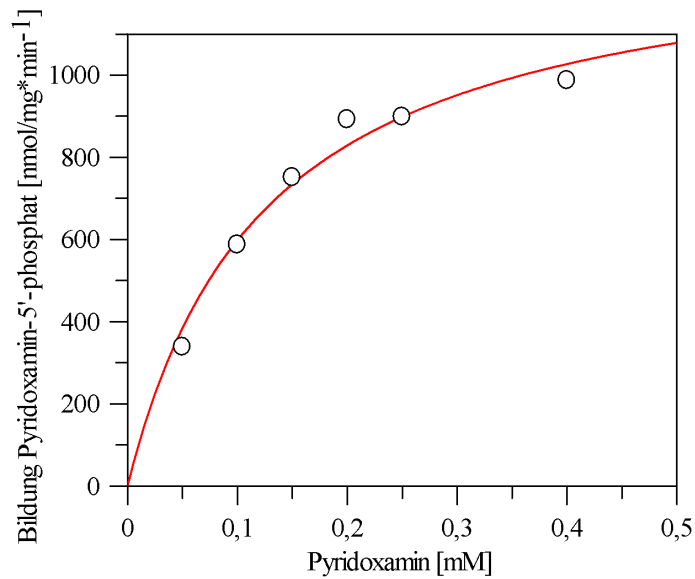


Abbildung 3.68 Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxamin

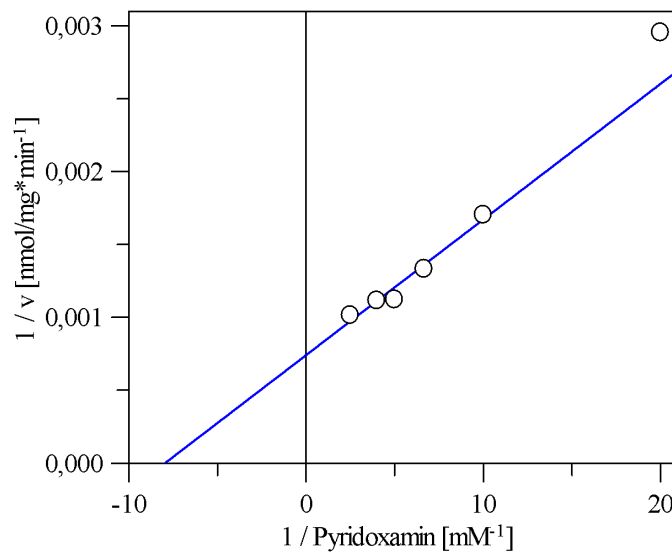


Abbildung 3.69 Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxamin

Für Pyridoxamin wurde ein K_m -Wert von $1,26 \pm 0,25 \times 10^{-4}$ M ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $1,35 \pm 0,10 \times 10^{-6}$ mol/mg*min⁻¹. Der K_m -Wert für Pyridoxamin ist größer als der K_m -Wert für Pyridoxal ($5,87 \times 10^{-5}$ M). Die Affinität der Pyridoxal-Kinase zu Pyridoxamin ist also geringer als zu Pyridoxal. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für Pyridoxamin ist geringer als für Pyridoxal ($1,70 \times 10^{-6}$ mol/mg*min⁻¹).

3.4.7.3 Bestimmung des K_m -Wertes für Desoxypyridoxin

Für die Bestimmung des K_m -Wertes von Desoxypyridoxin mittels HPLC wurden 5 μg gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Diese wurde mit Desoxypyridoxin-Konzentrationen von 0,015 mM bis 0,1 mM für 1 Minute bei 37 °C inkubiert. Die entsprechende Michaelis-Menten-Kurve ist in Abbildung 3.70, das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.71 dargestellt.

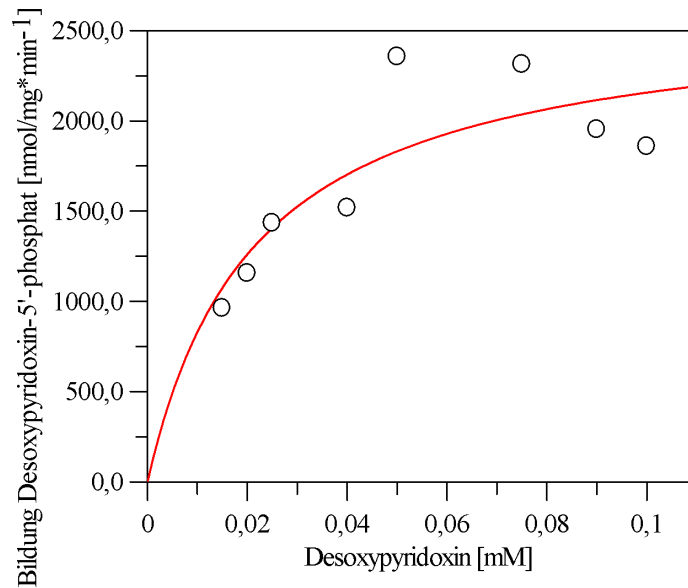


Abbildung 3.70

Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Desoxypyridoxin

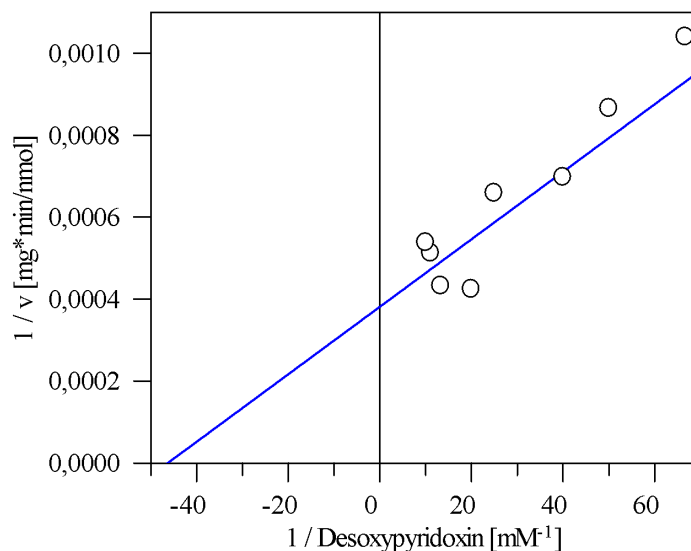


Abbildung 3.71

Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes für Desoxypyridoxin

Für Desoxypyridoxin wurde ein K_m -Wert von $2,16 \pm 1,05 \times 10^{-5}$ M ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $2,62 \pm 0,40 \times 10^{-6}$ mol/mg*min⁻¹. Der K_m -Wert

für Desoxypyridoxin ist kleiner als der K_m -Wert für Pyridoxal ($5,87 \times 10^{-5}$ M). Die Affinität der Pyridoxal-Kinase zu Desoxypyridoxin ist also höher als zum natürlichen Substrat Pyridoxal. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist für Desoxypyridoxin höher als für Pyridoxal ($1,70 \times 10^{-6}$ mol/mg*min⁻¹).

3.4.7.4 Bestimmung des K_m -Wertes für Ginkgotoxin

Für die Bestimmung des K_m -Wertes von Ginkgotoxin mittels HPLC wurden 5 μ g gereinigte Pyridoxal-Kinase eingesetzt. Diese wurde mit Ginkgotoxin-Konzentrationen von 0,005 mM bis 0,025 mM für 30 Sekunden bei 37 °C inkubiert.

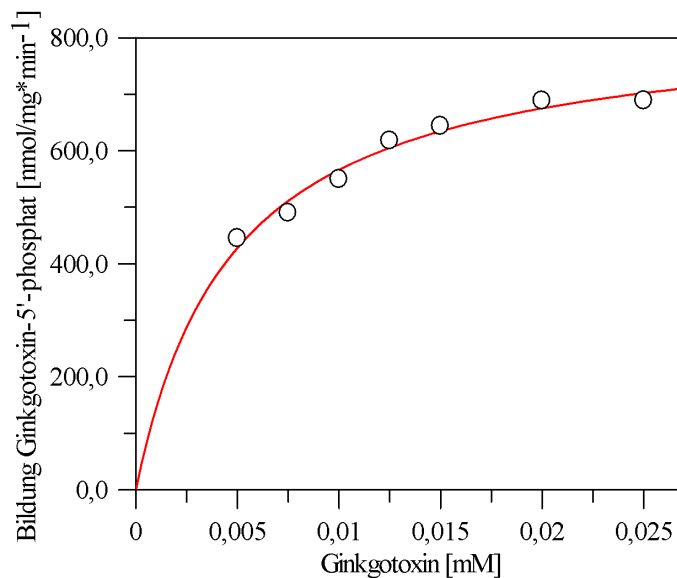


Abbildung 3.72

Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung des K_m -Wertes für Ginkgotoxin

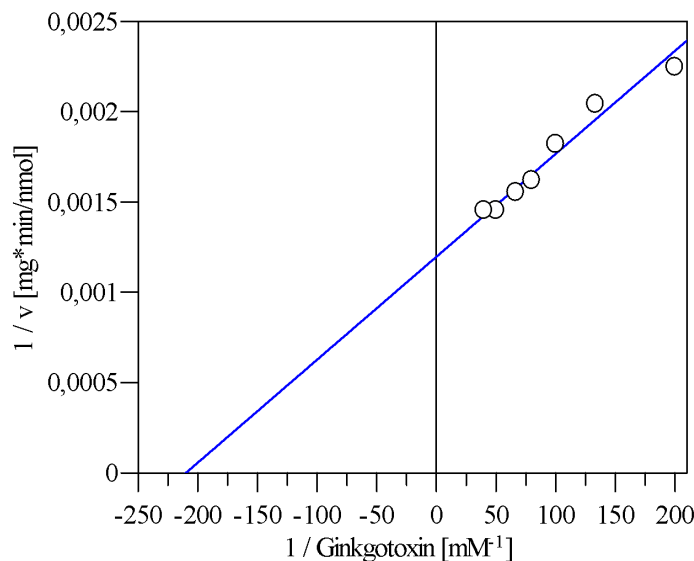


Abbildung 3.73

Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes von Ginkgotoxin

Die entsprechende Michaelis-Menten-Kurve ist in Abbildung 3.72, das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.73 dargestellt. Für Ginkgotoxin wurde ein K_m -Wert von $4,95 \pm 0,21 \times 10^{-6}$ M ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $7,87 \pm 0,69 \times 10^{-7}$ mol/mg*min⁻¹. Die Affinität der Pyridoxal-Kinase zu Ginkgotoxin ist also höher als zum natürlichen Substrat Pyridoxal. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist für Ginkgotoxin niedriger als für Pyridoxal ($1,70 \times 10^{-6}$ mol/mg*min⁻¹).

3.4.7.5 Zusammenfassung aller K_m -, K_i - und V_{max} -Wert-Bestimmungen

In den Tabellen 3.3 bis 3.5 sind alle im Rahmen dieser Arbeit bestimmten K_m -, K_i - und V_{max} -Werte zusammengefasst.

Verbindung	K_m -Wert [M]	V_{max} [mol/mg*min ⁻¹]
Pyridoxal*	$4,91 \times 10^{-5}$	$6,01 \times 10^{-8}$
Pyridoxal	$7,01 \times 10^{-5}$	$6,42 \times 10^{-7}$
ATP	$2,30 \times 10^{-5}$	$3,28 \times 10^{-7}$

Tabelle 3.3 Photometrisch bestimmte K_m - und V_{max} -Werte für Pyridoxal und ATP. *Dieser Wert wurde im Proteinrohextrakt der nativ exprimierten Pyridoxal-Kinase bestimmt. Alle anderen Werte wurden mit gereinigter Pyridoxal-Kinase bestimmt.

Die Untersuchung der Umsetzung von Pyridoxal, Pyridoxamin, Pyridoxin, Desoxy-pyridoxin und Ginkgotoxin haben gezeigt, dass alle genannten Verbindungen Substrate der Pyridoxal-Kinase sind. Die Pyridoxal-Kinase hat zu diesen Verbindungen eine unterschiedlich hohe Affinität.

Verbindung	K_m -Wert [M]	V_{max} [mol/mg*min ⁻¹]
Pyridoxal	$5,87 \times 10^{-5}$	$1,70 \times 10^{-6}$
Pyridoxin	$9,87 \times 10^{-6}$	$2,11 \times 10^{-6}$
Pyridoxamin	$1,26 \times 10^{-4}$	$1,35 \times 10^{-6}$
Desoxypyridoxin	$2,16 \times 10^{-5}$	$2,62 \times 10^{-6}$
Ginkgotoxin	$4,95 \times 10^{-6}$	$7,87 \times 10^{-7}$

Tabelle 3.4 Mittels HPLC bestimmte K_m - und V_{max} -Werte für die gereinigte Pyridoxal-Kinase

Aus der Tabelle 3.4 ist zu entnehmen, das Ginkgotoxin den kleinsten K_m -Wert hat. Ordnet man die Verbindungen nach ihrem K_m -Wert beginnend mit dem kleinsten K_m -Wert ergibt sich folgende Reihenfolge:

Ginkgotoxin < Pyridoxin < Desoxypyridoxin < Pyridoxal < Pyridoxamin

Die Pyridoxal-Kinase hat folglich eine höhere Affinität zu den Antivitaminen Ginkgotoxin und Desoxypyridoxin als zum natürlichen Substrat Pyridoxal. Der Vergleich der V_{\max} -Werte zeigt folgende Reihenfolge, beginnend mit der kleinsten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit:

Ginkgotoxin < Pyridoxamin < Pyridoxal < Pyridoxin < Desoxypyridoxin

Das Antivitamin Ginkgotoxin hat die geringste und das Antivitamin Desoxypyridoxin hat die höchste maximale Reaktionsgeschwindigkeit.

Verbindung	K _i -Wert [M]	
	Rohextrakt	gereinigte PKH
Pyridoxin	$6,3 \times 10^{-5}$	-
Desoxypyridoxin	$5,72 \times 10^{-5}$	$5,74 \times 10^{-5}$

Tabelle 3.5

Photometrisch bestimmte K_i-Werte für Pyridoxin und Desoxypyridoxin

Tabelle 3.5 zeigt, dass Pyridoxin und Desoxypyridoxin einen annähernd gleich großen K_i-Wert haben. Sie inhibieren die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat gleich stark. Diese beiden Substrate haben einen kleineren K_m-Wert als Pyridoxal. Sie verdrängen Pyridoxal vom aktiven Zentrum und werden selbst von der Pyridoxal-Kinase umgesetzt.

Beide Substanzen inhibieren die menschliche Pyridoxal-Kinase wie Ginkgotoxin, indem sie als Substrate der Kinase fungieren.

3.4.7.6 Berechnung der katalytischen Konstanten

Die katalytische Konstante k_{cat} oder Wechselzahl ("turnover number") gibt die Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms an. Sie entspricht der Anzahl an Substratmolekülen, die von einem Enzymmolekül pro Sekunde bei vollständiger Sättigung mit Substrat, in das Produkt umgewandelt werden kann [s^{-1}]. Sie ergibt sich aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und der molaren Menge des eingesetzten Enzyms ($k_{\text{cat}} = v_{\text{max}} / E$).

Die im Rahmen dieser Arbeit berechneten k_{cat} -Werte (Tabelle 3.6) sind als relative Angaben zu betrachten, da die für die Versuche eingesetzte Enzymkonzentration mit der relativ ungenauen Methode nach Bradford (Kapitel 2.6.1.3) bestimmt wurde. Der Berechnung der k_{cat} -Werte wurde also nicht die Konzentration der aktiven Pyridoxal-Kinase-Moleküle zugrunde gelegt. Die Werte dienen dem relativen Vergleich der einzelnen

Vitamere und Antivitamere.

	k_{cat} [s ⁻¹]
Pyridoxal	0,995
Pyridoxin	1,233
Pyridoxamin	0,790
Desoxypyridoxin	1,535
Ginkgotoxin	0,460

Tabelle 3.6 k_{cat} -Werte für die untersuchten Substrate der Pyridoxal-Kinase

3.4.8 VERGLEICH DER REAKTIONSGESCHWINDIGKEITEN DER VITAMERE UND ANTIVITAMERE PRO MINUTE

Der Substratumsatz von Vitamin B₆, Desoxypyridoxin und Ginkgotoxin wurde miteinander verglichen, indem jeweils 2,5 µg gereinigte Pyridoxal-Kinase mit dem Substrat (0,05 mM) unter Standardbedingungen inkubiert wurde. Die Inkubationsansätze wurden mittels HPLC aufgetrennt. Aus den Peakflächen wurde die Bildung der entsprechenden 5'-Phosphate pro mg Pyridoxal-Kinase pro Minute berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.74 graphisch dargestellt und zeigt, dass Ginkgotoxin langsamer umgesetzt wird als Pyridoxal.

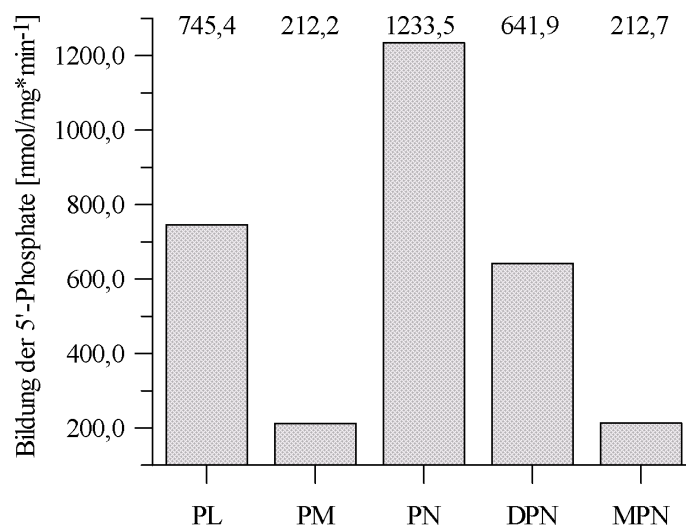


Abbildung 3.74 Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der Vitamere und Antivitamere pro Minute bei einer Substratkonzentration von 0,05 mM

3.4.9 UNTERSUCHUNG DER UMSETZUNG VON PYRIDOXAL DURCH DIE PYRIDOXAL-KINASE IN GEGENWART VON GINKGOTOXIN MITTELS HPLC

Analog des in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Versuches wurde mittels HPLC der Umsatz von

Pyridoxal in Anwesenheit von Ginkgotoxin untersucht. In Kapitel 3.4.1.1.2 konnte gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Inkubation der Pyridoxal-Kinase mit Pyridoxal und Ginkgotoxin die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung umso später einsetzt, je höher die Ginkgotoxin-Konzentration ist.

Mit diesem Versuch sollte überprüft werden, ob die gezeigte Unterdrückung der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung aus einer in der lag-Phase stattfindenden Ginkgotoxin-5'-phosphat-Bildung resultiert. 5 µg gereinigte Pyridoxal-Kinase wurden mit Pyridoxal (0,025 mM) und Ginkgotoxin (0,0125 mM beziehungsweise 0,025 mM) inkubiert. Zur Kontrolle wurde der Umsatz von Ginkgotoxin und Pyridoxal auch in separaten Inkubationen unter den gleichen Bedingungen untersucht (Abbildung 3.75). Die Komponenten des Assays wurden bis auf Pyridoxal und Ginkgotoxin miteinander gemischt und 3 Minuten im Wasserbad bei 37 °C temperiert. Anschließend wurden Ginkgotoxin und Pyridoxal zugegeben und die Inkubationsansätze bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionsprodukte mittels HPLC getrennt. Die separate Umsetzung der einzelnen Substanzen ist in Abbildung 3.75 und die Ergebnisse der Coinkubationen sind in Abbildung 3.76 und 3.77 graphisch dargestellt. Die separate Umsetzung der Einzelsubstanzen zeigt, dass sowohl die Bildung von Ginkgotoxin-5'-phosphat als auch die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat linear erfolgt und Ginkgotoxin-5'-phosphat (grüne Kurve) langsamer gebildet wird als Pyridoxal-5'-phosphat (rote Kurve).

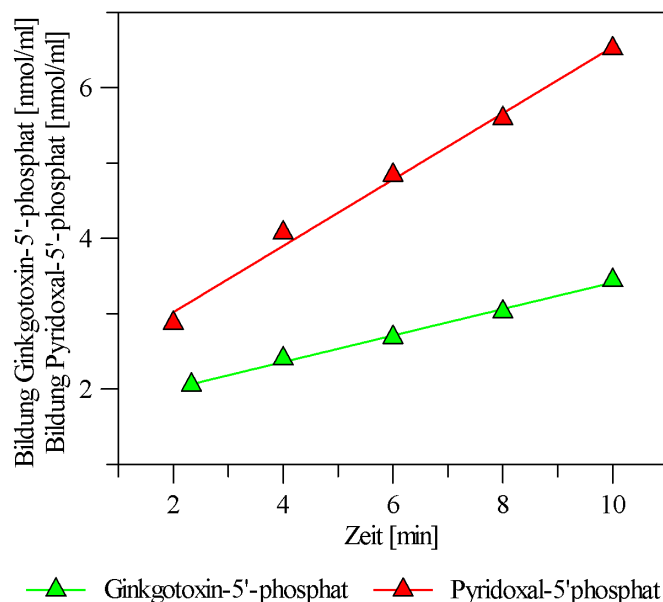


Abbildung 3.75 Umsatz von Ginkgotoxin und Pyridoxal (jeweils 0,025 mM) in separaten Inkubationen

Abbildung 3.76 zeigt die Umsetzung von Ginkgotoxin und Pyridoxal durch die Pyridoxal-Kinase bei einem äquimolaren Substratverhältnis. Die Bildung von Ginkgotoxin-5'-

phosphat erfolgt mit signifikant höherer Geschwindigkeit als die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat. Die Bildung des Pyridoxal-5'-phosphates ist bei gleichzeitiger Bildung von Ginkgotoxin-5'-phosphat nahezu unterdrückt. Dies ist umgekehrt zu dem Umsatz bei separater Inkubation der Pyridoxal-Kinase mit Ginkgotoxin oder Pyridoxal (Abbildung 3.75).

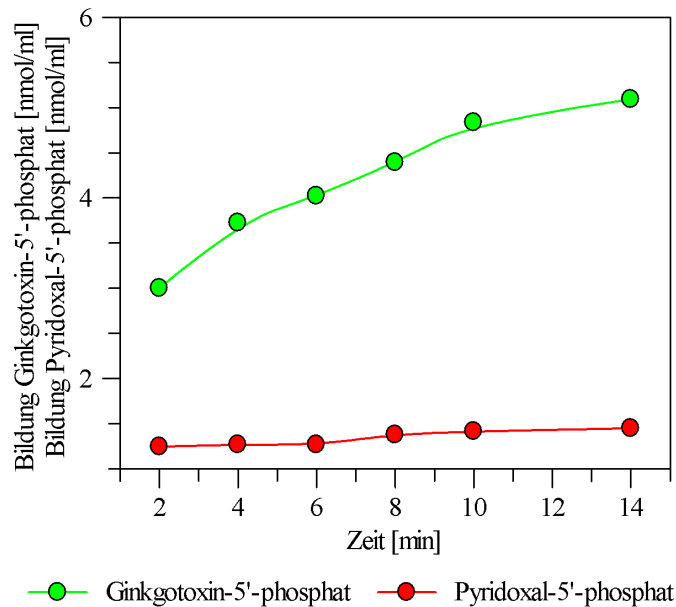


Abbildung 3.76
(0,025 mM)

Coincubation der Pyridoxal-Kinase mit Pyridoxal (0,025 mM) und Ginkgotoxin

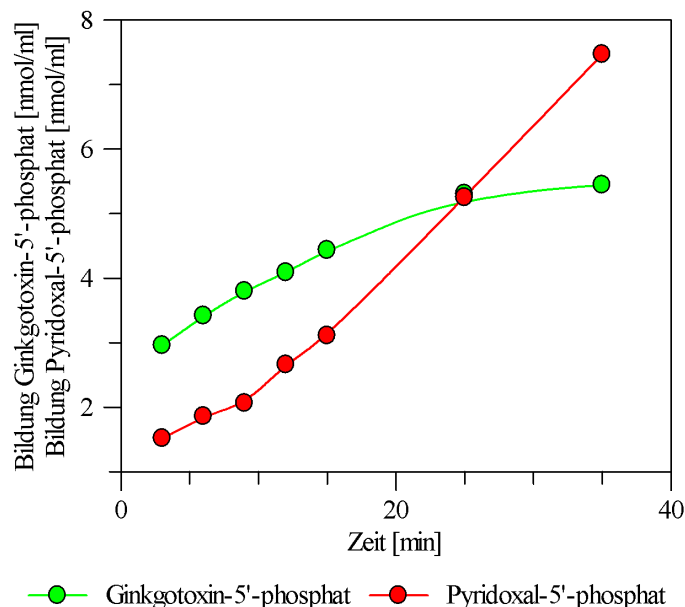


Abbildung 3.77
(0,0125 mM)

Coincubation der Pyridoxal-Kinase mit Pyridoxal (0,025 mM) und Ginkgotoxin

Ist das Verhältnis Pyridoxal zu Ginkgotoxin 2:1 (Abbildung 3.77), findet die Bildung von Ginkgotoxin-5'-phosphat zunächst mit annähernd gleicher Geschwindigkeit statt wie die

Umsetzung von Pyridoxal zu Pyridoxal-5'-phosphat. Die Kurven verlaufen zunächst nahezu parallel. Anschließend erfolgt die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat mit höherer Geschwindigkeit, als die Bildung von Ginkgotoxin-5'-phosphat.

Diese Versuche bestätigen die in Kapitel 3.4.1.1.2 genannte Hypothese, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von Pyridoxal und Ginkgotoxin zunächst ein Umsatz von Ginkgotoxin zu Ginkgotoxin-5'-phosphat stattfindet, bedingt durch den signifikant niedrigeren K_m -Wert von Ginkgotoxin im Vergleich zu Pyridoxal. Dieser Versuch zeigt, dass das Toxin bei gleichzeitigem Vorliegen von Ginkgotoxin und dem natürlichen Substrat Pyridoxal von der menschlichen Pyridoxal-Kinase bevorzugt umgesetzt wird. Daraus resultiert die Inhibierung der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung in Anwesenheit von Ginkgotoxin. Auf das menschliche Gehirn übertragen, lässt sich aus diesem Ergebnis folgern, dass Ginkgotoxin die Bildung des für den Aminosäurestoffwechsel notwendigen Cofaktors Pyridoxal-5'-phosphat unterdrücken kann.

3.4.10 SUBSTRATHEMMUNG

Wird ein Enzym durch sein Substrat gehemmt, ist das in der Michaelis-Menten-Darstellung daran erkennbar, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit nicht asymptotisch einer Maximalgeschwindigkeit annähert und im doppelt reziproken Diagramm kehrt sich der Kurvenverlauf zur Ordinate um. Die häufig zu beobachtende Substrathemmung ist damit zu erklären, dass neben dem umzusetzenden Substratmolekül noch ein weiteres Substratmolekül an das Enzym bindet und es hemmt (Bisswanger, 2000). Bei den Versuchen zur Bestimmung des K_m -Wertes für Pyridoxal wurde beobachtet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen nach Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit wieder absinkt. Die Pyridoxal-Kinase wird also bei hohen Substratkonzentrationen durch das Substrat gehemmt. Eine Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Pyridoxal wurde ebenfalls für *Trypanosoma brucei* durch Scott und Phillips (1997) beschrieben.

3.4.10.1 Hemmung der gereinigten Pyridoxal-Kinase durch Pyridoxal

In Abbildung 3.78 und 3.79 ist die Substrathemmung durch Pyridoxal graphisch dargestellt. Pyridoxal wurde in Konzentrationen von 0,005 mM bis 5,0 mM eingesetzt. Die Inkubationen wurden mit 10 µg Pyridoxal-Kinase bei 37 °C durchgeführt. Abbildung 3.78 und 3.79 zeigen, dass das Substrat Pyridoxal die Pyridoxal-Kinase in Konzentrationen größer als 0,25 mM hemmt. Bis zu einer Substratkonzentration von 0,20 mM steigt die

Reaktionsgeschwindigkeit der Pyridoxal-Kinase mit steigender Pyridoxal-Konzentration an. Bei Substratkonzentrationen größer als 0,25 mM sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von Pyridoxal durch die Pyridoxal-Kinase.

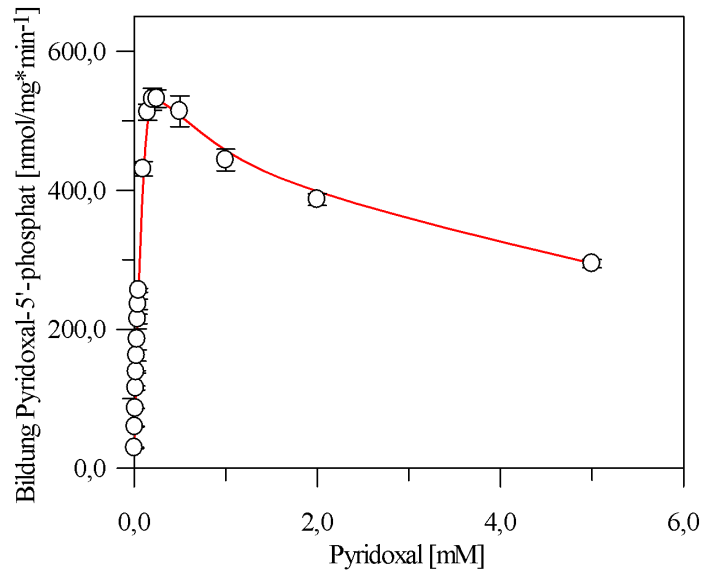


Abbildung 3.78

Direkte Darstellung der Substrathemmung für Pyridoxal

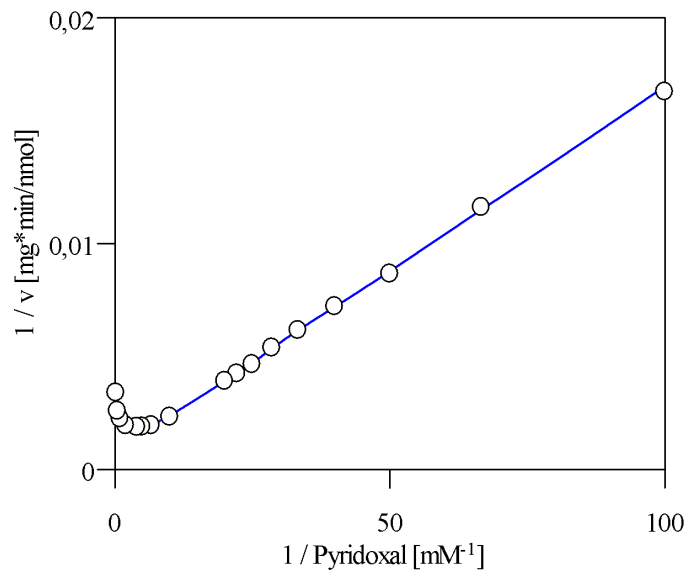


Abbildung 3.79

Doppel-reziproke Darstellung der Substrathemmung für Pyridoxal

3.4.10.2 Hemmung der gereinigten Pyridoxal-Kinase durch Ginkgotoxin

In Abbildung 3.80 und 3.81 ist die Substrathemmung durch Ginkgotoxin dargestellt. Ginkgotoxin wurde in Konzentrationen von 0,005 mM bis 0,04 mM eingesetzt. Die Inkubationen wurden mit 5 μ g Pyridoxal-Kinase bei 37 °C durchgeführt. Abbildung 3.80 und 3.81 zeigen, dass das Substrat Ginkgotoxin die Pyridoxal-Kinase in Konzentrationen größer als 0,02 mM hemmt. Bis zu einer Substratkonzentration von 0,02 mM steigt die

Reaktionsgeschwindigkeit der Pyridoxal-Kinase mit steigender Ginkgotoxin-Konzentration.

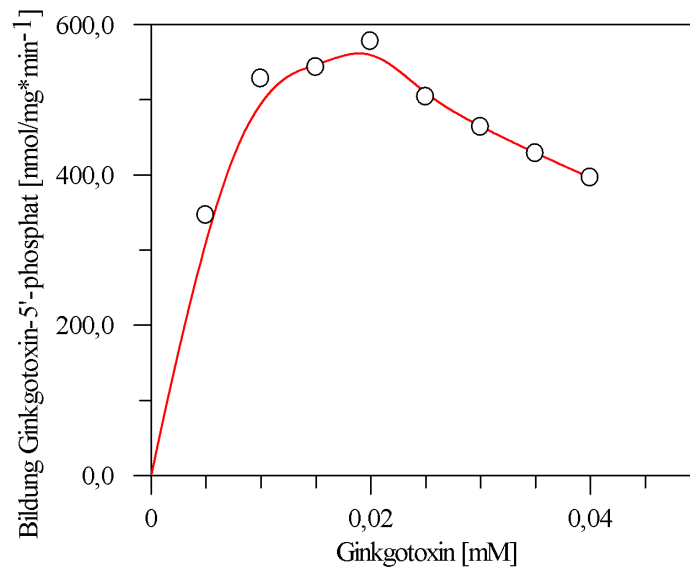


Abbildung 3.80 Direkte Darstellung der Substrathemmung für Ginkgotoxin

Bei Substratkonzentrationen größer als 0,02 mM sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von Ginkgotoxin durch die Pyridoxal-Kinase. Ginkgotoxin inhibiert also einerseits die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung, weil es selbst ein Substrat der Pyridoxal-Kinase ist und von dieser bevorzugt umgesetzt wird und andererseits, indem es das Enzym in Konzentrationen größer als 0,02 mM hemmt und die Reaktionsgeschwindigkeit vermindert (Substrathemmung).

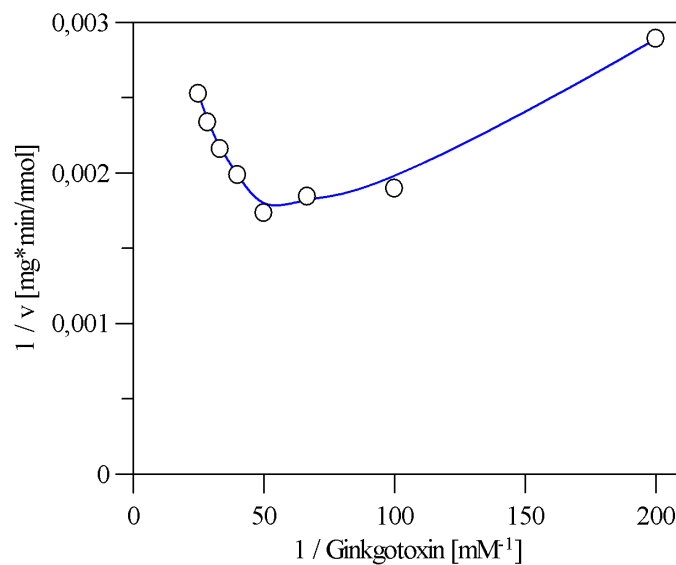


Abbildung 3.81 Doppel-reziproke Darstellung der Substrathemmung für Ginkgotoxin

Die Substrathemmung wurde *in vitro* ab einer Konzentration von 20 μ M beobachtet. Bei Vergiftungen mit Ginkgosamen wurden so hohe Konzentration allerdings noch nicht im

Blut von Patienten gemessen. Die höchste bei Vergiftungen gemessene Konzentration war $6,99 \mu\text{M}$. *In vivo* wird die Substrathemmung des Ginkgotoxins daher nicht für die toxischen Symptome einer Vergiftung verantwortlich sein.

3.4.10.3 Hemmung der gereinigten Pyridoxal-Kinase durch Desoxypyridoxin

In Abbildung 3.82 und 3.83 ist die Substrathemmung durch Desoxypyridoxin dargestellt. Desoxypyridoxin wurde in Konzentrationen von $0,015 \text{ mM}$ bis $0,20 \text{ mM}$ eingesetzt. Die Inkubationen wurden mit $5 \mu\text{g}$ Pyridoxal-Kinase bei 37°C durchgeführt.

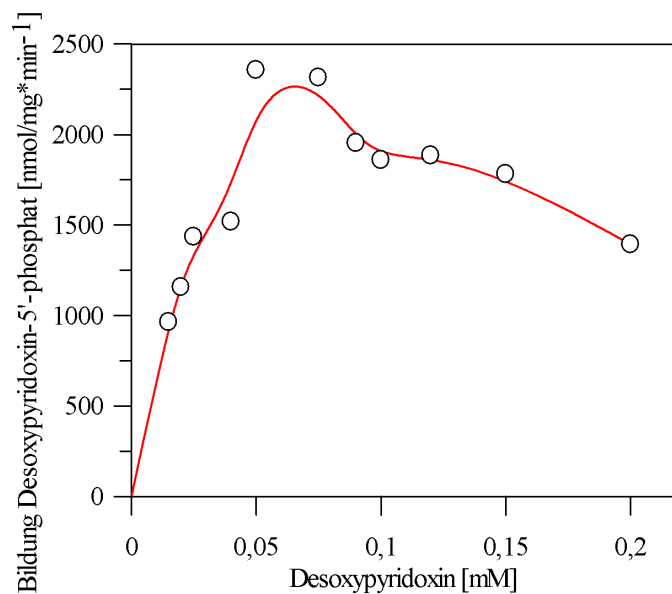


Abbildung 3.82

Direkte Darstellung der Substrathemmung für Desoxypyridoxin

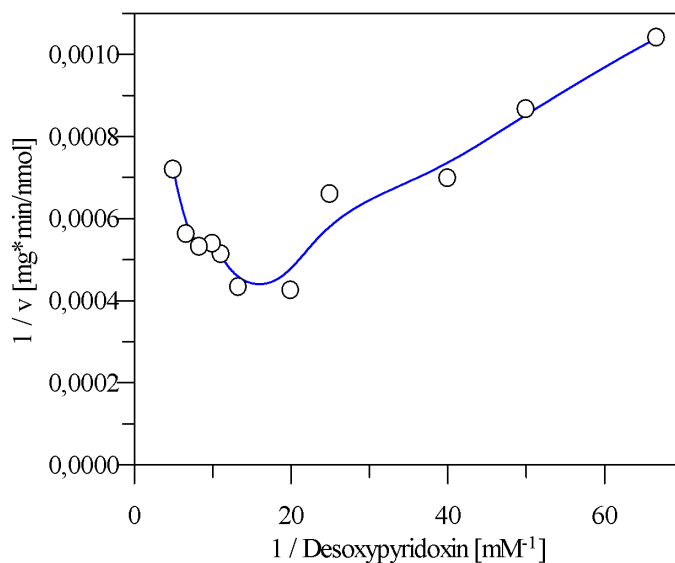


Abbildung 3.83

Doppel-reziproke Darstellung der Substrathemmung für Desoxypyridoxin

Abbildung 3.82 und 3.83 zeigen, dass das Substrat Desoxypyridoxin die Pyridoxal-Kinase in Konzentrationen größer als 0,05 mM hemmt. Bis zu einer Substratkonzentration von 0,05 mM steigt die Reaktionsgeschwindigkeit der Pyridoxal-Kinase mit steigender Desoxypyridoxin-Konzentration an. Bei Substratkonzentrationen größer als 0,05 mM sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von Desoxypyridoxin durch die Pyridoxal-Kinase. Ist die Substratkonzentration ausreichend hoch, wird die menschliche Pyridoxal-Kinase von allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substraten gehemmt.

3.5 Untersuchung der Struktur der Pyridoxal-Kinase

3.5.1 *HYDROPHOBIZITÄTS-PLOT DER PYRIDOXAL-KINASE*

Der Hydrophobizitäts-Plot der menschlichen Pyridoxal-Kinase ist in der Darstellung nach Kyte und Doolittle (1982) in Abbildung 3.84 graphisch abgebildet. Er zeigt die Verteilung polarer und apolarer Aminosäuren entlang der Proteinsequenz (Kapitel 2.6.7). Der Hydrophobizitäts-Plot wurde mit dem Programm Protean (Lasergene, DNASTAR, London, UK) erstellt.

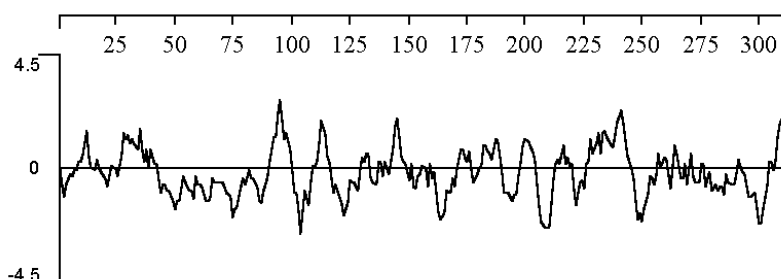


Abbildung 3.84 Hydrophobizitäts-Plot der menschlichen Pyridoxal-Kinase nach Kyte und Doolittle (1982).

3.5.2 *RÄUMLICHE STRUKTUR DER PYRIDOXAL-KINASE*

Die Substratbindetasche der menschlichen Pyridoxal-Kinase wurde hinsichtlich ihrer hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften untersucht. Die Substratbindetasche wurde mit Hilfe des Computerprogramms MOE™ (Molecular Operating Environment; Chemical Computing Group Inc.; Montreal, Canada, 2003) in Zusammenarbeit mit Professor Dr. Michael Wiese und Christian Hallmen, Universität Bonn, dargestellt. Um die Substratbindetasche untersuchen zu können, musste zunächst die räumliche Struktur der gesamten menschlichen Pyridoxal-Kinase ermittelt werden.

Bisher wurde nur die aus dem Schaf isolierte Pyridoxal-Kinase kristallisiert (Li et al.,

2002; 2004). Diese in Anwesenheit von Pyridoxal-5'-phosphat und ADP kristallisierte Pyridoxal-Kinase aus dem Schaf (RCSB Protein Data Bank: *IRFU*) wurde für ein Strukturalignment mit der menschlichen Pyridoxal-Kinase genutzt. Die daraus abgeleitete Struktur der Pyridoxal-Kinase vom Menschen ist in Abbildung 3.85 dargestellt.

In Abbildung 3.86 ist diese noch mal nach einem anderen Modell dargestellt (Homology Modelling) und zeigt Bereiche mit helikaler und β -Faltblattstruktur (Kopp und Schwede, 2004).

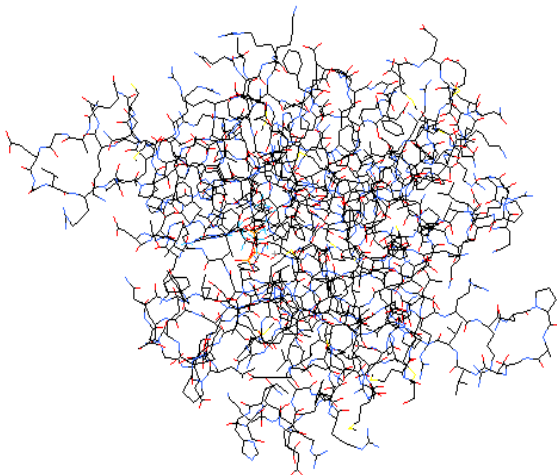


Abbildung 3.85
Räumliche Darstellung der menschlichen Pyridoxal-Kinase, Homologie Modelling, Christian Hallmen, Universität Bonn



Abbildung 3.86
Räumliche Darstellung der Pyridoxal-Kinase (SWISS-MODEL Repository)

3.5.3 *DARSTELLUNG DER SUBSTRATBINDETASCHE DER PYRIDOXAL-KINASE*

Die Substratbindetasche der Pyridoxal-Kinase wurde hinsichtlich ihrer Hydrophobizität untersucht. Mit dieser Analyse sollte überprüft werden, ob Ginkgotoxin aufgrund seiner Struktur besser mit der Pyridoxal-Kinase interagieren kann als Pyridoxal.

Aus der Kristallstruktur der Pyridoxal-Kinase vom Schaf mit ADP und Pyridoxal-5'-phosphat wurden die Aminosäuren ermittelt, die die Oberfläche der Substratbindetasche bilden. Anhand der Substratbindetasche der Pyridoxal-Kinase vom Schaf und der ermittelten räumlichen Struktur der menschlichen Pyridoxal-Kinase wurden die Aminosäuren bestimmt, die die Substratbindetasche der menschlichen Pyridoxal-Kinase bilden. Die Oberfläche der Substratbindetasche der menschlichen Pyridoxal-Kinase wurde hinsichtlich der Hydrophobizität der beteiligten Aminosäuren in Abbildung 3.87 graphisch dargestellt. Hydrophile Bereiche der Substratbindetasche sind blau, stark hydrophobe Bereiche sind braun und leicht hydrophobe Bereiche sind grün dargestellt.

Es wurde die Substratbindetasche mit Pyridoxin-5'-phosphat, Ginkgotoxin-5'-phosphat und

ADP dargestellt. Pyridoxin-5'-phosphat wurde für die Darstellung gewählt, da es sich von Ginkgotoxin-5'-phosphat nur durch die fehlende Methylgruppe in Position 4' unterscheidet (Abbildung 1.1). Es ist erkennbar, dass der Bereich, an dem die Phosphatgruppe bindet, hydrophil und der Bereich, an dem die Hydroxylgruppe beziehungsweise die Methoxygruppe bindet, hydrophob ist.

Je hydrophober das Substrat in der 4'-Position ist, desto besser sollte das Substrat binden, desto höher sollte die Affinität des Substrates zur Pyridoxal-Kinase und umso kleiner sollte der K_m -Wert sein. Dies wird durch die ermittelten K_m -Werte für Pyridoxal und Ginkgotoxin am menschlichen Enzym bestätigt (Tabelle 3.4).

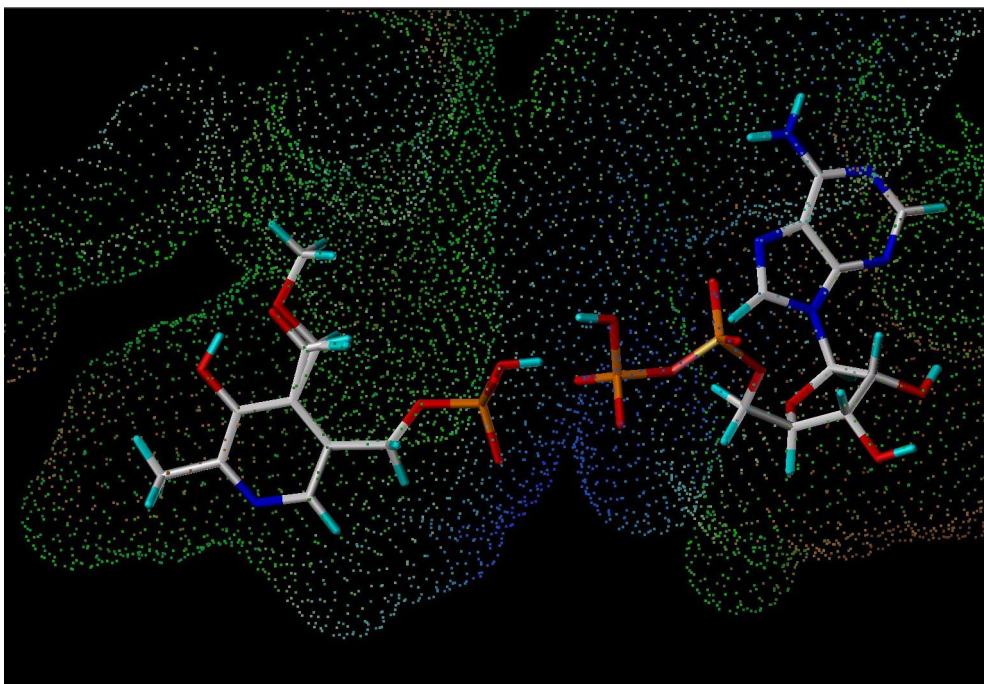


Abbildung 3.87 Computermodell der Substratbindetasche der menschlichen Pyridoxal-Kinase mit den gebildeten Produkten Pyridoxin-5'-phosphat/Ginkgotoxin-5'-phosphat (links) und ADP (rechts) (Christian Hallmen, Universität Bonn)

Die hydrophobere Methoxygruppe des Ginkgotoxins in Position 4' im Vergleich zur Aldehydgruppe des Pyridoxals führt dazu, dass Ginkgotoxin aufgrund der hydrophoben Bindungstasche besser an die Pyridoxal-Kinase bindet als Pyridoxal.

4 Diskussion

4.1 Konvulsive Wirkung von Ginkgotoxin und mögliche konvulsive Nebenwirkungen von *Ginkgo biloba* L.-Extrakten

Granger (2001) publizierte zwei Einzelfallberichte, bei denen es nach Einnahme von *Ginkgo biloba* L.-Präparaten zu generalisierten tonisch-klonischen Anfällen beziehungsweise zum Status epilepticus kam. Im ersten Fall handelte es sich um einen 78-jährigen Mann, der seit 18 Monaten anfallsfrei war. Er wurde mit 120 mg *Ginkgo biloba* L.-Tabletten täglich behandelt. Zwei Wochen nach Behandlungsbeginn traten Krampfanfälle auf. Daraufhin wurde das *Ginkgo biloba* L.-Präparat abgesetzt. Während der nächsten 8 Monate (Beobachtungszeitraum) kam es zu keinen weiteren epileptischen Anfällen. Im zweiten Fall handelte es sich um eine 84-jährige Frau, die nach 12-tägiger Einnahme eines *Ginkgo biloba* L.-Präparates (120 mg, täglich) im Status epilepticus in die Klinik eingeliefert wurde. Nach Behandlung mit Diazepam kam es innerhalb der nächsten 48 Stunden noch dreimal zu epileptischen Anfällen. Nach dem Absetzen des *Ginkgo biloba* L.-Präparates traten während der nächsten 4 Monate (Beobachtungszeitraum) keine weiteren epileptischen Anfällen auf.

Granger vermutet, dass die *Ginkgo biloba* L.-Präparate zu den epileptischen Anfällen geführt haben. In der Publikation wird weder erwähnt, um welche Präparate es sich handelt, noch wie diese zusammengesetzt sind. Der Ausschluss einer Überdosierung und möglicher Wechselwirkungen durch weitere Inhaltsstoffe der Präparate ist daher nicht möglich. Eine Ursache für epileptische Anfälle nach Einnahme von *Ginkgo biloba* L.-Präparaten könnte das in den Medikamenten nachgewiesene Ginkgotoxin (Arenz et al., 1996; Scott et al., 2000; Lawrence und Scott, 2005) sein, das bei Tieren Krampfanfälle auslöst (Mizuno et al., 1980; Wada et al., 1985 und 1988). In Tabelle 4.1 sind die von Arenz et al. in Arzneimitteln ermittelten Ginkgotoxingehalte aufgeführt. Spalte 4 weist die mit der maximalen Tagesdosis eingenommenen Ginkgotoxin-Mengen aus und Spalte 5 die daraus resultierenden ungefähren Plasmaspiegel. Der geringere Wert bezieht sich auf ein Blutvolumen von 6 L und der höhere Wert auf ein Blutvolumen von 4 L. Tabelle 4.2 gibt an, welche Anzahl der Tagesmaximaldosen eingenommen werden müssen, um die bei Krampfanfällen nach übermäßigem Verzehr von Ginkgosamen bestimmten Ginkgotoxin-Plasmaspiegel zu erreichen. Bei dieser Berechnung wurde vereinfachend angenommen, dass sich Ginkgotoxin nur im Plasma verteilt. Der Plasmaspiegel von 1,28 µg Ginkgotoxin pro ml wurde in einer Probe 4 Stunden nach Verzehr der Ginkgosamen gemessen (Hori et al., 2004). Um den niedrigsten (0,24 µg/ml) während eines Krampfanfalles beim Menschen

gemessenen Plasmaspiegel zu erreichen, müsste mindestens die 20fache Tagesmaximaldosis Tebonin[®] forte eingenommen werden. Dieser Plasmaspiegel wurde bei einer 38-jährigen Frau 12 Stunden nach dem Verzehr von 60 Ginkgosamen bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt traten bei ihr Krämpfe auf.

Präparat	Konzentration Ginkgotoxin (µg/ml)	Empfohlene Dosierung	maximale Aufnahme von Ginkgotoxin (µg)	Konzentration im Blut nach Einnahme der maximalen Tagesdosis BV 4–6 L, µg/L)
Tebonin [®] forte	8,13	3x täglich 1–2 ml	48,78	8,13–12,20
Rökan [®]	9,77	3x täglich 1–2 ml	58,62	9,77–14,70
Kaveri [®] forte	3,80	3x 1 ml	11,40	1,9–2,85
Gingium [®]	7,18	3x täglich 1–2 ml	43,08	7,18–10,77

Tabelle 4.1 Ginkgotoxin-Konzentration in Arzneimitteln

Von Arenz et al. (1996) erhobene Daten der untersuchten *Ginkgo biloba* L.-Präparate. Angegeben sind die Ginkgotoxin-Konzentrationen der Zubereitungen, die empfohlene Dosierung und die mit der maximalen Tagesdosis aufgenommenen Ginkgotoxin-Mengen.

	Ginkgotoxin-Konzentrationen bei Vergiftungen		Anzahl der Tagesdosen Tebonin forte [®] zum Erreichung der bei Vergiftungen bestimmten Ginkgotoxin-Konzentrationen (BV 4–6 L)	
	µg/ml	µM		
Minimum	0,24	1,31	19,7	29,5
Maximum	1,28	6,99	105	157

Tabelle 4.2 Tagesdosen Tebonin[®] forte zum Erreichen toxischer Ginkgotoxin-Plasmaspiegel
Der linke Teil der Tabelle gibt die von Horii et al. (2004) bestimmten Ginkgotoxin-Konzentrationen im Plasma an. Angegeben ist sowohl die höchste als auch die niedrigste bei einem Krampfanfall gemessene Ginkgotoxin-Konzentration. Der rechte Teil der Tabelle gibt an, wie viele Tagesdosen Tebonin[®] forte eingenommen werden müssen, um die nach einer Vergiftung mit Ginkgosamen im Plasma gemessene Ginkgotoxin-Konzentration zu erreichen. Die Anzahl der Tagesdosen sind für 4 und 6 L Blutvolumen angegeben.

Neben dem Ginkgotoxin könnten auch die in *Ginkgo biloba* L.-Extrakten enthaltenen Ginkgolide und Bilobalid zu den epileptischen Krampfanfällen geführt haben, da diese antagonistisch am rekombinanten humanen $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA_A-Rezeptor wirken (Ivic et al., 2003; Huang et al., 2004 und 2003). Die Hypothese, dass die *Ginkgo biloba* L.-haltigen Präparate zu den epileptischen Anfällen geführt haben, wird weiter durch die Untersuchungen von Anshu et al. (1996) unterstützt. Deren Versuche ergaben, dass *Ginkgo biloba* L.-Extrakte die Wirkung von Natriumvalproat mindern können, bei durch Picrotoxin und Strychnin ausgelösten Krampfanfällen. Die beiden beschriebenen Epileptiker wurden mit Natriumvalproat behandelt. Die Behandlung mit *Ginkgo biloba* L.-Präparaten könnte daher die Wirkung von Natriumvalproat vermindert haben. Die möglicherweise epileptogene Wirkung der *Ginkgo biloba* L.-Extrakte könnte durch einen additiven Effekt aller in *Ginkgo biloba* L.-Präparaten vorkommenden konvulsiv wirkenden Substanzen hervorgerufen werden. Andererseits wird dem in den Extrakten enthaltenen Bilobalid auch eine antikonvulsive Wirkung zugeschrieben (Sasaki et al., 1997 und 1995).

Präparate aus *Ginkgo biloba* L. gehören zu den meistverkauften Phytopharmaka. Außer den beiden genannten Fällen, von möglicherweise durch *Ginkgo biloba* L.-Präparaten hervorgerufenen epileptischen Anfällen, findet sich kein weiterer Fall in Literaturdatenbanken. In Anbetracht der Häufigkeit der Einnahme von *Ginkgo biloba* L.-Präparaten ist die Fallzahl zu gering, um einen direkten Zusammenhang zwischen der Einnahme von *Ginkgo biloba* L.-haltigen Präparaten und dem Auftreten epileptischer Anfälle herzustellen. Trotzdem sollte diese mögliche Nebenwirkung in den Packungsbeilagen erwähnt werden und bis zum Ausschluss eines Zusammenhanges sollten Präparate aus *Ginkgo biloba* L. bei Epileptikern nur mit Vorsicht angewendet werden (Granger, 2001; Gregory, 2001).

Die Fallbeschreibungen sind im Zusammenhang mit den beschriebenen Wirkungen von Ginkgotoxin Anlass, den möglichen Zusammenhang zwischen epileptischen Anfällen und der Einnahme *Ginkgo biloba* L.-haltiger Präparate näher zu untersuchen.

4.2 Zusammenhang zwischen dem Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat, GABA, Glutamat und dem Auftreten von epileptischen Anfällen

Pyridoxal-5'-phosphat ist Cofaktor vieler Enzyme des Aminosäure- und Neurotransmittermetabolismus im Gehirn. Die Entfernung des Cofaktors vom Enzym hat einen großen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms (Tunnicliff und Ngo, 1998). Pyridoxal-5'-phosphat ist unter anderem an der Bildung und dem Metabolismus des inhibitorischen Neurotransmitters GABA beteiligt.

GABA wird hauptsächlich durch die Glutamat-Decarboxylase aus dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat gebildet. In einem Schritt wird aus dem stärksten exzitatorischen Neurotransmitter der stärkste inhibitorische Neurotransmitter gebildet. Die Glutamat-Decarboxylase existiert beim Menschen in zwei Isoformen, der GAD_{65kDa} und der GAD_{67kDa} (Bu et al., 1992; Buss et al., 2001; Battaglioli et al., 2003). Die beiden Glutamat-Decarboxylasen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften (Molekulargewicht, posttranslationale Modifikationen, pH-Optimum, Temperatur-Optimum), ihrer Lokalisation und der Sättigung mit dem Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat (Chen et al., 2003). Die GAD_{65kDa} kommt hauptsächlich in den Nervenendigungen vor und kontrolliert die lokale und akute GABA-Bildung in den Synapsen. Sie ist verantwortlich für die schnelle bedarfsgerechte Nerven-Inhibierung und ist reversibel mit der Membran der synaptischen Vesikel verbunden. Die GAD_{65kDa} liegt hauptsächlich als Apoenzym (~93 %) vor (Battaglioli et al., 2003; Chen et al., 2003). Damit die GAD_{65kDa} katalytisch aktiv ist, muss diese erst den Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat unter Bildung des Holoenzym binden. Ihre Aktivität ist daher stärker von der Verfügbarkeit des Cofaktors

abhängig als die Aktivität der GAD_{67kDa} (Martin und Rimvall, 1993; Chen et al., 2003). So dokumentierte Buss (2000), dass die Aktivität der GAD_{65kDa} in Abwesenheit von Pyridoxal-5'-phosphat sehr gering ist. Die GAD_{65kDa} reagiert empfindlich auf Änderungen der Cofaktorkonzentration. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen von Buss et al. (2001) wieder, die eine stärkere Beeinflussung der GAD_{65kDa} als der GAD_{67kDa} durch Ginkgotoxin-5'-phosphat beobachteten. Bei der GAD_{65kDa} konkurriert Ginkgotoxin-5'-phosphat mit weniger Pyridoxal-5'-phosphat um die Cofaktorbindestelle. Es muss nur wenig Cofaktor von der GAD_{65kDa} verdrängen. Die Anwesenheit eines Inhibitors, der den Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat aus der Bindung verdrängt, wirkt sich also wesentlich stärker bei der GAD_{65kDa} aus als bei der GAD_{67kDa}.

Die GAD_{67kDa} ist vorrangig im Zytosol der Zellkörper lokalisiert und liegt zum überwiegenden Teil als Holoenzym (~ 72 %) vor (Battaglioli et al., 2003; Chen et al., 2003). Einerseits ist sie am Metabolismus und der daraus resultierenden Energiebereitstellung beteiligt und andererseits an der Aufrechterhaltung des GABA-Basalspiegels (Kash et al., 1997; Kelly und Stanley, 2001). Eine Hemmung der Glutamat-Decarboxylase führt zu erniedrigten GABA-Spiegeln und damit zu einem Ungleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission, was zu epileptischen Krampfanfällen führen kann (Tunncliffe und Ngo, 1998).

Warum Krampfanfälle beginnen und enden, ist weitgehend unklar. Es ist wahrscheinlich, dass die Auslösung von epileptischen Anfällen durch ein Ungleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission ausgelöst wird. Welches wiederum zur Initiation von anormalen neuronalen Impulsen führt (Scott et al., 1998).

Durch einen gezielten Eingriff ins GABAerge System lassen sich Krampfanfälle auch auslösen. Dies gelingt durch Minderung der GABAergen Hemmung, durch Interaktion mit einer Modulationsstelle am GABA_A-Rezeptor (zum Beispiel Picrotoxin, Pentetrazol), kompetitive Antagonisten am GABA_A-Rezeptor (zum Beispiel Bicucullin) oder kompetitive Antagonisten am Glycin-Rezeptor (zum Beispiel Strychnin) (Forth et al., 1996). Durch Applikation von Arzneistoffen, die den GABA-Spiegel senken oder durch lokale Infusion von Glutamat in den Hippokampus können bei Tieren Krampfanfälle herbeigeführt werden (Sasaki et al., 2000). Ein Auslösen von epileptischen Anfällen ist auch durch elektrische Stimulation des Gehirns möglich (Snodgrass, 1992). Experimentelle Ergebnisse und klinische Studien haben gezeigt, dass das GABAerge System eine wichtige Rolle bei dem biochemischen Mechanismus und bei der Behandlung von epileptischen Anfällen spielt (Treimann, 2001).

Zu Beginn eines Anfalls steigt die Konzentration exzitatorischer Neurotransmitter und die Konzentration inhibitorischer Neurotransmitter sinkt. Dies wurde *in vivo* durch

intracerebrale Mikrodialyse gezeigt (During und Spencer, 1993; Haglit et al., 1994; Scott et al., 1998). Zum Zeitpunkt des Anfalls ist die Glutamat-Konzentration signifikant erhöht und die GABA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt (During und Spencer, 1993). Die Konzentration inhibitorischer Neurotransmitter wie GABA steigt nach einem Anfall in der betroffenen Hirnregion wieder an und stellt die Balance zwischen Exzitation und Inhibition wieder her (During und Spencer, 1993; Scott et al., 1998).

Haglit et al. (1994) untersuchten Proben von 48 therapieresistenten Epileptikern, bei denen ein operativer Eingriff zur Entfernung des epileptogenen Herdes durchgeführt wurde. Sie stellten fest, dass die Glutamat-Konzentration im Vergleich zu Nichtepileptikern erhöht war. Sie folgerten, dass exzitatorisch wirkende Aminosäuren an der Entwicklung von epileptischen Anfällen beteiligt sind. Carlson et al. (1992), die während eines chirurgischen Eingriffs zur Behandlung der Epilepsie die Extrazellulärflüssigkeit untersuchten, beobachteten erhöhte Glutamat- und Aspartat-Konzentrationen und einen erniedrigten Glycin-Spiegel während des Status epilepticus.

Wie wichtig die Funktion der Glutamat-Decarboxylase ist, verdeutlichten Kash et al. (1997) mit ihrer Arbeit an homozygoten $GAD65^{-/-}$ -Mäusen. Diese Mangelmutanten, denen die GAD_{65kDa} fehlte, entwickelten nach ihrer Geburt häufiger spontane Krampfanfälle. Gleichzeitig war die Mortalität der Mäuse erhöht.

Neben der GABA-Konzentration hat auch der Cofaktor der GABA-Bildung, Pyridoxal-5'-phosphat, einen entscheidenden Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit. Dies zeigt sich deutlich bei der Pyridoxin-abhängigen Epilepsie, einer Sonderform der Epilepsie. Die Betroffenen sprechen nur auf eine Behandlung mit pharmakologischen Dosen Pyridoxin (0,2–30 mg/kg) an. Die Erscheinungsform der Krampfanfälle variiert. Es können partielle, generalisierte, atonische, myoklonale oder tonisch-klonische Krampfanfälle auftreten. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist noch nicht geklärt, aber eine Veränderung der GABA-Synthese wird vermutet. So beobachteten Gospe et al. (1994) eine im Vergleich zur Kontrolle erniedrigte GABA-Bildung in Fibroblasten von Patienten, die an Pyridoxin-abhängiger Epilepsie litten. Eine Verminderung der GABA-Synthese könnte auch durch Veränderungen der Pyridoxal-5'-phosphat-Bindung an die Glutamat-Decarboxylase hervorgerufen werden. Durch ein erhöhtes Angebot an Pyridoxal-5'-phosphat könnte die verminderte Bindung überwunden und das Ungleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition ausgeglichen werden (Gospe, 2002). Bestätigt wurde diese Hypothese durch das Ansprechen der betroffenen Patienten auf eine hohe Dosis Pyridoxin, das in den Zellen und im Gehirn zum Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat phosphoryliert wird. Der Hypothese spricht allerdings entgegen, dass Mutationen der beiden Glutamat-Decarboxylase-Isoformen nicht nachgewiesen werden konnten. Somit scheinen Veränderungen der

Bindung von Pyridoxal-5'-phosphat an die Glutamat-Decarboxylase nicht die Ursache der Pyridoxin-abhängigen Epilepsie zu sein. Weiterhin wird diskutiert, dass der Vitamin B₆-Transport der betroffenen Patienten verändert ist (Gospe, 2002; Said et al., 2003). Ein verminderter Transport von Vitamin B₆ ins Zentralnervensystem könnte die Ursache für erniedrigte GABA- und erhöhte Glutamat-Spiegel und als deren Folge eine erhöhte Krampfanfälligkeit sein. Für die Transporthypothese sprechen die erniedrigten Pyridoxal-5'-phosphat-Spiegel bei Epileptikern (Gospe, 2002; Schulze-Bonhage et al., 2004).

Bisher wurde ein Transportprotein nur für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Stolz und Vielreicher, 2003). Tpn1p (transport of pyridoxine-1) wurde als das für den Vitamin B₆ Transport verantwortliche Protein identifiziert. Die Deletion des Gens führte zu einer deutlichen Verminderung der Pyridoxinaufnahme in die Zellen. Ein Vitamin B₆-Transporter wurde beim Menschen noch nicht endgültig identifiziert (Gospe, 2002). Said et al. (2003) beobachteten allerdings, dass die Aufnahme von Vitamin B₆ in menschliche epitheliale Caco-2 Zellen pH-abhängig ist und wahrscheinlich durch intrazelluläre Proteinkinase A reguliert wird. Sie vermuten daher die Beteiligung eines speziellen carriervermittelten Prozesses an der Aufnahme von Vitamin B₆ durch menschliche intestinale epitheliale Caco-2 Zellen.

Da verminderte Pyridoxal-5'-phosphat-Spiegel zu Krampfanfällen führen können, bei Epileptikern verminderte Pyridoxal-5'-phosphat-Spiegel bestimmt wurden, eine veränderte Bindung von Pyridoxal-5'-phosphat an die Glutamat-Decarboxylase nicht bestätigt werden konnten, wird eine verminderter Transport von Vitamin B₆ bei Epileptikern vermutet (Gospe, 2002). So beschrieben Schulze-Bonhage et al. (2004), dass bei einer Patientin, die in ihrer Kindheit an Pyridoxin-abhängiger Epilepsie litt, während der Schwangerschaft erneut epileptische Anfälle auftraten. Sie stellten fest, dass der Pyridoxal-5'-phosphat-Spiegel dieser Patientin erniedrigt war (2,96 ng/ml, normal: 4,3–17,5 ng/ml). Bernstein (1990) berichtet über einen Patienten, der aufgrund einer Überdosis Isoniazid Krampfanfälle entwickelte. Isoniazid reagiert mit Pyridoxal und Pyridoxal-5'-phosphat unter Hydrazon-Bildung. Dabei sinkt die Konzentration an Pyridoxal und Pyridoxal-5'-phosphat. Das gebildete Hydrazon ist gleichzeitig ein potenter Hemmer der Pyridoxal-Kinase.

Ein weiteres Indiz für die Beteiligung von Vitamin B₆-Mangel an der Entwicklung von Krampfanfällen lieferten Gachon et al. (2004). Sie züchteten knock-out-Mäuse, denen die Proteine *DBP* (albumin D-site-binding protein), *HLF* (hepatic leukemia factor) und *TRF* (thyrotroph embryonic factor) fehlten. Diese Mäuse erlitten häufiger spontane generalisierte oder durch Audioreize ausgelöste Krampfanfälle, die zum Teil tödlich waren. Gachon et al. fanden heraus, dass bei diesen Mäusen die mRNA-Spiegel von *PdxK* im

Gehirn und als Folge davon die Pyridoxal-5'-phosphat-Spiegel erniedrigt waren. Gleichzeitig waren die Serotonin- und Dopamin-Spiegel verringert und der Histamin-Spiegel erhöht. Dass verminderte Pyridoxal-5'-phosphat-Spiegel Krampfanfälle bei verschiedenen Spezies auslösen, zeigten unter anderem Horton et al. (1979). Sie verabreichten Ratten intraperitoneal Thiosemicarbazon, Methyldithiocarbazon oder Isoniazid. Mit allen drei Substanzen entwickelten 85 % der Versuchstiere myoklonische Krämpfe, dabei waren die Konzentrationen von GABA und Pyridoxal-5'-phosphat in allen untersuchten Gehirnregionen reduziert.

Die dargelegten Ergebnisse verschiedener Versuche zeigen, dass mehrere Faktoren an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen neuronaler Hemmung und Erregung beteiligt sind.

4.2.1 MÖGLICHE ANGRIFFSPUNKTE VON GINKGOTOXIN UND GINKGO BILOBA L.-EXTRAKTEN

Die Beeinflussung des Gleichgewichtes zwischen neuronaler Hemmung und Erregung kann zur Begünstigung oder Auslösung von Krampfanfällen führen. Faktoren, die eine Auslösung von Krampfanfällen begünstigen, sind im Folgenden aufgeführt:

- erhöhte Konzentrationen von exzitatorischen Neurotransmittern,
- erniedrigte Konzentrationen von inhibitorischen Neurotransmittern,
- verminderte GABAerge Hemmung und
- verstärkte glutaminerge Erregung.

Die GABA-Bildung kann direkt durch Hemmung der Glutamat-Decarboxylase, durch verringerte Expression der Glutamat-Decarboxylase oder indirekt durch Senkung der Pyridoxal-5'-Konzentration verringert werden. Die Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration kann durch verringerte Expression oder Hemmung der Pyridoxal-Kinase, Pyridoxinphosphat-Oxidase und Pyridoxal-Phosphatase gesenkt werden.

Ginkgotoxin senkt nach intravenöser Applikation bei Kaninchen die GABA-Konzentration in verschiedenen Hirnregionen, mindert die Aktivität der Glutamat-Decarboxylase und kann Krampfanfälle auslösen (Nitsch und Okada, 1976; Mizuno et al., 1980; Nitsch, 1980; Haug und Nitsch, 1982; Yanai et al., 1990; Wada und Haga, 1997). Die Hemmung der Glutamat-Decarboxylase führt zu verminderten GABA-Spiegeln und so zu einer geringeren neuronalen Hemmung. Dies begünstigt das Auftreten von epileptischen Krämpfen und führte zu der Hypothese, dass das GABA bildende Enzym, die Glutamat-Decarboxylase, durch Ginkgotoxin gehemmt wird. Die direkte Beeinflussung der Glutamat-Decarboxylase war bereits durch Buss et al. (2001) untersucht und als alleinige Ursache für die durch Ginkgotoxin ausgelösten Vergiftungen ausgeschlossen worden.

4.3 Pyridoxal-Kinase

Das Ansprechen auf Behandlung mit Vitamin B₆ bei durch Ginkgotoxin ausgelösten Krampfanfällen (Fujisawa et al., 2002; Kajiyama et al., 2002; Shannon et al., 2003), die Strukturverwandschaft von Ginkgotoxin und Vitamin B₆ und die Beteiligung von Vitamin B₆ an der GABA-Bildung deuten auf eine Beeinflussung der Vitamin B₆-Homöostase durch Ginkgotoxin hin. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Ginkgotoxin auf die menschliche Pyridoxal-Kinase untersucht, da dieses Enzym den aktiven Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat (Abbildung 1.2) der Glutamat-Decarboxylase bereitstellt. Die Phosphorylierung der mit der Nahrung aufgenommenen Vorstufen Pyridoxal, Pyridoxin und Pyridoxamin wird durch die Pyridoxal-Kinase katalysiert. Eine Pyridoxal-Kinase wurde bei verschiedenen Säugern (Kwok and Churchich, 1979; Cash et al., 1980; Tagaya et al., 1989; Hanna et al., 1997; Lee et al., 2000), bei Protozoen (Scott und Phillips 1997; Wrenger et al., 2005), in Bakterien (Yang et al., 1996; Yang et al., 1998) und Pflanzen (Lum et al., 2002) nachgewiesen. Zielstellung dieser Arbeit war die Prüfung der Hypothese, dass Ginkgotoxin über eine Hemmung der Pyridoxal-Kinase die Auslösung von Krampfanfällen induzieren kann.

4.3.1 DIE PYRIDOXAL-KINASE DES MENSCHEN

Das für die menschliche Pyridoxal-Kinase codierende Gen (GenBank™ accession number: O00764) ist auf Chromosom 21q22.3 lokalisiert (Hanna et al., 1997; Hattori et al., 2000). Der Leserahmen enthält 960 bp und codiert für ein Protein aus 312 Aminosäuren. Die berechnete Molekülmasse beträgt 35,1 kDa und der isoelektrische Punkt ist 5,93. Die genomische Sequenz der Pyridoxal-Kinase ist auf 11 Exons verteilt und wird durch 10 Introns unterbrochen (GenBank™ accession number: AP001752).

Die entsprechende DNA wurde von Hanna et al. (1997) identifiziert und sequenziert. Die menschliche Pyridoxal-Kinase weist eine hohe Homologie (27 % Identität der Aminosäuren) zur Pyridoxal-Kinase *PdxK* aus *Escherichia coli* auf. Die bakterielle Pyridoxal-Kinase *PdxK* akzeptiert Pyridoxin, Pyridoxamin und Pyridoxal als Substrat (Abbildung 1.2, Yang et al., 1996). Daneben existiert in *Escherichia coli* noch eine weitere Pyridoxal-Kinase *PdxY* (Yang et al., 1998). Sie akzeptiert nur Pyridoxal als Substrat (Abbildung 1.2). Die Pyridoxal-Kinasen sind wichtige Enzyme des "Salvage Pathway" des Vitamin B₆-Metabolismus aller Organismen. Sie katalysieren ATP-abhängig die Bildung der 5'-Phosphatester aus Pyridoxal, Pyridoxin und Pyridoxamin.

Hanna et al. (1997) untersuchten die Expression des für die Pyridoxal-Kinase codierenden

Gens in menschlichen Geweben. Sie konnten die mRNA in allen untersuchten Geweben nachweisen (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Nieren, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Testis, Ovarium, Dünndarm, Colon und Leukozyten). Pyridoxal-5'-phosphat kann die Zellmembran nicht überwinden. Vor Aufnahme in eine Zelle muss zirkulierendes Pyridoxal-5'-phosphat dephosphoryliert und nach Diffusion durch die Zellmembran wieder durch die Pyridoxal-Kinase zum aktiven Cofaktor phosphoryliert werden. Daher ist ein ubiquitäres Vorkommen der Pyridoxal-Kinase im Körper notwendig. Die Pyridoxal-Kinase ist im Zytoplasma lokalisiert und liegt als Dimer vor (Kerry et al., 1986; Kwok et al., 1987; Arnone et al., 1989; Dominici et al., 1989; Tagaya et al., 1989; Churchich und Kim, 1990; Hirakawa-Sakurai et al., 1993; Scott und Phillips, 1997; Lum et al., 2002; Wrenger et al., 2005). Li et al. (2004) kristallisierten die Pyridoxal-Kinase aus dem Gehirn vom Schaf und untersuchten die Bindung von Vitamin B₆. Die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren sind Ser-12 (Wasserstoffbrückenbindung mit N₁ des Substrates), Thr-47 (Wasserstoffbrückenbindung mit O₃ des Substrates) und Asp-235 (Wasserstoffbrückenbindung mit O₅ des Substrates). Val-19 und Tyr-84 interagieren mit den beiden Seiten des Pyridinringes. Die Phosphatgruppe des Reaktionsproduktes interagiert mit den Aminosäuren Thr-127, Gly-232, Thr-233, Gly-234 und Asp-235. Die mit ATP interagierenden Aminosäuren sind Thr-186, Ser-187, Asn-150, Glu-153, Asp-113, Asp-118, Tyr-127 und Thr-148. Die angegebenen Aminosäuren finden sich bei der menschlichen Pyridoxal-Kinase an der gleichen Position. Neben der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ubiquitär im Menschen vorkommenden Pyridoxal-Kinase (Isoform I) kommen noch zwei weitere potentielle Splice-Varianten, Isoformen II und III vor (Abbildung 4.1).

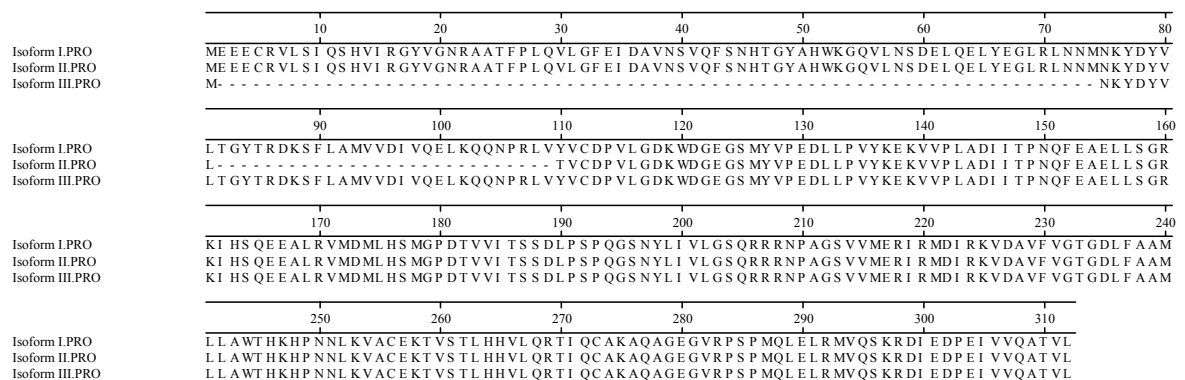


Abbildung 4.1 Aminosäurevergleich der drei beim Menschen gefundenen Isoformen der Pyridoxal-Kinase.

Isoform I ist die von Hanna et al. (1997) klonierte und im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte DNA. Die Isoformen I und II wurden im Rahmen des Mammalian Gene Collection (MGC) Programms identifiziert (Hattori et al. 2000; Strausberg et al., 2002). Isoform III wurde von Fang et al. (2004) veröffentlicht. Die mRNA konnte in Testis nachgewiesen werden, nicht aber in Herz, Gehirn, Lunge, Plazenta, Leber, Skelettmuskulatur, Nieren, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Ovarium, Dünndarm, Colon und Leukozyten.

Isoform II wurde im Rahmen des *Mammalian Gene Collection Program* sequenziert (Hattori et al., 2000; Strausberg et al., 2002). Isoform III wurde von Fang et al. (2004) in den Testis, aber nicht in den anderen untersuchten Organen, auch nicht im Gehirn nachgewiesen.

Die von Fang et al. gefundene DNA codiert für 239 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 26,8 kDa. Im Vergleich zur untersuchten Pyridoxal-Kinase fehlen die ersten 73 Aminosäuren. Daher vermuten Fang et al., dass es sich um eine neue Splice-Variante der schon bekannten menschlichen Pyridoxal-Kinase handelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Isoform I gearbeitet. Diese kommt ubiquitär vor und wird unter anderem im Gehirn exprimiert (Hanna et al., 1997; Jang et al., 2003; Kang et al., 2004).

4.3.2 HETEROLOGE EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG DER PYRIDOXAL-KINASE

4.3.2.1 Expression als Maltose-bindendes Fusionsprotein

Die menschliche Pyridoxal-Kinase konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich als Maltose-bindendes Fusionsprotein heterolog überexprimiert werden. Eine partielle Aufreinigung gelang mit Affinitätschromatographie (Abbildung 3.4 und 3.19). Das Proteingel zeigt, dass eine vollständige Reinigung der erhaltenen Pyridoxal-Kinase nicht möglich war. Es sind mehrere Proteine mit höherem als auch niedrigerem Molekulargewicht enthalten. Für die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurde der zellfreie Proteinrohextrakt des Fusionsproteins eingesetzt. Diese Parameter sind in Tabelle 4.3 angegeben.

	K_m [M]	V_{max} [mol/mg*min ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [s ⁻¹ *mol ⁻¹]
Fusionsprotein	$3,92 \times 10^{-3}$	$4,63 \times 10^{-9}$	$2,71 \times 10^{-3}$	$6,91 \times 10^{-1}$
natives Protein	$4,91 \times 10^{-5}$	$6,01 \times 10^{-8}$	$3,52 \times 10^{-2}$	$7,16 \times 10^2$

Tabelle 4.3 Vergleich der enzymkinetischen Parameter des Fusionsproteins mit denen des nativen Enzym

In Tabelle 4.1 sind die enzymkinetischen Parameter des Maltose-bindenden Fusionsproteins und die entsprechenden Daten des nativen Proteins angegeben. Untersucht wurde die Umsetzung von Pyridoxal zu Pyridoxal-5'-phosphat. Der K_m -Wert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurden photometrisch im zellfreien Proteinrohextrakt bestimmt.

Im Vergleich zu den Parametern des Fusionsproteins sind auch die Werte für das native Protein angegeben. Die Gegenüberstellung der K_m - und V_{max} -Werte zeigt, dass das Fusionsprotein einen höheren K_m -Wert und eine niedrigere maximale Reaktionsgeschwindigkeit für Pyridoxal hat, als das native Protein. Der Quotient aus k_{cat} und K_m ist für das Fusionsprotein signifikant kleiner als für das native Protein. Der Quotient k_{cat}/K_m

ist die Geschwindigkeitskonstante für die Wechselwirkung zwischen Pyridoxal und der Pyridoxal-Kinase und ein Maß für die katalytische Effizienz. Aus den Werten ergibt sich, dass der Proteinrohextrakt der nativen Pyridoxal-Kinase Pyridoxal effizienter umsetzt als der Rohextrakt des Fusionsproteins. Eine mögliche Ursache für den geringeren k_{cat} - und geringeren k_{cat}/K_m -Wert ist die Expression als Fusionsprotein. Das Maltose-bindende Protein hat ein Molekulargewicht von 42,5 kDa und ist somit größer als die zu untersuchende Pyridoxal-Kinase (35,1 kDa). Der Fusionsanteil kann die Konformation des Zielproteins beeinflussen und zu Veränderungen in der Funktion des Zielproteins führen. Die hier dargestellten Ergebnisse belegen einen negativen Einfluss des Fusionsanteils (Maltose-bindendes Protein) auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen werden durch die von Fitzpatrick et al. (2004) beschriebenen Versuchsergebnisse bestätigt. Sie exprimierten das aus *Bacillus subtilis* stammende Old Yellow Enzym (*YqjM*) nativ, als GST-Fusionsprotein und mit Hexahistidin-Fusionsanteil in *Escherichia coli*. Die enzymkinetischen Untersuchungen der aufgereinigten Proteine belegen eine signifikant höhere Reaktionsgeschwindigkeit des nativen Proteins im Vergleich zum GST-Fusionsprotein. Die Werte k_{cat} und k_{cat}/K_m waren für das Fusionsprotein signifikant geringer als für das native Protein.

Um den Verhältnissen *in vivo* möglichst nahe zu sein und den Einfluss des Maltose-bindenden Protein auf die Pyridoxal-Kinase auszuschließen, wurde die Pyridoxal-Kinase in den weiteren Versuche als natives Protein eingesetzt.

4.3.2.2 *Expression und Charakterisierung der nativen Pyridoxal-Kinase*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reinigungsmethode etabliert, die es ermöglichte, die native menschliche Pyridoxal-Kinase in zwei Schritten zu reinigen. Im ersten Schritt erfolgte die Reinigung durch Affinitätschromatographie (Kapitel 2.5.1.4.2) mit einer Pyridoxal-Sepharose-Matrix (Kapitel 2.5.1.4.1). Es wurde die Affinität der Pyridoxal-Kinase zu ihrem natürlichen Substrat ausgenutzt. Im zweiten Schritt wurde das nach Affinitätschromatographie im Elutionspuffer enthaltene Pyridoxin durch Gelfiltration (Kapitel 2.5.1.4.3) entfernt. Als Matrix wurde Sephadex[®] G-15 (Amersham Biosciences, Handbuch auf der beiliegenden CD /Herstellerangaben/Amersham Biosciences) eingesetzt. Mit der entwickelten Methode gelang eine schnelle und einfache Aufreinigung der nativen Pyridoxal-Kinase. Sowohl das mit Silber gefärbte Proteingel (Abbildung 3.8) als auch das MALDI-TOF-Spektrum (Abbildung 3.9) belegen, dass keine weiteren Proteine neben der Pyridoxal-Kinase anwesend sind. Eine Beeinflussung der durchgeführten Messungen

durch weitere im Inkubationsansatz befindliche Proteine kann daher ausgeschlossen werden. Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurde erfolgreich mit der reinen Pyridoxal-Kinase durchgeführt.

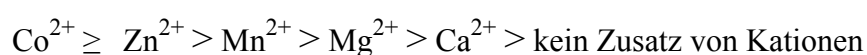
Die heterolog exprimierte Pyridoxal-Kinase wurde sowohl im zellfreien Lysat (Kapitel 3.3.2.1) aus *Escherichia coli* BL21(DE3)(pET-11a-PKH) als auch nach Aufreinigung (Kapitel 3.3.2.2) charakterisiert. Für den Proteinrohextrakt wurde ein pH-Optimum bei pH-Wert 6,0 (Abbildung 3.27) und für die aufgereinigte Pyridoxal-Kinase bei pH-Wert 5,8–6,3 (Abbildung 3.33) ermittelt. Die erhaltenen Maxima sind im Vergleich zu Lee et al. (2000) etwas höher. Sie exprimierten die menschliche Pyridoxal-Kinase als Maltose-bindendes Fusionsprotein und spalteten anschließend den Fusionsanteil ab. Das pH-Optimum in ihrem Versuch lag zwischen 5,5 und 6,0. Übereinstimmend bei beiden Untersuchungen war, dass bei einem pH-Wert kleiner als 5,5 beziehungsweise größer als 6,5 die Aktivität signifikant sinkt.

Das Temperatur-Optimum für die aufgereinigte Pyridoxal-Kinase lag bei 45 °C (Abbildung 3.34). Ein Temperatur-Optimum zwischen 40 °C und 50 °C trifft für die meisten Enzyme zu (Bisswanger, 2000). McCormick et al. (1961a) stellten für die Pyridoxal-Kinase aus *Streptococcus faecalis* 8043, *Lactobacillus casei* 7469, Rattenleber und menschlichem Gehirn ein Temperatur-Optimum in Höhe von 63 °C, 55 °C, 55 °C und 40 °C fest. Auch hier lagen die ermittelten Temperatur-Optima über der Körpertemperatur. McCormick et al. ermittelten ein niedrigeres Temperatur-Optimum für die menschliche Pyridoxal-Kinase, als im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurde. McCormick et al. setzten für ihre Untersuchungen ein Hirnhomogenat ein. Die Pyridoxal-Kinase konnte also durch weitere im Homogenat befindliche Proteine beeinflusst werden und sie arbeiteten mit einer anderen analytischen Methode.

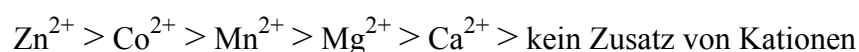
Das Temperatur-Optimum ist auch von der Zeit der Temperierung abhängig. Je länger Enzyme vor der Messung bei der Inkubationstemperatur temperiert werden, desto stärker ist das Temperatur-Optimum zu einem niedrigeren Wert verschoben (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Die Inkubationsversuche die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, erfolgten nicht bei dem ermittelten Temperatur-Optimum sondern bei 37 °C, um die Reaktionsbedingungen den *in vivo* Bedingung anzupassen.

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener zweiwertiger Kationen (Kapitel 3.3.2.2.5) auf die Aktivität der menschlichen Pyridoxal-Kinase ergab nachfolgendes Ergebnis:



Die Kationen sind nach ihrem Einfluss auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase angeordnet. In Anwesenheit von Cobaltionen ist die Aktivität im Vergleich mit Zinkionen am höchsten. Ohne Zusatz von zweiwertigen Kationen sinkt die Aktivität auf 2,7 % im Vergleich mit Zinkionen (Aktivität gleich 100 % gesetzt). Die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen ist für eine höhere Enzymaktivität und für die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat erforderlich. Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Lee et al. (2000) und Lum et al. (2002). Lee et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss von zweiwertigen Kationen auf die Pyridoxal-Kinaseaktivität mit heterolog exprimierter menschlicher Pyridoxal-Kinase. In Abwesenheit von zweiwertigen Kationen war auch hier die Aktivität signifikant erniedrigt (< 5 % im Vergleich zu $Zn^{2+} = 100\%$). Im Gegensatz zu den Ergebnissen im Rahmen dieser Arbeit steigerten Zinkionen (100 %) in den Untersuchungen von Lee et al. die Aktivität der Pyridoxal-Kinase stärker als Cobaltionen (~ 85 %). Lum et al. (2002) ermittelten den Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinase aus *Arabidopsis thaliana*. Auch in deren Versuchen hatten Zinkionen (100 %) größeren Einfluss auf die Aktivität als Cobaltionen (32,1 %). Ohne Zusatz von Kationen konnten sie keine Aktivität messen. Lum et al. und Lee et al. ermittelten folgende Reihenfolge der Kationen:



Die in verschiedenen Arbeiten ermittelten Reihenfolgen der zweiwertigen Kationen sind hinsichtlich des Einflusses von Zinkionen und Cobaltionen unterschiedlich. Die Reihenfolge der übrigen zweiwertigen Kationen ist gleich. Alle Ergebnisse zeigen, dass Zinkionen einen starken Einfluss auf die Aktivität der Pyridoxal-Kinasen haben und ohne den Zusatz zweiwertiger Kationen die Aktivität deutlich vermindert ist.

Die differierenden Ergebnisse spiegeln einerseits die Unterschiede der Pyridoxal-Kinasen verschiedener Spezies wieder und andererseits den konzentrationsabhängigen Einfluss der einzelnen Ionen (McCormick et al., 1961a; Rosenberg et al., 1990). Die Bedeutung dieser *in vitro* Untersuchungen in Bezug auf die *in vivo* Aktivität der Pyridoxal-Kinase ist allerdings unklar, da die Konzentration an freiem Zn^{2+} in vielen Geweben kleiner als 10^{-9} M ist. Im Plasma beträgt die Konzentration $2,1 \times 10^{-10}$ M (Magneson et al., 1987). *In vivo* ist die freie Zinkionen-Konzentration also deutlich geringer als die für *in vitro* Untersuchungen erforderliche und eingesetzte Zinkionen-Konzentration (Magneson et al., 1987; Lee et al., 2000).

Die durchgeführte Untersuchung der Substratspezifität für die Nukleosidtriphosphate zeigte, dass die menschliche Pyridoxal-Kinase Pyridoxal in Anwesenheit von ATP effektiv zu phosphorylieren vermag und in Anwesenheit von GTP keine Phosphorylierung

stattfindet (Kapitel 3.3.2.2.9). Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von McCormick et al. (1961a) überein, die die Substratspezifität der Pyridoxal-Kinase der Ratte für die Nucleosidtriphosphate ATP, ITP, GTP, CTP und UTP untersuchten. Die gereinigte Pyridoxal-Kinase aus der Leber von Ratten setzte in deren Versuchen nur ATP um. Aktivitätsmessungen mit dem Pyridoxal-Kinaserohextrakt von *Saccharomyces carlsbergensis* ergaben, dass die Aktivität in Anwesenheit von GTP auf circa die Hälfte und mit UTP beziehungsweise CTP auf ein Viertel der Aktivität mit ATP sank. Messungen mit dem Rohextrakt von *Streptococcus faecalis* 8043 ergaben mit CTP, GTP und UTP ungefähr ein Zehntel der Aktivität mit ATP. Hurwitz (1953) Untersuchungen der Pyridoxal-Kinase von *Streptococcus faecalis* ergaben, dass weder ADP noch ITP an Stelle von ATP als Cosubstrat umgesetzt werden. Die genannten Ergebnisse weisen darauf hin, dass ATP in allen Fällen das bevorzugte phosphorylierende Agens ist. Ausgehend von den Versuchsergebnissen die im Rahmen dieser Arbeit erbracht wurden (Kapitel 3.3.2.2.9) und den diskutierten Publikationen wurde in den weiteren Versuchen ATP als Donor für die Phosphatgruppe eingesetzt.

4.3.3 INKUBATIONEN DER PYRIDOXAL-KINASE MIT VITAMIN B₆ UND ERMITTLUNG DER KINETISCHEN KONSTANTEN

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubationen mit den Vitameren der B₆-Gruppe zeigten, dass die menschliche Pyridoxal-Kinase sowohl Pyridoxal als auch Pyridoxin und Pyridoxamin zu den entsprechenden 5'-Phosphateestern umsetzt. Dies bestätigt die Ergebnisse von di Salvo et al. (2004, Tabelle 4.5). Die Pyridoxal-Kinase hat eine unterschiedlich hohe Affinität zu den drei Substraten. Von den drei Vitameren hat Pyridoxin den kleinsten und Pyridoxamin den höchsten K_m-Wert. Die Werte sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Substrat	K _m [M]	V _{max} [mol/mg*min ⁻¹]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [s ⁻¹ *mol ⁻¹]
Pyridoxal	5,87 x 10 ⁻⁵	1,70 x 10 ⁻⁶	0,995	1,70 x 10 ⁴
Pyridoxin	9,87 x 10 ⁻⁶	2,11 x 10 ⁻⁶	1,233	1,25 x 10 ⁵
Pyridoxamin	1,26 x 10 ⁻⁴	1,35 x 10 ⁻⁶	0,790	6,28 x 10 ³

Tabelle 4.4 Gegenüberstellung der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte für K_m, V_{max}, k_{cat} und k_{cat}/K_m der menschlichen Pyridoxal-Kinase

Neben dem K_m sind auch V_{max}, k_{cat}, k_{cat}/K_m angegeben. Die Werte belegen, dass die Pyridoxal-Kinase die höchste Affinität zu Pyridoxin hat und es am effizientesten umsetzt. Die Effizienz mit der Pyridoxamin umgesetzt wird, ist am geringsten.

Tabelle 4.5 zeigt die bereits publizierten K_m-Werte für Pyridoxal, Pyridoxamin, Pyridoxin

und ATP der Pyridoxal-Kinasen unterschiedlicher Spezies im Vergleich mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werten. Die K_m -Werte für Pyridoxal variieren von 3,3 bis 688 μM , für Pyridoxamin von 6 bis 2100 μM , für Pyridoxin von 9,9 bis 200 μM und für ATP von 9,1 bis 210 μM . Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten K_m -Werte liegen im Bereich der bisher bestimmten Werte.

Organismus	K_m , Pyridoxal (μM)	K_m , Pyridoxamin (μM)	K_m , Pyridoxin (μM)	K_m , ATP (μM)	Literatur
Mensch	58,7	125,7	9,9	23,0	Ergebnisse dieser Arbeit
Mensch	3,3				Hanna et al., 1997
Mensch	97			12	Lee et al., 2000
Mensch	350	a	15		di Salvo et al., 2004
Ratte (Leber)	15		25		McCormick und Snell, 1961b
Rind (Gehirn)	91	2100	67	210	Hirakawa-Sakurai et al., 1993
Rind (Gehirn)	50		200		McCormick und Snell, 1961b
Schaf (Gehirn)	40	6	26	20	Kerry et al., 1986
Schwein (Gehirn)	25	kein Substrat	17	12	Kwok und Churchich, 1979
<i>Arabidopsis thaliana</i>	688			98	Lum et al., 2002
<i>Escherichia coli</i> (<i>PdxK</i>)	190 (pH 7,3) 130 (pH 6,1)	10		70	di Salvo et al., 2004
<i>Plasmodium falciparum</i>	212	a	70	82	Wrenger et al., 2005
<i>Trypanosoma brucei</i>	22 ^b 38 ^c			9,1 ^b 12,7 ^c	Scott und Phillips, 1997

Tabelle 4.5 Vergleich der für die menschliche Pyridoxal-Kinase ermittelten K_m -Werte
Tabelle 4.5 zeigt einen Vergleich der für die menschliche Pyridoxal-Kinase ermittelten K_m -Werte mit den aus der Literatur bekannten K_m -Werten der Pyridoxal-Kinasen unterschiedlicher Spezies.

- a Dieser Wert wurde nicht bestimmt. Es wurde aber dargelegt, dass Pyridoxamin umgesetzt wird.
- b Aus *Trypanosoma brucei* gereinigte Pyridoxal-Kinase (natives Protein).
- c In *Escherichia coli* heterolog exprimierte Pyridoxal-Kinase (His₆-tag Fusionsprotein).

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Resultate von di Salvo et al. (2004) zeigen, dass die menschliche Pyridoxal-Kinase alle drei Vitamere als Substrat akzeptiert. Dies entspricht der Pyridoxal-Kinase *PdxK* aus *Escherichia coli* (Yang et al., 1996). Im Gegensatz dazu akzeptiert die aus *Escherichia coli* bekannte Pyridoxal-Kinase *PdxY* nur Pyridoxal als Substrat (Yang et al., 1998). Funktionell zeigt die menschliche Pyridoxal-Kinase Ähnlichkeiten mit der Pyridoxal-Kinase *PdxK* aus *Escherichia coli*. Von den untersuchten Pyridoxal-Kinasen von Säugern konnte lediglich für die Pyridoxal-Kinase aus dem Gehirn von Schweinen belegt werden, dass sie kein Pyridoxamin umsetzt (Kwok und Churchich, 1979). Die aufgelisteten Pyridoxal-Kinasen unterscheiden sich in ihrem Substratmuster und ihrer Substratspezifität. Alle bestimmten K_m -Werte liegen im mikromolaren Bereich. Werden die in Tabelle 4.5 angegebenen K_m -Werte mit den gemessenen Plasmaspiegeln und der Konzentration im Gehirn verglichen, ist auffällig, dass die K_m -Werte höher sind als die für Vitamin B₆ bestimmten Plasmaspiegel. Diese liegen im nanomolaren Bereich (Kapitel

1.3). Das heißt, die Pyridoxal-Kinase wird *in vivo* die Vitamere der B₆-Gruppe vermutlich unterhalb der Substratsättigung phosphorylieren. Für die Hemmung der Pyridoxal-Kinase kann das bedeuten, dass Inhibitoren noch leichter mit der Kinase interagieren und diese hemmen können, da sie mit weniger Substratmolekülen um die Substratbindestelle konkurrieren.

Bei dem Vergleich der in Tabelle 4.5 angegebenen K_m-Werte der menschlichen Pyridoxal-Kinase für Pyridoxal fällt auf, dass der Wert von Hanna et al. am geringsten ist. Sie arbeiteten mit einem Homogenat aus in menschlichen Nierenzellen exprimierter Pyridoxal-Kinase. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen wurden mit heterolog in *Escherichia coli* exprimierter Pyridoxal-Kinase durchgeführt. Eukaryontische Proteine werden häufig posttranslational modifiziert. Dies umfasst beispielsweise Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Acylierungen oder proteolytische Prozessierungen. In *Escherichia coli* heterolog exprimierte eukaryontische Proteine besitzen diese Modifikation nicht oder sie sind verändert. Die möglicherweise fehlenden posttranslationalen Modifikationen können die biologische Aktivität der Pyridoxal-Kinase beeinflusst haben.

Die Analyse der Pyridoxal-Kinasesequenz mit der ScanProsite-Software (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>) ergab die in Tabelle 4.6 angegebenen möglichen Stellen für posttranslationale Modifikationen.

Position	mögliche Modifikation
20	N-Myristilierung
45	N-Glykosylierung
54	N-Myristilierung
68	N-Myristilierung
127	Phosphorylierung (Tyrosin-Kinase)
158	Amidierung
158	Phosphorylierung (Protein-Kinase C)
164	Phosphorylierung (Casein-Kinase II)
186	Phosphorylierung (Casein-Kinase II)
204	Phosphorylierung (Protein-Kinase C)
245	Phosphorylierung (Protein-Kinase C)
296	Phosphorylierung (Protein-Kinase C)
296	Phosphorylierung (Casein-Kinase II)

Tabelle 4.6

Mögliche posttranslationale Modifikationen der Pyridoxal-Kinase

Das Fehlen der posttranslationalen Modifikationen ist eine mögliche Begründung für den im Vergleich zu Hannah et al. (1997) erhöhten K_m-Wert für Pyridoxal (58,7 µM versus 3,3 µM). In der Literatur sind allerdings noch keine Untersuchungen über

posttranslationale Modifikationen der Pyridoxal-Kinase beschrieben worden. Der signifikante Unterschied zwischen den K_m -Werten könnte auch den unterschiedlichen Methoden zugeschrieben werden, die für die Messung der enzymatischen Umsetzung eingesetzt wurden. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Werte wurden mittels HPLC bestimmt. Hanna et al. untersuchten die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch Messung der Fluoreszenz nach Interaktion mit Hydroxylamin.

4.4 Inkubationen der Pyridoxal-Kinase mit Vitamin B₆-Antivitaminen

Mit der gereinigten Pyridoxal-Kinase wurde der Einfluss der Antivitamine Ginkgotoxin (Kapitel 3.4.1 und 3.4.9) und 4'-Desoxyypyridoxin (Kapitel 3.4.3) auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat untersucht, um den Mechanismus der Interaktionen zwischen Ginkgotoxin und der Pyridoxal-Kinase aufzuklären. Diese Ergebnisse sollten Aussagen über potentielle Interaktionen von *Ginkgo biloba* L.-Trockenextrakten und über die Ursache von Vergiftungen mit Ginkgosamen ermöglichen.

Mit den durchgeführten Versuchen konnte erstmals an der gereinigten menschlichen Pyridoxal-Kinase die Umsetzung von Ginkgotoxin zu Ginkgotoxin-5'-phosphat gezeigt werden (Abbildung 3.61). Die ermittelten K_m -Werte sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Substrat	K_m [M]	V_{max} [mol/mg*min ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [s ⁻¹ *mol ⁻¹]
Pyridoxal	$5,87 \times 10^{-5}$	$1,70 \times 10^{-6}$	0,995	$1,70 \times 10^4$
Pyridoxin	$9,87 \times 10^{-6}$	$2,11 \times 10^{-6}$	1,233	$1,25 \times 10^5$
Pyridoxamin	$1,26 \times 10^{-4}$	$1,35 \times 10^{-6}$	0,790	$6,28 \times 10^3$
Desoxyypyridoxin	$2,16 \times 10^{-5}$	$2,62 \times 10^{-6}$	1,535	$7,10 \times 10^4$
Ginkgotoxin	$4,95 \times 10^{-6}$	$7,87 \times 10^{-7}$	0,460	$9,30 \times 10^4$

Tabelle 4.7 Vergleich der enzymkinetischen Parameter von Vitamin B₆ mit den Parametern von Ginkgotoxin und Desoxyypyridoxin

Die Affinität der Pyridoxal-Kinase zum toxischen Agens Ginkgotoxin ist höher als die Affinität zu den physiologischen Substraten. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ginkgotoxin und Vitamin B₆ interagiert die Pyridoxal-Kinase bevorzugt mit Ginkgotoxin (Kapitel 3.4.9). Aus dem Quotienten k_{cat}/K_m ergibt sich, dass Ginkgotoxin nicht mit der höchsten Effizienz umgesetzt wird, aber effizienter als Pyridoxal. Ginkgotoxin kann aufgrund der höchsten Affinität zur Pyridoxal-Kinase die anderen Verbindungen aus dem aktiven Zentrum verdrängen. Im Vergleich zu den Vitameren ist der K_m -Wert von Ginkgotoxin (4,95 μ M) kleiner als der von Pyridoxin (9,9 μ M).

Diese Ergebnisse werden durch die durchgeführte Untersuchung der Substratbindetasche der Pyridoxal-Kinase unterstützt. Die Computerdarstellung der Substratbindetasche der

Pyridoxal-Kinase (Kapitel 3.5.3) beschreibt die Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Bereiche (Abbildung 3.87). Der Bereich, in dem die funktionelle Gruppe in Position 4' der Vitamere mit der Pyridoxal-Kinase interagiert, ist hydrophob. Je hydrophober die funktionelle Gruppe, desto höher sollte die Affinität des Substrates zur Pyridoxal-Kinase sein. Abbildung 3.87 zeigt das natürliche Substrat Pyridoxin und Ginkgotoxin in der Substratbindetasche der Pyridoxal-Kinase. Ginkgotoxin müsste nach Betrachtung der Hydrophilie/Hydrophobie-Verhältnisse der Substratbindetasche besser mit der Pyridoxal-Kinase interagieren als Pyridoxin. Dass Ginkgotoxin lipophiler ist als Pyridoxal, wurde durch Bestimmung der Verteilungskoeffizienten ($\log P$, $P_{O/W}$) von Pyridoxal und Ginkgotoxin gezeigt (Kapitel 3.4.6.3). Aufgrund der höheren Lipophilie kann Ginkgotoxin besser mit der Pyridoxal-Kinase interagieren. Die ermittelten K_m -Werte für Pyridoxin (9,9 μM) und Ginkgotoxin (4,95 μM) sind dafür ein Beleg.

Durch die höhere Lipophilie kann Ginkgotoxin die Blut-Hirn-Schranke zudem besser überwinden als Pyridoxal. Ginkgotoxin kann nach Resorption aus dem Darm ins Blut und über den Blutkreislauf ins Gehirn gelangen.

Ginkgotoxin verzögert *in vitro* die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat (Abbildung 3.44 und 3.45), erkennbar an der Rechtsverschiebung der Kurven. In Anwesenheit von Ginkgotoxin entsteht zunächst Ginkgotoxin-5'-phosphat (Abbildung 3.76 und 3.77). Da Ginkgotoxin eine höhere Affinität zur Pyridoxal-Kinase besitzt (K_m -Wert ist für Pyridoxal um den Faktor 10 höher), verdrängt es das gleichzeitig anwesende Pyridoxal aus dem aktiven Zentrum der Pyridoxal-Kinase und wird umgesetzt. Erst danach kann das Pyridoxal mit der Kinase interagieren und umgesetzt werden. In Anwesenheit von Ginkgotoxin wird also die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch die bevorzugte Bildung von Ginkgotoxin-5'-phosphat unterdrückt.

Die Umsetzung von 4'-Desoxyridoxin zu 4'-Desoxyridoxin-5'-phosphat konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls belegt werden. Die beiden Antivitamine Ginkgotoxin und Desoxyridoxin sind Substrate der Pyridoxal-Kinase. Die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch die beiden Antivitamine hat aber eine unterschiedliche Auswirkung. Befinden sich Ginkgotoxin und Pyridoxal im Inkubationsansatz zeigen die Kurven einen zweiphasigen Verlauf (Abbildung 3.45 und 3.77). Während der ersten Phase der Reaktion wird nur sehr wenig Pyridoxal-5'-phosphat gebildet. In der zweiten erfolgt die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung mit konstanter Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeit der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung im zweiten Teil entspricht der Umsetzung von Pyridoxal in Abwesenheit von Ginkgotoxin. In Anwesenheit von Ginkgotoxin sind die Kurven nach rechts verschoben und zwar umso weiter, je höher die Konzentration von Ginkgotoxin im Ansatz ist (Abbildung 3.45). Ist die Ginkgotoxin-Konzentration hoch genug, lässt sich die

Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung während des Beobachtungszeitraumes vollständig unterdrücken. In der ersten Reaktionsphase erfolgt die Umsetzung von Ginkgotoxin zu Ginkgotoxin-5'-phosphat, dargestellt in Abbildung 3.76 und 3.77. Die Kurven für die gleichzeitige Inkubation von Desoxypyridoxin und Pyridoxal zeigen einen anderen Verlauf (Abbildung 3.49 und 3.50) und sind nicht zweiphasig. Sie sind über den gesamten Beobachtungszeitraum linear. Mit steigender Desoxypyridoxin-Konzentration sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit und die Kurven verlaufen flacher.

Zusätzlich wurde untersucht, ob sich die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Ginkgotoxin beziehungsweise Desoxypyridoxin mit steigenden Konzentrationen von Pyridoxal aufheben lässt. Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 3.46 und 3.51 dargestellt. Aus den Kurven geht hervor, dass die Hemmung der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung durch Ginkgotoxin und Desoxypyridoxin mit steigenden Pyridoxal-Konzentrationen aufgehoben werden kann. Pyridoxal kann sowohl Ginkgotoxin als auch Pyridoxin aus dem aktiven Zentrum der Pyridoxal-Kinase verdrängen, wenn es in genügend hoher Konzentration vorliegt.

Die nachgewiesene Umsetzung von Ginkgotoxin zu Ginkgotoxin-5'-phosphat durch die Pyridoxal-Kinase bestätigt die Ergebnisse von Mizuno et al. (1980), die die Umsetzung von 4'-substituierten Pyridoxin-Analoga durch die Pyridoxal-Kinase der Maus untersuchten. Sie wiesen die Umsetzung von Ginkgotoxin jedoch an partiell aufgereinigter Pyridoxal-Kinase nach. Da Mizuno et al. für ihre Versuche nicht das reine Enzym einsetzten, können weitere Enzyme die Untersuchungen beeinflusst haben. Weiterhin quantifizierten sie die Bildung der 5'-Phosphate nicht direkt, sondern indirekt durch Messung des gleichzeitig gebildeten ADP. Bei der Untersuchung der Umsetzung von 4'-substituierten Pyridoxin-Analoga (Ethoxy-, Methoxy-, Propoxy- und iso-Propoxymethylpyridoxin) durch die Pyridoxal-Kinase zeigten sie, dass Ginkgotoxin die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung stärker minderte als Desoxypyridoxin. Sie ermittelten für Ginkgotoxin einen K_m -Wert von $2,9 \times 10^{-5}$ M. Dieser ist deutlich höher als der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte K_m -Wert von $4,95 \times 10^{-6}$ M für die gereinigte menschliche Pyridoxal-Kinase (Tabelle 4.7). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur gezeigt, dass Ginkgotoxin durch die gereinigte menschliche Pyridoxal-Kinase umgesetzt wird, sondern auch erstmals der Nachweis erbracht, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ginkgotoxin und Pyridoxal zunächst Ginkgotoxin umgesetzt wird und erst danach die Umsetzung von Pyridoxal erfolgt. Die Untersuchungsergebnisse zeigten weiterhin, dass die Wirkung von Ginkgotoxin durch Vitamin B₆ antagonisierbar ist. Es ließ sich *in vitro* zeigen, dass die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Ginkgotoxin bzw. Desoxypyridoxin mit steigender Pyridoxal-Konzentration aufgehoben werden kann (Kapitel

3.4.1.2.1 und 3.4.3.2.1). Der geringe K_m -Wert von Ginkgotoxin im Vergleich zu Desoxyypyridoxin (Tabelle 4.7) korreliert mit der krampfauslösenden Wirkung von Ginkgotoxin bei Mäusen. Die krampfauslösende Wirkung von 4'-substituierten Pyridoxin-Analoga nimmt in folgender Reihenfolge ab MPN > EPN > PPN > isoPPN > DPN (Mizuno et al., 1980).

Dass die Wirkung der Antivitamine durch Pyridoxal aufgehoben werden kann, wird auch durch die Versuche von Hanna et al. (1997) dokumentiert. Ihre Versuchsergebnisse belegen eine kompetitive Wechselwirkung zwischen Pyridoxal und Desoxyypyridoxin. Die *in vivo* beobachtete Aufhebung der Symptome einer Ginkgosamenvergiftung durch Vitamin B₆ stützt zusammen mit den beschriebenen Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen die Hypothese, dass Ginkgotoxin und Ginkgosamen durch Hemmung der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung zu Krampfanfällen führen.

Ginkgotoxin unterdrückt die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat, indem es selbst phosphoryliert wird. Dadurch steht weniger Cofaktor für die Glutamat-Decarboxylase zur Verfügung. Gleichzeitig wird ein Inhibitor der Glutamat-Decarboxylase gebildet. Buss et al. (2001) konnten zeigen, dass Ginkgotoxin-5'-phosphat in hohen Konzentrationen ($IC_{50} = 2,7 \text{ mM}$) die Glutamat-Decarboxylase (GAD_{65kDa}) hemmt. Damit potenziert sich die Wirkung von Ginkgotoxin, da es die Pyridoxal-Kinase unter Bildung des Inhibitors der Glutamat-Decarboxylase hemmt. Als Folge der Hemmung beider Enzyme ist die Synthese von GABA beeinträchtigt.

4.5 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Die neuronale Hemmung und Erregung wird im Gehirn über komplexe Mechanismen kontrolliert. Für die Ausbreitung von Krampfanfällen spielt das Verhältnis des stärksten exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat zum stärksten inhibitorischen Neurotransmitter GABA eine entscheidende Rolle. Diese Neurotransmitter sind über verschiedene Zwischenstufen ineinander überführbar. Einige Reaktionsschritte sind Pyridoxal-5'-phosphat-abhängig (Abbildung 1.4). Ein Eingriff in dieses komplexe System ist über verschiedene Mechanismen möglich und kann zur Auslösung von epileptischen Krampfanfällen führen.

Krampfanfälle wurden beim Menschen nach übermäßigem Verzehr von Ginkgosamen beobachtet (Yagi et al., 1993; Miwa et al., 2001; Fujisawa et al., 2002; Kajiyama et al., 2002; Hori et al., 2004). Diese Samen enthalten Ginkgotoxin (Arenz et al., 1996; Hori et al., 2004; Lawrence und Scott, 2005), das im Tierversuch zuverlässig Krampfanfälle auslöst. Es greift in den Neurotransmitterhaushalt ein und senkt die GABA-Konzentration im

Gehirn (Nitsch und Okada, 1976; Nitsch, 1980; Haug und Nitsch, 1982; Yanai et al., 1990; Wada und Haga, 1997). Enzyme, die direkt oder indirekt die Bildung oder den Abbau von GABA beeinflussen, sind die Glutamat-Decarboxylase, GABA-Transaminase, Pyridoxal-Kinase, Pyridoxinphosphat-Oxidase und Pyridoxal-Phosphatase. Eine Hemmung oder eine verminderte Expression dieser Enzyme beeinflusst die GABA-Konzentration. Eine verstärkte Bindung von Glutamat oder eine verringerte Bindung von GABA an die entsprechenden Rezeptoren führt ebenfalls zu einer erhöhten Krampfbereitschaft.

Die Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Ginkgotoxin ist von Bedeutung, da es in Arzneimitteln aus *Ginkgo biloba* L. enthalten ist (Arenz et al., 1996; Scott et al., 2000; Lawrence und Scott, 2005). Die Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Ginkgotoxin und die Risikobewertung der Anwendung von *Ginkgo biloba* L.-Extrakten sind ein wesentlicher Schritt zur Arzneimittelsicherheit und könnten zur Entwicklung neuer Antiepileptika beitragen.

Untersuchungen, die vor Beginn dieser Arbeit vorlagen hatten gezeigt, dass Ginkgotoxin die GABA-Konzentration im Gehirn vermindert. Der Einfluss von Ginkgotoxin und Ginkgotoxin-5'-phosphat auf das GABA bildende Enzym, die Glutamat-Decarboxylase, hatten Buss et al. (2001) untersucht. Sie haben belegt, dass die GAD_{65kDa} durch hohe Konzentrationen an Ginkgotoxin-5'-phosphat gehemmt wird. Der IC₅₀-Wert für Ginkgotoxin-5'-phosphat beträgt 2,7 mM. Da dieser Wert deutlich über den beim Menschen während eines Krampfanfalles gemessenen Ginkgotoxin-Konzentrationen liegt (1,31 µM–6,99 µM, Hori et al., 2004), kann die Hemmung der Glutamat-Decarboxylase aber nicht die einzige Ursache für durch Ginkgotoxin ausgelöste Krampfanfälle sein.

Die Abhängigkeit der Aktivität der Glutamat-Decarboxylasen, insbesondere der GAD_{65kDa}, von Pyridoxal-5'-phosphat führten zu der Hypothese, dass Ginkgotoxin die Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentration beeinflusst. Das wichtigste an der Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung beteiligte Enzym ist die Pyridoxal-Kinase. Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Ginkgotoxin auf die Pyridoxal-Kinase.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die menschliche Pyridoxal-Kinase durch Ginkgotoxin gehemmt wird, weil die Kinase Ginkgotoxin bevorzugt umsetzt. Der K_m-Wert für Ginkgotoxin ist geringer als der K_m-Wert für das natürliche Substrat Pyridoxal. Ginkgotoxin kann durch die höhere Affinität zum Enzym die natürlichen Substrate Pyridoxal, Pyridoxin und Pyridoxamin aus der Substratbindetasche verdrängen. Erst nach Umsetzung des Toxins findet eine Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat statt, da Pyridoxal erst mit dem aktiven Zentrum der Pyridoxal-Kinase interagiert, wenn es nicht mehr von Ginkgotoxin verdrängt werden kann.

Es wurde der Nachweis erbracht, dass zwei Enzyme (Pyridoxal-Kinase und Glutamat-

Decarboxylase), die das Neurotransmitter-Gleichgewicht im Gehirn kontrollieren, durch Ginkgotoxin beziehungsweise Ginkgotoxin-5'-phosphat beeinflusst werden.

Die menschliche Pyridoxal-Kinase wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als heterolog in *Escherichia coli* überexprimiertes Protein untersucht. Posttranslationale Modifikationen wurden daher nicht eingeführt (Kapitel 4.3.3). Diese könnten möglicherweise einen Einfluss auf die biologische Aktivität der Pyridoxal-Kinase haben. In weiteren Versuchen sollte daher überprüft werden, ob die menschliche Pyridoxal-Kinase posttranslational modifiziert wird und ob diese Modifikationen die Hemmung durch Ginkgotoxin beeinflussen.

Da der GABA-Spiegel durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Enzyme kontrolliert wird, sollte der Einfluss von Ginkgotoxin und Ginkgotoxin-5'-phosphat auf alle an der Regulation des GABA-Spiegels beteiligten Enzyme untersucht werden. Nur dies ermöglicht eine vollständige Aufklärung des Wirkmechanismus von Ginkgotoxin und der Ginkgosamen. Weitere an der Aufrechterhaltung des GABA-Spiegels beteiligte Enzyme sind die Pyridoxal-Phosphatase, die Pyridoxinphosphat-Oxidase und die GABA-Transaminase (Kapitel 1.4.3).

Eine Hemmung der Pyridoxal-Phosphatase und der Pyridoxinphosphat-Oxidase führt wie die Hemmung der Pyridoxal-Kinase zu veränderten Pyridoxal-5'-phosphat-Konzentrationen und damit indirekt zur Beeinflussung aller Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzyme.

Eine Beeinflussung der Pyridoxal-Phosphatase kann dazu führen, dass die Vitamin B₆-Phosphatester nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Wird weniger Vitamin B₆ ins Gehirn aufgenommen, sinkt die Vitamin B₆-Konzentration im Gehirn und als Folge die Aktivität der Vitamin B₆-abhängigen Enzyme. Wird die Phosphatase im Gehirn gehemmt, kann Pyridoxal-5'-phosphat nicht abgebaut werden. Dies führt dazu, dass die Zellen einerseits kein Pyridoxal-5'-phosphat aufnehmen können und andererseits überschüssiges Pyridoxal-5'-phosphat nicht mehr abgebaut werden kann. Überschüssiges Pyridoxal-5'-phosphat könnte zu epileptischen Anfällen führen, indem es die Bindung von GABA an den GABA_A-Rezeptor inhibiert. Dies wurde in *in vitro* Versuchen beobachtet (Tunncliff und Ngo, 1998). Die Beeinflussung der Pyridoxinphosphat-Oxidase würde in den Zellen zu einer verminderten Bereitstellung des Cofaktors Pyridoxal-5'-phosphat führen. Da dieses Enzym nur Pyridoxin-5'-phosphat und Pyridoxamin-5'-phosphat als Substrat akzeptiert (Friedrich, 1988; Notheis et al., 1995), wird es vermutlich stärker durch Ginkgotoxin-5'-phosphat als durch Ginkgotoxin beeinflusst.

Die GABA-Konzentration kann auch direkt durch Interaktion von Ginkgotoxin mit der GABA-Transaminase verändert werden. Eine Hemmung der GABA-Transaminase müsste

zu einer Erhöhung der GABA-Konzentration im synaptischen Spalt führen. Eine erhöhte Konzentration von GABA im synaptischen Spalt wirkt antikonvulsiv. Dieses wird auch als Wirkprinzip bei verschiedenen Antiepileptika ausgenutzt. Eine Hemmung der GABA-Transaminase in den Astrozyten könnte die Umwandlung von GABA zu Glutamin verringern. Damit würde weniger Glutamin an die GABAergen Neuronen abgegeben werden und als Folge davon weniger GABA in den GABAergen Neuronen gebildet werden können (Abbildung 1.4) und die Krampfbereitschaft könnte erhöht werden. GABA ist über den GABA-Shunt, einem Nebenweg des Citratzyklus, am oxidativen Stoffwechsel des Gehirns beteiligt. Wird die GABA-Transaminase gehemmt, sinkt die Konzentration von α -Ketoglutarat und der oxidative Stoffwechsel wird gestört. Dies könnte in der Folge zu Krampfanfällen führen.

Eine *in vitro* Untersuchung an rekombinanten Enzymen kann nur einen Teilaspekt der Ginkgotoxin-Wirkung aufklären. Eine Beeinflussung der genannten Enzyme *in vivo* kann möglicherweise je nach Wirkort zu unterschiedlichen Effekten führen (Kapitel 1.4.3). Die Untersuchung der Wirkungen von Ginkgotoxin und des *Ginkgo biloba* L.-Extraktes kann helfen, die Relevanz des Ginkgotoxin-Vorkommens in Arzneimitteln aus *Ginkgo biloba* L. zu beurteilen.

5 Zusammenfassung

Todesfälle und tonisch-klonische Krampfanfälle nach dem Verzehr von Ginkgosamen, die epileptischen Krampfanfällen ähneln (Wada et al., 1985; Yanai et al., 1990; Yagi et al., 1993; Miwa et al., 2001; Fujisawa et al., 2002; Kajiyama et al., 2002; Hori et al., 2004), sowie Berichte über epileptische Krämpfe nach der Einnahme von *Ginkgo biloba* L.-Extrakten (Granger, 2001) waren in der Vergangenheit Anlass, die toxische Wirkung von Inhaltsstoffen aus *Ginkgo biloba* L. zu untersuchen. Als toxisches Wirkprinzip in Ginkgosamen wurde Ginkgotoxin identifiziert. Beeinflussungen des komplexen GABAergen Systems und bestimmter von Pyridoxal-5'-phosphat abhängiger Reaktionen durch Ginkgotoxin wurden vielfach untersucht und diskutiert.

Erstmalig im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum direkten Einfluss von Ginkgotoxin auf die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch die gereinigte menschliche Pyridoxal-Kinase durchgeführt.

Hierzu musste die Pyridoxal-Kinase zunächst gewonnen und charakterisiert werden. Sie wurde heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, einerseits als Maltose-bindendes Fusionsprotein und andererseits als natives Protein. Die Aufreinigung der nativen Pyridoxal-Kinase erfolgte nach Optimierung der Methode von Cash et al. (1980) in zwei Schritten mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration. Dadurch gelang es, die Pyridoxal-Kinase als reines Protein zu erhalten. Durch die separaten Untersuchungen der Kinase als natives Protein *und* als Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass der Maltose-bindende Anteil des Fusionsproteins die Aktivität der so gewonnenen Pyridoxal-Kinase erheblich mindert. Der K_m -Wert des Fusionsproteins für Pyridoxal beträgt $3,92 \times 10^{-3}$ M, während der der nativen Pyridoxal-Kinase $5,87 \times 10^{-5}$ M beträgt. Das Fusionsprotein ($k_{cat} = 2,71 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) setzt Pyridoxal also erheblich weniger effizient um als die native Pyridoxal-Kinase ($k_{cat} = 0,995 \text{ s}^{-1}$).

Somit ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse nur mit dem nativen Protein als hinreichend genau anzusehen. Daher wurden die Charakterisierung der Pyridoxal-Kinase und die Hemmstudien mit der nativen Pyridoxal-Kinase unter den optimierten Bedingungen durchgeführt. Für die Umsetzung von Pyridoxal durch die native Pyridoxal-Kinase liegt das pH-Optimum in einem Bereich von 5,8–6,3 und das Temperaturmaximum bei 45 °C. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte sowohl photometrisch, als auch mittels HPLC.

Die K_m -Werte der menschlichen Pyridoxal-Kinase wurden für Pyridoxal, Pyridoxamin, Pyridoxin, Desoxypyridoxin, Ginkgotoxin und ATP ermittelt. Die Hemmstudien dieser Arbeit zeigen, dass Ginkgotoxin und Desoxypyridoxin *in vitro* die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat durch die Pyridoxal-Kinase hemmen. Diese beiden Vitamin B₆-Strukturanaloga werden durch die Pyridoxal-Kinase umgesetzt.

Der K_m -Wert der Pyridoxal-Kinase für Ginkgotoxin ist mit 4,95 μM signifikant kleiner als für Pyridoxal (58,7 μM). Ginkgotoxin ist aufgrund seiner Methoxygruppe in 4'-Position lipophiler als Pyridoxal. Daher kann es die Blut-Hirn-Schranke vermutlich deutlich schneller und besser überwinden. Die Darstellung der Substratbindetasche im Computermodell ergab, dass diese in dem Bereich, in dem die 4'-Substituenten der Vitamere binden, lipophil ist. Folglich hat Ginkgotoxin eine höhere Affinität zur Pyridoxal-Kinase und verdrängt das Pyridoxal aus der Substratbindetasche. Es inhibiert so vorübergehend die Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat. Erst nach vollständiger Umsetzung von Ginkgotoxin zu Ginkgotoxin-5'-phosphat findet *in vitro* die Umsetzung von Pyridoxal zu Pyridoxal-5'-phosphat wieder ungestört statt.

Wegen seiner Rolle als aktiver Cofaktor in der GABA-Synthese bedeutet eine verminderte Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat *in vivo* eine Verringerung der GABA-Konzentration. Sollte Ginkgotoxin die Umsetzung von Pyridoxal zu Pyridoxal-5'-phosphat *in vivo* qualitativ und quantitativ ebenso inhibieren, wie *in vitro* nachgewiesen, würde das die nach Einnahme von Ginkgosamen beobachteten konvulsiven Vergiftungssymptome unmittelbar erklären.

Tatsächlich liegt der ermittelte K_m -Wert für Ginkgotoxin (4,95 μM) in der gleichen Größenordnung wie die gemessenen Plasmaspiegel bei Personen mit "Gin-nan-Sitotoxismus" nach übermäßigem Verzehr von Ginkgosamen (1,31–6,99 μM ; Hori et al., 2004). Im Plasma der Patienten wurden also Ginkgotoxin-Konzentrationen gemessen, bei denen *in vitro* die Pyridoxal-5'-phosphat-Bildung durch Ginkgotoxin gehemmt wird.

Die vorgelegten Untersuchungsergebnisse liefern eine Erklärung für die nach übermäßigem Verzehr von Ginkgosamen beobachteten epileptiformen Krämpfe und können Ansatzpunkte für die Erforschung neuer Antiepileptika geben.

6 Literaturverzeichnis

Dictionary of Chinese Medicine. 3rd ed. Tokyo, Japan: Shanghai Science and Technology Publishing; 1985.

Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage Berlin New York: Walter de Gruyter; 1994.

Ahlemeyer B, Krieglstein J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of *Ginkgo biloba* extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* 2003;36(Suppl 1):S8-14.

Anshu M, Pillai K, Zakir H. Influence of *Ginkgo biloba* on the effect of anticonvulsants. *Indian Journal of Pharmacology* 1996;28(2):84-87.

Arenz A. Zur Biosynthese von Pyridoxin (Vitamin B₆) im Enterobakterium *Escherichia coli* sowie zu Vorkommen und Biosynthese von 4'-O-Methylpyridoxin - einem B₆-Antivitamin - in höheren Pflanzen (*Ginkgo biloba* L. und *Albizia tanganyicensis* Bak.f.), mit ergänzenden Untersuchungen zu 4'-O-Methylpyridoxin in Ginkgo Arzneispezialitäten und Ginkgo-Lebensmitteln. Dissertation, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn 1996.

Arenz A, Klein M, Fiehe K, Groß J, Drewke C, Hemscheidt T, et al. Occurrence of neurotoxic 4'-O-methylpyridoxine in *Ginkgo biloba* leaves, ginkgo medications and japanese ginkgo food. *Planta Medica* 1996;62:548-551.

Arnone A, Rogers P, Scholz G, Kwok F. Crystallization and preliminary X-ray studies of pyridoxal kinase from sheep brain. *The Journal of biological chemistry* 1989;264(8):4322-4323.

Bahn JH, Kwon OS, Joo HM, Ho Jang S, Park J, Hwang IK, et al. Immunohistochemical studies of brain pyridoxine-5'-phosphate oxidase. *Brain research* 2002;925(2):159-168.

Battaglioli G, Liu H, Martin DL. Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *Journal of neurochemistry* 2003;86(4):879-887.

Baxter P. Pyridoxine-dependent seizures: a clinical and biochemical conundrum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 2003;1647(1-2):36-41.

Berg JM, Tymoczko JL, Lubert S. Biochemie. 3. Auflage. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2003.

- Bernstein AL.** Vitamin B₆ in clinical neurology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990;585(1):250-260.
- Bertram S, Gassen HG.** Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Stuttgart Jena New York: Gustav Fischer Verlag; 1991.
- Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 1979;7(6):1513-1523.
- Bisswanger H.** Enzymkinetik Theorie und Methoden. 3. Auflage Weinheim New York Chichester Brisbane Singapore Toronto: WILEY-VCH Verlag GmbH; 2000.
- Blackwell JR, Horgan R.** A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS letters* 1991;295(1-3):10-12.
- Bohney JP, Fonda ML, Feldhoff RC.** Identification of Lys190 as the primary binding site for pyridoxal 5'-phosphate in human serum albumin. *FEBS letters* 1992;298(2-3):266-268.
- Bor MV, Refsum H, Bisp MR, Bleie O, Schneede J, Nordrehaug JE, et al.** Plasma vitamin B₆ vitamers before and after oral vitamin B₆ treatment: A randomized placebo-controlled study. *Clinical chemistry* 2003;49(1):155-161.
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976;72:248-254.
- Bruchhausen vF, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackenthal E, Holzgrabe U.** (Hrsg.), Hagers Handbuch, Band 9. 5. Auflage Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer-Verlag; 1993.
- Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, et al.** Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89(6):2115-2119.
- Buss K.** Beeinflussung der Glutamatdecarboxylase-Isoenzyme GAD_{65kDa} und GAD_{67kDa} aus menschlichem Hirn durch synthetische Vitamin-B₆-Analoga und Sekundärstoffe aus *Ginkgo biloba* L.. Dissertation, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn 2000.

- Buss K, Drewke C, Lohmann S, Piwonska A, Leistner E.** Properties and interaction of heterologously expressed glutamate decarboxylase isoenzymes GAD(65kDa) and GAD(67kDa) from human brain with ginkgotoxin and its 5'-phosphate. *Journal of medicinal chemistry* 2001;44(19):3166-3174.
- Carlson H, Ronne-Engstrom E, Ungerstedt U, Hillered L.** Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. *Neuroscience letters* 1992;140(1):30-32.
- Case A, Huskey WP, Stein RL.** Enzymatic reaction of silent substrates: kinetic theory and application to the serine protease chymotrypsin. *Biochemistry* 2003;42(16):4727-4732.
- Cash CD, Maitre M, Rumigny JF, Mandel P.** Rapid purification by affinity chromatography of rat brain pyridoxal kinase and pyridoxamine-5-phosphate oxidase. *Biochemical and biophysical research communications* 1980;96(4):1755-1760.
- Chatterjee SS, Kondratskaya EL, Krishtal OA.** Structure-activity studies with *Ginkgo biloba* extract constituents as receptor-gated chloride channel blockers and modulators. *Pharmacopsychiatry* 2003;36(Suppl 1):S68-77.
- Chen CH, Battaglioli G, Martin DL, Hobart SA, Colon W.** Distinctive interactions in the holoenzyme formation for two isoforms of glutamate decarboxylase. *Biochimica et biophysica acta* 2003;1645(1):63-71.
- Cheng Y, Prusoff WH.** Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22(23):3099-3108.
- Cheung P-Y, Fong C-C, Ng K-T, Lam W-C, Leung Y-C, Tsang C-W, et al.** Interaction between Pyridoxal Kinase and Pyridoxal-5-phosphate-Dependent Enzymes. *Journal of biochemistry* 2003;134(5):731-738.
- Choi SY, Churchich JE, Zaiden E, Kwok F.** Brain pyridoxine-5-phosphate oxidase. Modulation of its catalytic activity by reaction with pyridoxal 5-phosphate and analogs. *The Journal of biological chemistry* 1987;262(25):12013-12017.
- Churchich JE, Kim YT.** Pyridoxal kinase. Structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990;585:357-367.
- Coburn SP, Slominski A, Mahuren JD, Wortsman J, Hessle L, Millan JL.** Cutaneous metabolism of vitamin B-6. *The Journal of investigative dermatology* 2003;120(2):292-300.

- Dakshinamurti K.** Neurobiology of Pyridoxine. *Advances in nutritional research* 1982;4:143-179.
- Davies JA, Johns L, Jones FA.** Effects of bilobalide on cerebral amino acid neurotransmission. *Pharmacopsychiatry* 2003;36(Suppl 1):S84-88.
- DeFeudis FV.** A brief history of EGb 761 and its therapeutic uses. *Pharmacopsychiatry* 2003;36(Suppl 1):S2-7.
- di Salvo ML, Hunt S, Schirch V.** Expression, purification, and kinetic constants for human and *Escherichia coli* pyridoxal kinases. *Protein expression and purification* 2004;36(2):300-306.
- di Salvo ML, Safo MK, Musayev FN, Bossa F, Schirch V.** Structure and mechanism of *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 2003;1647(1-2):76-82.
- Dolphin D, Poulson R, Avramovi'c O.** Vitamin B₆: pyridoxal phosphate: chemical, biochemical, and medical aspects. New York: Wiley; 1986.
- Dominici P, Kwok F, Churchich JE.** Proteolytic cleavage of pyridoxal kinase into two structural domains. *Biochimie* 1989;71(4):585-590.
- During MJ, Spencer DD.** Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 1993;341(8861):1607-1610.
- Eastman CL, Guilarte TR.** Vitamine B-6, kynurenines, and central nervous system function: developmental aspects. *The Journal of nutritional biochemistry* 1992;3:618-632.
- Eckert A, Keil U, Kressmann S, Schindowski K, Leutner S, Leutz S, et al.** Effects of EGb 761 *Ginkgo biloba* extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry* 2003;36(Suppl 1):S15-23.
- Ernst E.** The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: Ginkgo, St. John's Wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. *Annals of internal medicine* 2002;136(1):42-53.
- Fang X, Zhou ZM, Lu L, Yin LL, Li JM, Zhen Y, et al.** Expression of a novel pyridoxal kinase mRNA splice variant, PKH-T, in human testis. *Asian journal of andrology* 2004;6(2):83-91.
- Fiehe K.** Versuche zur Entwicklung eines zellfreien Systems, das Ginkgotoxin enzymatisch synthetisiert. Dissertation, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn 1999.

- Fitzpatrick TB, Auweter S, Kitzing K, Clausen T, Amrhein N, Macheroux P.** Structural and functional impairment of an Old Yellow Enzyme homologue upon affinity tag incorporation*1. *Protein Expression and Purification* 2004;36(2):280-291.
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K.** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7.Auflage Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1996.
- Friedrich W.** Vitamins. Berlin; New York: Walter de Gruyter; 1988.
- Fujisawa M, Hori Y, Nakajima M, Shimada K, Yoshikawa H, Wada K.** Gas chromatography-mass spectrometry analysis of 4-O-methylpyridoxine (MPN) in the serum of patients with ginkgo seed poisoning. *Journal of analytical toxicology* 2002;26(3):138-143.
- Gachon F, Fonjallaz P, Damiola F, Gos P, Kodama T, Zakany J, et al.** The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy. *Genes & development* 2004;18(12):1397-1412.
- Gospe SM, Jr.** Current perspectives on pyridoxine-dependent seizures. *The Journal of pediatrics* 1998;132(6):919-923.
- Gospe SM.** Pyridoxine-dependent seizures: findings from recent studies pose new questions. *Pediatric neurology* 2002;26(3):181-185.
- Gospe SM, Jr., Olin KL, Keen CL.** Reduced GABA synthesis in pyridoxine-dependent seizures. *Lancet* 1994;343(8906):1133-1134.
- Granger AS.** *Ginkgo biloba* precipitating epileptic seizures. *Age Ageing* 2001;30(6):523-525.
- Gregory PJ.** Seizure Associated with *Ginkgo biloba*? *Annals of internal medicine* 2001;134(4):344.
- Haglid KG, Wang S, Qiner Y, Hamberger A.** Excitotoxicity. Experimental correlates to human epilepsy. *Molecular neurobiology* 1994;9(1-3):259-263.
- Han Q, Xu M, Tang L, Tan X, Tan Y, Hoffman RM.** Homogeneous, nonradioactive, enzymatic assay for plasma pyridoxal 5- phosphate. *Clinical chemistry* 2002;48(9):1560-1564.
- Hanahan D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 1983;166(4):557-580.

- Hanna MC, Turner AJ, Kirkness EF.** Human pyridoxal kinase. cDNA cloning, expression, and modulation by ligands of the benzodiazepine receptor. *The Journal of biological chemistry* 1997;272(16):10756-10760.
- Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G.** (Hrsg.), *Hagers Handbuch*, Band 5. 5. Auflage Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; 1993.
- Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park H-S, et al.** The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000;405(6784):311-319.
- Haug P, Nitsch C.** Increase in taurine content before onset of seizures induced by a glutamate decarboxylase inhibitor. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 1982;48(3):463-466.
- Hayashi H.** Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity. *Journal of biochemistry* 1995;118(3):463-473.
- Higuchi H, Kinjo J, Nohara T.** An arrhythmic-inducing glycoside from *Albizzia julibrissin* Durazz., IV. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 1992;40(3):829-831.
- Hill RE, Himmeldirk K, Kennedy IA, Pauloski RM, Sayer BG, Wolf E, et al.** The Biogenetic anatomy of vitamin B₆. A ¹³C NMR Investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 1996;271(48):30426-30435.
- Hirakawa-Sakurai T, Ohkawa K, Matsuda M.** Purification and properties of pyridoxal kinase from bovine brain. *Molecular and cellular biochemistry* 1993;119(1-2):203-207.
- Hori Y, Fujisawa M, Shimada K, Oda A, Katsuyama S, Wada K.** Rapid analysis of 4 α -methylpyridoxine in the serum of patients with *ginkgo biloba* seed poisoning by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2004;27(4):486-491.
- Horton RW, Chapman AG, Meldrum BS.** The convulsant action of hydrazides and regional changes in cerebral gamma-aminobutyric acid and pyridoxal phosphate concentrations. *Journal of neurochemistry* 1979;33(3):745-749.
- Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GA.** Bilobalide, a sesquiterpene trilactone from *Ginkgo biloba*, is an antagonist at recombinant alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptors. *European Journal of Pharmacology* 2003;464(1):1-8.

- Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GAR.** Ginkgolides, diterpene trilactones of *Ginkgo biloba*, as antagonists at recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ GABA_A receptors. *European Journal of Pharmacology* 2004;494(2-3):131-138.
- Hurwitz J.** The enzymatic phosphorylation of pyridoxal. *The Journal of biological chemistry* 1953;205(2):935-947.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990;96(1):23-28.
- Isler O, Brubacher G, Ghisla S, Kräutler B.** Vitamine II, Wasserlösliche Vitamine. New York: Thieme-Verlags GmbH; 1988.
- Ivic L, Sands TTJ, Fishkin N, Nakanishi K, Kriegstein AR, Stromgaard K.** Terpene Trilactones from *Ginkgo biloba* are Antagonists of Cortical Glycine and GABA_A Receptors. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(49):49279-49285.
- Jang YM, Kim DW, Kang T-C, Won MH, Baek N-I, Moon BJ, et al.** Human pyridoxal phosphatase: Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(50):50040-50046.
- Kajiyama Y, Fujii K, Takeuchi H, Manabe Y.** Ginkgo seed poisoning. *Pediatrics* 2002;109(2):325-327.
- Kang JH, Hong ML, Kim DW, Park J, Kang TC, Won MH, et al.** Genomic organization, tissue distribution and deletion mutation of human pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *European journal of biochemistry / FEBS* 2004;271(12):2452-2461.
- Karas M, Hillenkamp F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry* 1988;60(20):2299-2301.
- Kash SF, Johnson RS, Tecott LH, Noebels JL, Mayfield RD, Hanahan D, et al.** Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94(25):14060-14065.
- Kellermann OK, Ferenci T.** Maltose-binding protein from *Escherichia coli*. *Methods in enzymology* 1982;90(Pt E):459-463.
- Kelly A, Stanley CA.** Disorders of glutamate metabolism. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 2001;7(4):287-295.
- Kerry JA, Rohde M, Kwok F.** Brain pyridoxal kinase. Purification and characterization. *European journal of biochemistry / FEBS* 1986;158(3):581-585.

- Kim YT, Kwok F, Churchich JE.** Interactions of pyridoxal kinase and aspartate aminotransferase emission anisotropy and compartmentation studies. *The Journal of biological chemistry* 1988;263(27):13712-13717.
- Kopp J, Schwede T.** The SWISS-MODEL repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic acids research* 2004;32(Database issue):D230-234.
- Kwok F, Churchich JE.** Brain pyridoxal kinase. Purification, substrate specificities, and sensitized photodestruction of an essential histidine. *The Journal of biological chemistry* 1979;254(14):6489-6495.
- Kwok F, Scholz G, Churchich JE.** Brain pyridoxal kinase dissociation of the dimeric structure and catalytic activity of the monomeric species. *European journal of biochemistry / FEBS* 1987;168(3):577-583.
- Kyte J, Doolittle RF.** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 1982;157(1):105-132.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-685.
- Lawrence GA, Scott PM.** Improved extraction of ginkgotoxin (4'-O-methylpyridoxine) from *Ginkgo biloba* products. *Journal of AOAC International* 2005;88(1):26-29.
- Le Bars PL.** Magnitude of effect and special approach to *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in cognitive disorders. *Pharmacopsychiatry* 2003a;36(Suppl 1):S44-49.
- Le Bars PL.** Response patterns of EGb 761 in alzheimer's disease: influence of neuropsychological profiles. *Pharmacopsychiatry* 2003b;36(Suppl 1):S50-55.
- Lee HS, Moon BJ, Choi SY, Kwon OS.** Human pyridoxal kinase: overexpression and properties of the recombinant enzyme. *Molecules and cells* 2000;10(4):452-459.
- Li M-H, Kwok F, Chang W-R, Lau C-K, Zhang J-P, Lo SCL, et al.** Crystal Structure of Brain Pyridoxal Kinase, a Novel Member of the Ribokinase Superfamily. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(48):46385-46390.
- Li M-h, Kwok F, Chang W-r, Liu S-q, Lo SCL, Zhang J-p, et al.** Conformational changes in the reaction of pyridoxal kinase. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(17):17459-17465.
- Lott IT, Coulombe T, Di Paolo RV, Richardson EP, Jr., Levy HL.** Vitamin B₆-dependent seizures: pathology and chemical findings in brain. *Neurology* 1978;28(1):47-54.

- Lottspeich F, Zorbas H.** (Hrsg.), Bioanalytik. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 1998.
- Lum HK, Kwok F, Lo SC.** Cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* pyridoxal kinase. *Planta* 2002;215(5):870-879.
- Lutz CT, Hollifield WC, Seed B, Davie JM, Huang HV.** Syrinx 2A: an improved lambda phage vector designed for screening DNA libraries by recombination in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84(13):4379-4383.
- Magneson G, Puvathingal J, Ray W, Jr.** The concentrations of free Mg²⁺ and free Zn²⁺ in equine blood plasma. *The Journal of biological chemistry* 1987;262(23):11140-11148.
- Mahuren JD, Coburn SP.** B₆ vitamers: cation exchange HPLC. *The Journal of nutritional biochemistry* 1990;1(12):659-663.
- Mammalian Gene Collection Program Team*, Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, et al.** Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(26):16899-16903.
- Martin DL, Rimvall K.** Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *Journal of neurochemistry* 1993;60(2):395-407.
- McCormick DB, Chen H.** Update on interconversions of vitamin B-6 with its coenzyme. *The Journal of nutrition* 1999;129(2):325-327.
- McCormick DB, Gregory ME, Snell EE.** Pyridoxal Phosphokinases. I. Assay, distribution, purification, and properties. *The Journal of biological chemistry* 1961a;236(7):2076-2084.
- McCormick DB, Snell EE.** Pyridoxal Phosphokinases II. Effects of inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 1961b;236(7):2085-2088.
- Melzheimer V.** *Ginkgo biloba* L., aus Sicht der systematischen und angewandten Botanik. *Pharmazie in unserer Zeit* 1992;21:206-214.
- Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH.** Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 1981;211(4489):1437-1438.
- Merrill AH, Jr, Henderson JM.** Vitamin B₆ metabolism by human liver. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990;585(1):110-117.

- Merrill AH, Jr., Henderson JM, Wang E, McDonald BW, Millikan WJ.** Metabolism of vitamin B-6 by human liver. *The Journal of nutrition* 1984;114(9):1664-1674.
- Mittenhuber G.** Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B₆ (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2001;3(1):1-20.
- Miwa H, Iijima M, Tanaka S, Mizuno Y.** Generalized convulsions after consuming a large amount of ginkgo nuts. *Epilepsia* 2001;42(2):280-281.
- Mizuno N, Kawakami K, Morita E.** Competitive inhibition between 4'-substituted pyridoxine analogues and pyridoxal for pyridoxal kinase from mouse brain. *Journal of nutritional science and vitaminology* 1980;26(6):535-543.
- Müller I.** Zur Einführung des *Ginkgo biloba* in die europäische Botanik und Pharmazie. *Pharmazie in unserer Zeit* 1992;21:201-205.
- Musayev FN, Di Salvo ML, Ko T-P, Schirch V, Safo MK.** Structure and properties of recombinant human pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Protein science: a publication of the Protein Society* 2003;12(7):1455-1463.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer K, Schäfer-Korting M.** Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2001.
- Nitsch C.** Regulation of GABA metabolism in discrete rabbit brain regions under methoxypyridoxine - regional differences in cofactor saturation and the preictal activation of glutamate decarboxylase activity. *Journal of neurochemistry* 1980;34(4):822-830.
- Nitsch C, Okada Y.** Differential decrease of GABA in the substantia nigra and other discrete regions of the rabbit brain during the preictal period of methoxypyridoxine-induced seizures. *Brain research* 1976;105(1):173-178.
- Notheis C, Drewke C, Leistner E.** Purification and characterization of the pyridoxol-5'-phosphate:oxygen oxidoreductase (deaminating) from *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* 1995;1247(2):265-271.
- Oberpichler-Schwenk H, Krieglstein J.** Pharmakologische Wirkungen von *Ginkgo biloba*-Extrakt und -Inhaltsstoffen. *Pharmazie in unserer Zeit* 1992;21(5):224-235.
- Ott WH.** Antipyridoxine activity of methoxypyridoxine in the chick. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N. Y.)* 1947;66:215-216.

- Pearl PL, Gibson KM.** Clinical aspects of the disorders of GABA metabolism in children. *Current opinion in neurology* 2004;17(2):107-113.
- Petroff OA, Rothman DL.** Measuring human brain GABA in vivo: effects of GABA-transaminase inhibition with vigabatrin. *Molecular neurobiology* 1998;16(1):97-121.
- Raleigh EA, Lech K, Brent R.** *Current Protocols in Molecular Biology*. New York; 1989.
- Read SM, Northcote DH.** Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Analytical biochemistry* 1981;116(1):53-64.
- Rizzolo A, Polesello S.** Chromatographic determination of vitamins in foods. *Journal of chromatography* 1992;624(1-2):103-152.
- Rosenberg IH, Russel RM, Wood RJ.** (Hrsg.), Zinc and the regulation of vitamin B₆ metabolism. *Nutrition reviews* 1990;48(6):255-258.
- Roth HJ, Fenner H.** *Arzneistoffe*. 2. Auflage Stuttgart Jena Lübeck Ulm: Gustav Fischer; 1997.
- Said HM, Ortiz A, Ma TY.** A carrier-mediated mechanism for pyridoxine uptake by human intestinal epithelial Caco-2 cells: regulation by a PKA-mediated pathway. *American journal of physiology. Cell physiology* 2003;285(5):C1219-1225.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239(4839):487-491.
- Sambrook J, Russell DW.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. Auflage New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977;74(12):5463-5467.
- Sasaki K, Hatta S, Haga M, Ohshika H.** Effects of bilobalide on gamma-aminobutyric acid levels and glutamic acid decarboxylase in mouse brain. *European Journal of Pharmacology* 1999;367(2-3):165-173.
- Sasaki K, Hatta S, Wada K, Itoh M, Yoshimura T, Haga M.** Effects of chronic administration of bilobalide on amino acid levels in mouse brain. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 2002;48(6):681-684.

- Sasaki K, Hatta S, Wada K, Ohshika H, Haga M.** Anticonvulsant activity of bilobalide, a sesquiterpene in *Ginkgo Biloba* L. leaves, against chemical-induced and electroshock-induced convulsions in mice. *Research Communications in Biological Psychology and Psychiatry* 1995;20(3 & 4):145-156.
- Sasaki K, Hatta S, Wada K, Ohshika H, Haga M.** Bilobalide prevents reduction of gamma-aminobutyric acid levels and glutamic acid decarboxylase activity induced by 4-O-methylpyridoxine in mouse hippocampus. *Life sciences* 2000;67(6):709-715.
- Sasaki K, Wada K, Hatta S, Ohshika H, Haga M.** Bilobalide, a constituent of *Ginkgo biloba* L., potentiates drug- metabolizing enzyme activities in mice: possible mechanism for anticonvulsant activity against 4-O-methylpyridoxine-induced convulsions. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* 1997;96(1):45-56.
- Schlegel H.** Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1992.
- Schulze-Bonhage A, Kurthen M, Walger P, Elger CE.** Pharmacorefractory status epilepticus due to low vitamin B₆ levels during pregnancy. *Epilepsia* 2004;45(1):81-84.
- Scott PM, Lau BP, Lawrence GA, Lewis DA.** Analysis of *Ginkgo biloba* for the presence of ginkgotoxin and ginkgotoxin 5'-glucoside. *Journal of AOAC International* 2000;83(6):1313-1320.
- Scott RC, Surtees RAH, Neville BGR.** Status epilepticus: pathophysiology, epidemiology, and outcomes. *Archives of disease in childhood* 1998;79(1):73-77.
- Scott TC, Phillips MA.** Characterization of *Trypanosoma brucei* pyridoxal kinase: purification, gene isolation and expression in *Escherichia coli*. *Molecular and biochemical parasitology* 1997;88(1-2):1-11.
- Shannon M, McElroy EA, Liebelt EL.** Toxic seizures in children: case scenarios and treatment strategies. *Pediatric emergency care* 2003;19(3):206-210.
- Smith JV, Luo Y.** Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. *Applied microbiology and biotechnology* 2004;64(4):465-472. Epub 2004 Jan 2022.
- Snodgrass SR.** GABA and epilepsy: their complex relationship and the evolution of our understanding. *Journal of child neurology* 1992;7(1):77-86.
- Spector R, Greenwald LL.** Transport and metabolism of vitamin B₆ in rabbit brain and choroid plexus. *The Journal of biological chemistry* 1978;253(7):2373-2379.

- Spinella M.** Herbal medicines and epilepsy: The potential for benefit and adverse effects. *Epilepsy & behavior* : E&B 2001;2(6):524-532.
- Stahl.** Dünnschichtchromatographie Ein Laboratoriumshandbuch. 2. Auflage Berlin-Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1967.
- Steyn PS, Vleggaar R, Anderson LAP.** Structure elucidation of two neurotoxins from *Albizia tanganyicensis*. *South African journal of chemistry. Suid-Afrikaanse tydskrif vir chemie* 1987;40(3):191-192.
- Stolz J, Vielreicher M.** Tpn1p, the plasma membrane vitamin B₆ transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(21):18990-18996.
- Stromgaard K, Nakanishi K.** Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba*. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 2004;43(13):1640-1658.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW.** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology* 1990;185:60-89.
- Tagaya M, Yamano K, Fukui T.** Kinetic studies of the pyridoxal kinase from pig liver: slow-binding inhibition by adenosine tetraphosphopyridoxal. *Biochemistry* 1989;28(11):4670-4675.
- Tapia R, Pasantes H.** Relationships between pyridoxal phosphate availability, activity of vitamin B₆ -dependent enzymes and convulsions. *Brain research* 1971;29(1):111-122.
- Tapia R, Perez de la Mora M, Massieu GH.** Correlative changes of pyridoxal kinase pyridoxal-5'-phosphate and glutamate decarboxylase in brain, during drug-induced convulsions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1969;166(1):257-266.
- Teuscher E.** Biogene Arzneimittel. 5. Auflage Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1997.
- Tillakaratne NJ, Medina-Kauwe L, Gibson KM.** gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology* 1995;112(2):247-263.
- Treiman DM.** GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 2001;42(Suppl 3):8-12.
- Tunnicliff G, Ngo TT.** Functional modification of proteins of the nervous system by pyridoxal 5'-phosphate. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 1998;8(3):117-129.

- Vogelstein B, Gillespie D.** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1979;76(2):615-619.
- Wada H, Snell EE.** The enzymatic oxidation of pyridoxine and pyridoxamine phosphates. The Journal of biological chemistry 1961;236(7):2089-2095.
- Wada K, Haga M.** *Ginkgo Biloba*- A global Treasure, from biology to medicine. Tokyo,Japan: Springer; 1997.
- Wada K, Ishigaki S, Ueda K, Sakata M, Haga M.** An antivitamin B₆, 4'-methoxy-pyridoxine, from the seed of *Ginkgo biloba* L. Chemical & pharmaceutical bulletin 1985;33(8):3555-3557.
- Wada K, Ishigaki S, Ueda K, Take Y, Sasaki K, Sakata M, et al.** Studies on the constitution of edible and medicinal plants. I. Isolation and identification of 4'-O-methylpyridoxine, toxic principle from the seed of *Ginkgo biloba* L. Chemical & pharmaceutical bulletin 1988;36(5):1779-1782.
- Werning C.** Medizin für Apotheker. 2. Auflage Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1997
- Wertman KF, Wyman AR, Botstein D.** Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. Gene 1986;49(2):253-262.
- Wichtl M, Czygan F-C, Frohne D, Hiller K, Hölzel C, Nagell A, et al.** Teedrogen und Phytopharmaka. 4. Auflage Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2002.
- Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC,** GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. Annals of neurology 2003;54(Suppl 6):S3-12.
- Wrenger C, Eschbach M-L, Muller IB, Warnecke D, Walter RD.** Analysis of the vitamin B₆ biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. The Journal of biological chemistry 2005;280(7):5242-5248.
- Yagi M, Wada K, Sakata M, Kokubo M, Haga M.** [Studies on the constituents of edible and medicinal plants. IV. Determination of 4-O-methylpyridoxine in serum of the patient with gin- nan food poisoning]. Yakugaku zasshi. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 1993;113(8):596-599.
- Yanai A, Minami M, Takano Y, Endo T, Hamaue M, Wada K, et al.** 4'-O-Methylpyridoxine-induced convulsion in guinea pigs and rats. Life science advances 1990;107:1499-1500.

Yang Y, Tsui HC, Man TK, Winkler ME. Identification and function of the *pdxY* gene, which encodes a novel pyridoxal kinase involved in the salvage pathway of pyridoxal 5'- phosphate biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 1998;180(7):1814-1821.

Yang Y, Zhao G, Winkler ME. Identification of the *pdxK* gene that encodes pyridoxine (vitamin B₆) kinase in *Escherichia coli* K-12. *FEMS microbiology letters* 1996;141(1):89-95.

7 Anhang

7.1 Sequenzen

7.1.1 SEQUENZ DES REKOMBINANTEN VEKTORS PMAL-c2X-PKH

CCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATG
 TGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGACAGATATGCCGGTGTCTCTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCA
 GCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATCCCAACCAGCGTGGCACA
 ACAACTGGCGGGCAAAACAGTCTGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGAAAATTGTCG
 CGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCAAGCCTGT
 AAAGCGGCGGTGCACAACTTCTCGCGCAACGCGTCAAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATT
 GCTGTGGAAGTGCCTGCTACTAATGTTCCGGCGTATTCTTGTATGCTCTGACCAGACCCCATCAACAGTATTATTTCTC
 CCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTACCAGCAAATCGCGCTGTAGCGGGCCATT
 AAGTTCTGTCTCGGCGCTGTGCTGTGGCTGGCTGGCATAAATATCTACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACG
 GGAAGGCGACTGGAGTGCATGTCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCACTGCGATGCT
 GGTGGCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCAGTCCGGGCTGCGCGTGGTGGGATATCTCGGT
 AGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGG
 CAAACCAGCGTGGACCGTGTGCAACTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCGCTCACTGGT
 GAAAAGAAAAACCACCTGGCGCCCAATACGAAACCCTCTCCCCGCGCTGGCCGATTCATTAATGACAGTGGCAC
 GACAGGTTTCCGACTGAAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACAATTCTCA
 TGTTTGACAGTTATCATGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGT
 GCAGGTCGTAATCACTGCATAATTCGTGTGCTCAAGGCGCACTCCGTTCTGGATAATGTTTTGCGCCGACATCATAA
 CGGTTCTGGCAATATCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACA
 ATTTACACAGGAAACAGCCAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGACACTTACCAACAAGGACCATAGCATATGAAAATCGA
 AGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAAATTCGAGAAA
 ATACCGGAATTAAGTCAACGTTGAGCATCCGGATAAAGTGAAGAGAAAATTCACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGC
 CCTGACATTATCTTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGACAAA
 GCGTTCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCGGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTG
 AAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAAACCCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAG
 AACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCCTACTTACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGAC
 GGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAGACGTTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAAGCGGG
 TCTGACCTTCTGTTGACCTGATTAAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTAAT
 AAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAA
 GGTACTGCCGACCTTCAAGGTCAACCATCAAACCGTTCGTTGGCGTGTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAA
 CAAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAAACCGC
 TGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTGGCGAAAGATCCAGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCCG
 AAAGGTGAAATCATGCCAACATCCCGCAGATGTCGCTTCTGGTATGCGGTACTGCGGTGATCAACGCCCGCAGC
 GGTGCTCAGACTGTGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAAACAACAATAACAATAACAA
 CAACCTCGGGATCGAGGGAAGGATTCAGAATTCGGATCCAGGCCCGGATGGAGGAGGAGTGCCGGGTGCTCTCCATAC
 AGAGCCACGTCATCCGCGGCTACGTGGGCAACCGGCGGCCACGTTCCCGCTGCAGGTTTTGGGATTGAGATTGACCGG
 GTGAACCTGTCCAGTTTTCAAACCACACAGGCTATGCCACTGGAAGGGCCAAGTGTGAATTCAGATGAGCTCCAGGA
 GTTGACGAAGGCTGAGGCTGAACAACATGAATAAATATGACTACGTGCTCAGGTTATACGAGGGACAAGTCTTCTCCT
 GGCTATGGTGGTGGACATTGTGACAGGAGCTGAAGCAGCAGAACCCAGGCTGGTGTGACGTGTGTGACATCAAGCTTGGGTG
 ACAAGTGGGACGGCGAAGGCTCGATGTACGTCCCGGAGGACCTCCTTCCCGTCTACAAAAGAAAAGTGGTGGCGCTTGCA
 GACATTATCACGCCAACCAAGTTTGGAGCCGAGTTACTGAGTGGCCGAAGATCCACAGCCAGGAGGAAGCCTTGGCGGT
 GATGGACATGCTGCACTTATGGGCCCGACACCGTGGTCAACAGCTCCGACCTGCCCTCCCCGACGGGACGAACTA
 CCTGATTGTGCTGGGGAGTCAGAGGAGGAGGAATCCCGTGGCTCCGTGGTGTGGAACGCATCCGGATGGACATTCGCA
 AAGTGGACGCCGCTTTGTGGGCACTGGGACCTGTTGCTGCCATGCTCTGGCGTGGACACACAAGCACCCCAATAAC
 CTAAGGTGGCTGTGAGAAGACCGTGTCTACCTTGACCCAGTTCAGACAGTTCGAGAGGACCATCCAGTGTGCAAAAAGCCAGGC
 CGGGGAAGGAGTGAAGGCCAGCCCATGCACTGGAGCTGCGGATGGTGCAGAGCAAAAAGGACATCGAGGACCCAGA
 GATCGTCTCAGGCCACGGTGTGTGAGGGCCCCGCGCTCGCCGTGACACGCAGCGCTTGGTGTCTCCGTGTTTGT
 CCCTGATGACAGTTCGCGGCCGCGACTCTAGAGTGCACCTGCAGGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTG
 ACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
 CCCCACCGATGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGATAAGA
 TTTTACGCTGATACAGATTAATAACAGACGAGAAAGCGCTTGATAAAAACAGAAATTTGCTGGCGCCAGTACCGCGGTGG
 TCCCACCTGACCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAACGCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTA
 GGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTATCTGTTGTTGTGCGGTGAA
 CGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGAGGGTGGCGGGCAGGA
 CGCCCGCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTCGCTTTCTACAAACTCTTT
 TTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATATGAAAAAG
 GAAGAGTATGAGTATTAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCAATTTGCTCTTCTGTTTGTACCCAG
 AAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGT
 AAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTCCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTAT
 CCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGATACACTATTCTAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTCA

CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCA
 ACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTG
 ATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACG
 TTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
 CAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG
 GTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
 TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTACAGACCAAGTTTACTCATATATA
 CTTTAGATTGATTTACCCCGTTGATAATCAGAAAAGCCCCAAAAACAGGAAAGATTGTATAAGCAAAATATTTAAATTTGAAA
 CGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAAATTTTGTAAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAAATCCC
 TTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGACCTGGGA
 CTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTTGGG
 GTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAAGC
 TGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAA
 CCACCACACCCGCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
 CAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT
 TTTCTGCGCTAATCTGCTGTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTAAC
 AACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCA
 CCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG
 TCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGTGAACGGGGGGTTCTGTGCAC
 ACAGCCAGCTTGAGGCGAACGACCTACACCGAAGTGAAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCG
 AAGGGAGAAAGGGCGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAA
 ACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTGAGCGTCCGATTTTGTGATGCTCGCAGGGGGGGC
 GAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTCTGCTGGCCTTTTGTGCTCATATGTTCTTTCT
 GCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCCTCGCCGACGCCAAGCAGCCGAGC
 GCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCC
 GCATATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATAACTCCGCTATCGTACGTGACTG
 GGTATGGTGCGCCCGACACCCGCCAACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAG
 ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGTTTTACCGTCAACCGAAACGCGGAGGCAGCTGCGGT
 AAAGTCAACAGCGTGGTCTGTCAGCGATTACAGATGTCTGCTGTTCCATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAA
 GCGTTAATGTCTGGCTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGTTTTTCTGTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGG
 GGGATTTCTGTTATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTACTGATGATGAACATGCC
 CGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGGCGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATG
 CCAGCGCTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTCGGATGCAGATCCGGAACATAATGTT
 GCAGGGCGTCACTTCCCGTTCCAGACTTTACGAAACACCGAAACCGAAGACCATTATGTTGTCTAGGTCCGAG
 ACGTTTTGCAGCAGCAGTCTGCTTACGTTGCTGCGTATCGGTGATTCACTTCTGTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGC
 CTAGCCGGTCTCAACGACAGGACGATCATGCGCACCCGTGGCCAGGACCCAACGCTGCCCGAAAT

Abbildung 7.1 Sequenz des rekombinanten Vektors pMAL-c2X-PKH
 Die für die menschliche Pyridoxal-Kinase kodierende DNA-Sequenz ist rot dargestellt.

Die aufgeführte Sequenz befindet sich auch auf der beiliegenden CD-ROM unter Vektoren/
 rekombinante Plasmide/Sequenzen/.

7.1.2 SEQUENZ DES REKOMBINANTEN VEKTORS PET-IIA-PKH

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATA
 TACATATGGAGGAGGAGTCCCGGTTGCTCTCCATACAGAGCCACGCTATCCCGGCTACGTGGGCAACCGGGCGCCACG
 TTCCCGTGCAGTTTTGGGATTTGAGATTGACCGGTGAACCTGTCCAGTTTTCAAACACACAGGCTATGCCACTGG
 AAGGGCCAAGTGTGAATTCAGATGAGCTCCAGGAGTTGTACGAAGGCCTGAGGCTGAACAACATGAATAAATGACTAC
 GTGCTCACAGGTTATACGAGGGACAAGTCGTTCTGGCCATGGTGGTGGACATTGTGCAGGAGCTGAAGCAGCAGAACC
 CAGGCTGGTGTACGTGTGTATCCAGTCTTGGGTGACAAGTGGGACGGCGAAGGCTCGATGTACGTCCCGGAGGACCTCC
 TTCCCGTCTACAAAGAAAAAGTGGTGCCGCTTCGAGACATTATCACGCCAACCAAGTTTGTAGGCCGAGTTACTGAGTGGC
 CGGAAGATCCACAGCCAGGAGGAAGCCTTGGGGTATGGATGCTGCACTCTATGGGCCCCGACACCGTGGTCAATC
 CAGCTCCGACTGCCCTCCCGCAGGGCAGCAACTACCTGATTGTGCTGGGAGTCAAGAGGAGGAATCCCGTGGCT
 CCGTGGTGTGGAACGCATCCGGATGGACATTCCGAAAGTGGACGCCGCTTTGTGGGCACTGGGGACCTGTTTGTGCTCCA
 TGCTCCTGGCGTGGACACACAAGCACCCCAATAACCTCAAGGTGGCTGTGAGAAGACCGTGTCTACCTGCACCACGTT
 CTGCAGAGGACATCCAGTGTGCAAAAAGCCAGGCCGGGAAGGAGTGAAGGCCAGCCCATGCAGCTGGAGCTGCGGA
 TGGTGCAGAGCAAAAAGGACATCGAGGACCCAGAGATCGTCTCAGGCCACGGTGTGTGAGGGCCCCGCCGCTCGCC
 CGTGACACGACGCGCTGGTGTCTCCGTGTTTGTCCCTGATGCAAGTGGCGGCGGACTAGAGGATCCGGCTGCTAA
 CAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGTGAAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGG
 TCTTGAAGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAATAATCCGGATATCCCGAAGAGGCCCGGACGATACCGGCATAACCAAGCC
 TATGCCTACAGCATCCAGGGTACGGTGGCAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTACATACCGGTGCTGACTGCG
 TTAGCAATTAAGTGTGATAAATACCGCATTAAGCTTATCGATGATAAAGCTGTCAAACATGAGAATCTTGAAGACGAAA
 GGGCCTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCCGGGAA
 ATGTGCGCGAACCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGATAAATGC

TTCAATAATATGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTGCTTC
 CTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAA
 CTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCATTTTAAAGTTCTG
 CTATGTGGCGCGGTATATCCCGTGTGACGCGCGGCAAGAGCAACTCGTTCGCCGCATACACTATCTCAGAATGACTTG
 GTTGAGTACTACACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAAGTGTGCCATAACCATG
 AGTGATAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGTTTTTGCACAACATGGG
 GGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC
 CTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTG
 GATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGC
 CGGTGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACG
 GGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCA
 GACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGAT
 AATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCT
 TGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATC
 AAGAGCTACCAACTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGT
 AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAG
 TGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGGCAGCGGTGCGGGTGAACGGGGG
 GTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCC
 ACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
 CAGGGGGAAACGCTTGGTATCTTATAGTCTGTGCGGTTTTCCGCACTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTC
 AGGGGGGCGGACCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGCCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTACAT
 GTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGTTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCGAA
 CGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
 ATTTACACCCGATATATGGTCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGC
 TACGTGACTGGGTATGGTCTGCGCCCCGACACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCAT
 CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGACAGAGTTTACCCGTCATACCCGAAACGCGCGAGG
 CAGCTCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTAAGCGATTCACAGATGTCTGCTGTTTATCCGCTCCAGCTCGTTGAGT
 TTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCT
 CCGTGTAAAGGGGATTTCTGTTTATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATG
 ATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGGCGGACCAGAGAAAATCACT
 CAGGGTCAATGCCAGCGCTTCTGTTAATACAGATGATGTTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGG
 AACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAAACCGAAGACCATTATGTTGTTGCT
 CAGGTCCGACAGCTTTTGCAGCAGCAGTCTGCTTACGTTCCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCCAGTAAGGCAA
 CCCCAGCCAGCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCGCACCCGTGGCCAGGACCAACCGCTGCCGAGAT
 GCGCCGCGTGGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGGCATTACAGTTCTCCG
 CAAGAATTGATTGGCTCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGCTTCCATTACAGGTGAGGTGGCC
 CGGCTCCATGCACCCGACGCAACGCGGGGAGGACAGACAAGGTATAGGGCGGCGCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCA
 TGTGCTCGCCGAGGCGGCATAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAGTGCAGAGTTAGGCTGGTAAGAGCCGCGAGCG
 ATCTTGAAGTGTCCCTGATGGTCTGCTATCTACCTGACAGCAGTGGCCTGCAACGCGGGATCCCGGACCCGCGGAG
 AAGCAGAGAAGAATCATAATGGGGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACCCGAGCAAGACGTAAGCAGCTGCGG
 CGCATGCCGGGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGGAGCGGGCGT
 GCAAGATTCCGAATACCCGAAGCGACAGGCCGATCATGCTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCCGCGGAAAATGACCCAG
 AGCGCTGCCCGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCGCGCC
 CACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAAGTAACTTAC
 ATTAATTGCGTTGCGCTACTGCCCGTTTTCCAGTCCGGAACCTGCTGCGGAGTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGC
 GGGATGCGCGGTTTTGCGCTATGGGCGCCAGGGTGGTTTTCTTTCCACAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTC
 ACCGCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTATGATGGTGGT
 TAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCCGGTATCGTCTGATCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGACGCCGGAC
 TCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCATCTGATCGTTGGCAACAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACG
 ATTTGCATGGTTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCCGCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGA
 GATATTATGCCAGCCAGACGACGACGCGCGGAGACAGAACTAATGGGCCCCTAACACGCGGATTTGCTGGTGC
 CCAATGCGACAGATGCTCCACGCCAGTCCGCTACCGTCTTATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGCTTGGTCA
 AGACATCAAGAAAATAACGCCGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTATCCAGCGGATAGTTAA
 TGATCAGCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCTGTTCTACCATCG
 ACACCACCAGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGGTGCAGGGCCAGA
 CTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTTGCCCGCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCC
 GCCATGCGCGGTTTTCCACTTTTTCCCGGTTTTCCGAGAAAAGCTGGCTGGCCTGGTTACCACGCGGAAAACGGTCTGATA
 AGAGACACCGGATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGC
 TATCATGCCATAACCGGAAAGGTTTTGCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCTGCATTA
 GGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAA
 CAGTCCCCCGCCACGGGGCTGCCACCATAACCCAGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAAGTGGCGAGCCCGATCTT
 CCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCT
 AGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCAAAT

Abbildung 7.2

Sequenz des rekombinanten Vektors pET-11a-PKH

Die für die menschliche Pyridoxal-Kinase kodierende DNA-Sequenz ist rot dargestellt.

Die aufgeführte Sequenz befindet sich auch auf der beiliegenden CD-ROM unter Vektoren/

Die Karte des rekombinanten Vektors befindet sich auch auf der beiliegenden CD-ROM unter Vektoren/rekombinante Plasmide/Vektorkarten.

7.3.2 KARTE DES REKOMBINANTEN PLASMIDES *pET-11a-PKH*

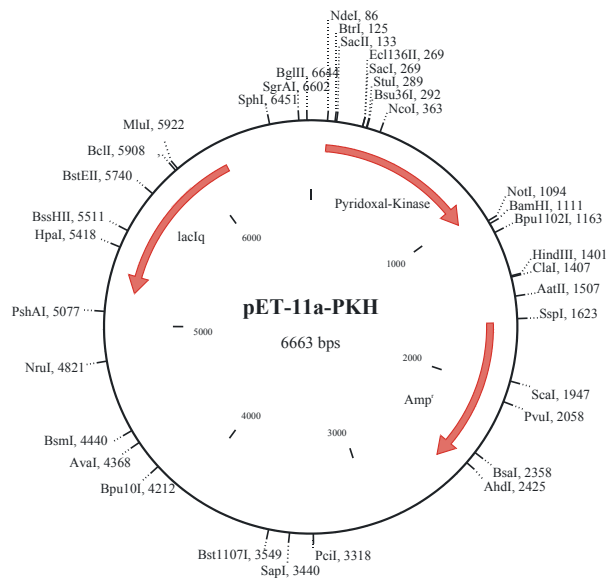


Abbildung 7.4 Karte des rekombinanten Plasmides *pET-11a-PKH*.

Die Karte des rekombinanten Vektors befindet sich auch auf der beiliegenden CD-ROM unter Vektoren/rekombinante Plasmide/Vektorkarten.

7.4 UV-Vis-Spektren

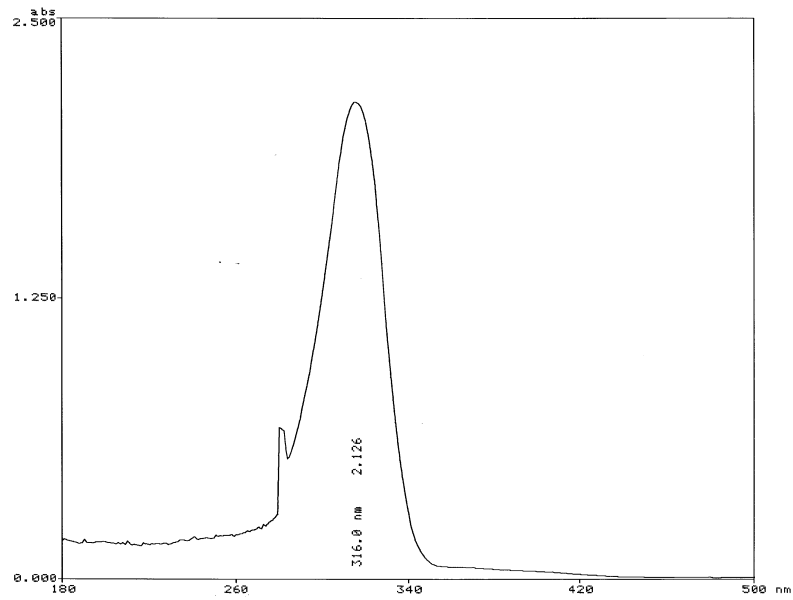
7.4.1 *UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXAL*

Abbildung 7.5 UV-Vis-Spektrum von Pyridoxal

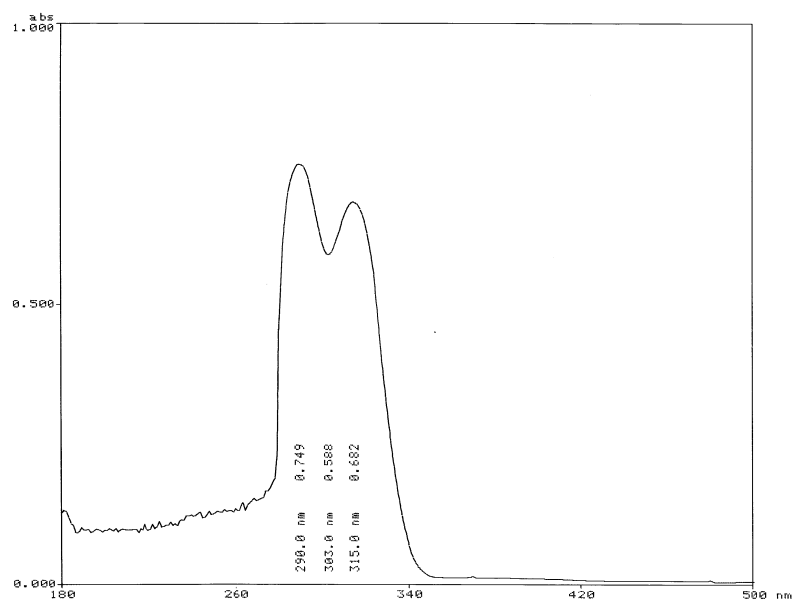
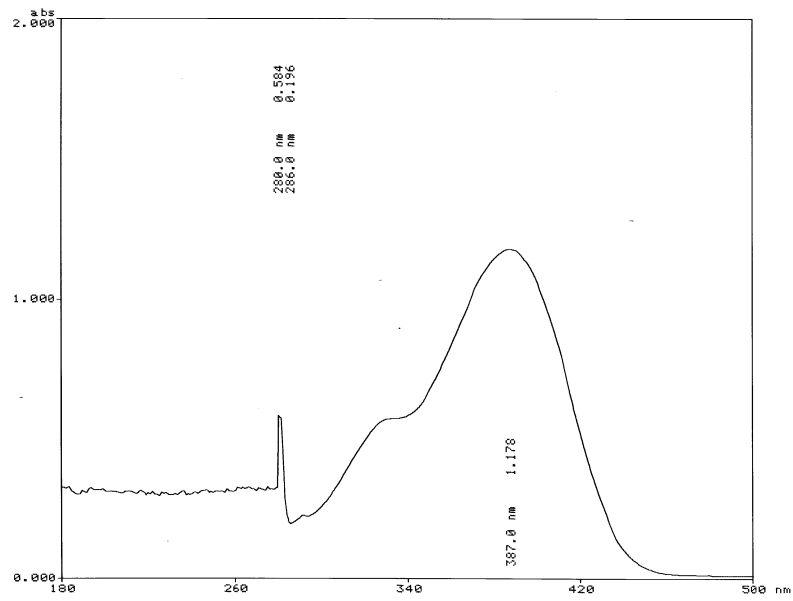
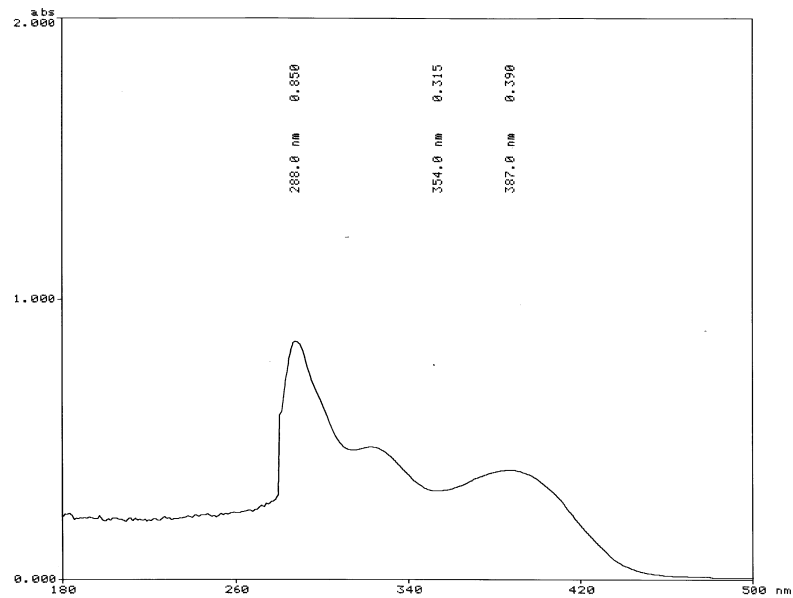
7.4.2 *UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXAL IN n-OCTANOL GESÄTTIGTEM WASSER*

Abbildung 7.6 UV-Vis-Spektrum von Pyridoxal in n-Octanol gesättigtem Wasser

7.4.3 *UV-VIS-SPEKTRUM VON EINER FRISCHEN PYRIDOXAL-5'-PHOSPHAT-LÖSUNG***Abbildung 7.7** UV-Vis-Spektrum von einer frischen Pyridoxal-5'-phosphat-Lösung7.4.4 *UV-VIS-SPEKTRUM VON EINER 24 STUNDEN ALTEN PYRIDOXAL-5'-PHOSPHAT-LÖSUNG***Abbildung 7.8** UV-Vis-Spektrum von einer 24 Stunden alten Pyridoxal-5'-phosphat-Lösung

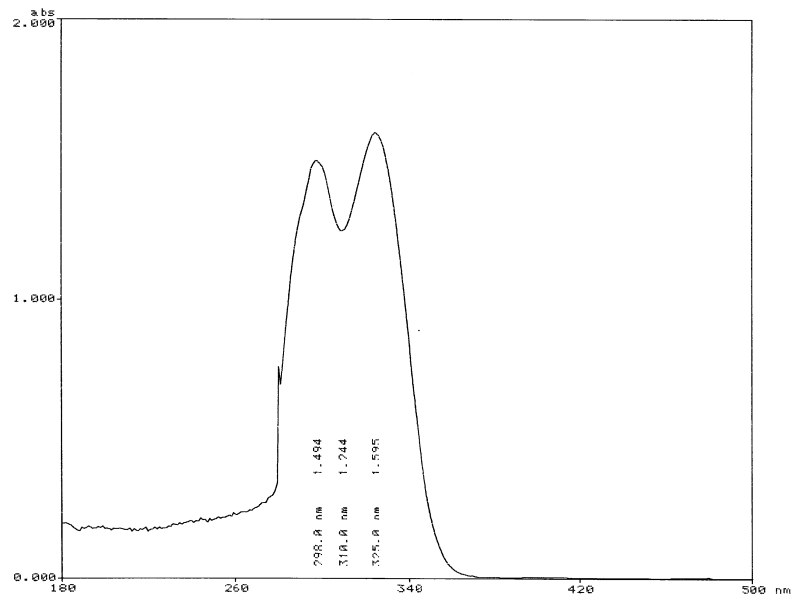
7.4.5 *UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXAMIN*

Abbildung 7.9 UV-Vis-Spektrum von Pyridoxamin

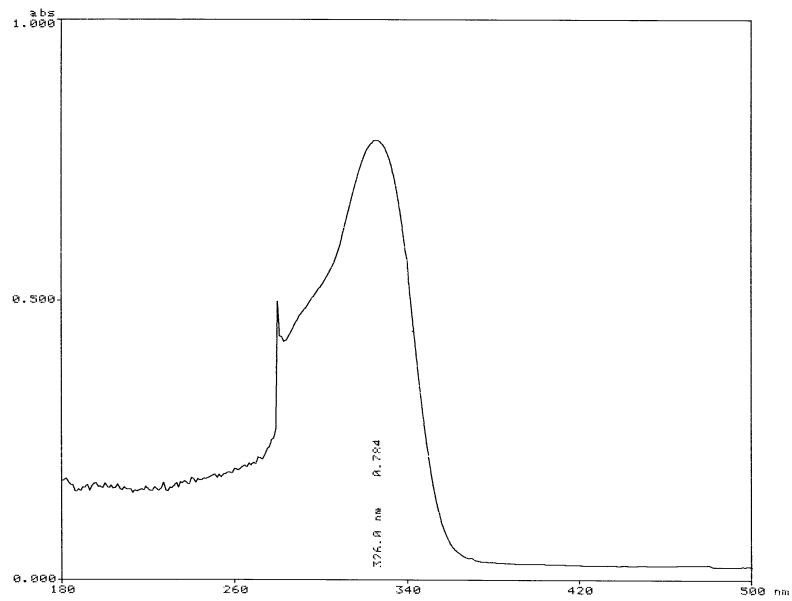
7.4.6 *UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXAMIN-5'-PHOSPHAT*

Abbildung 7.10 UV-Vis-Spektrum von Pyridoxamin-5'-phosphat

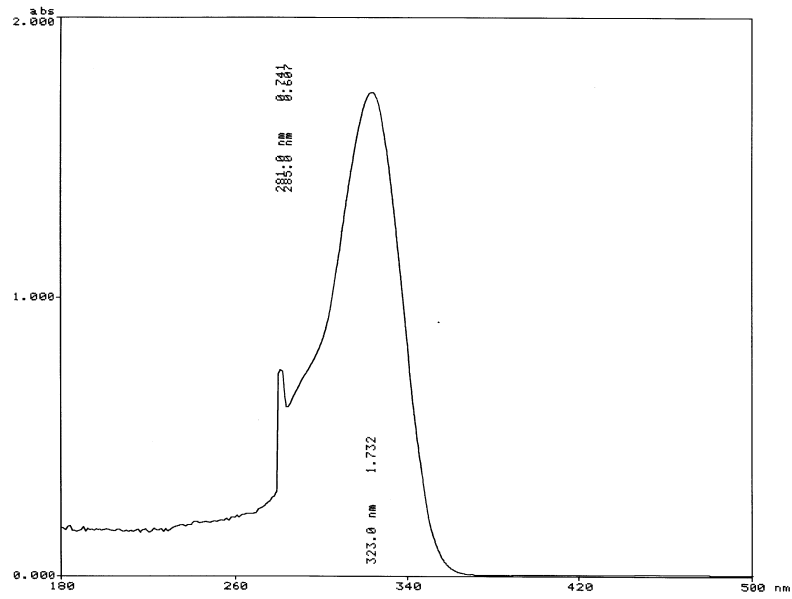
7.4.7 *UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXIN*

Abbildung 7.11 UV-Vis-Spektrum von Pyridoxin

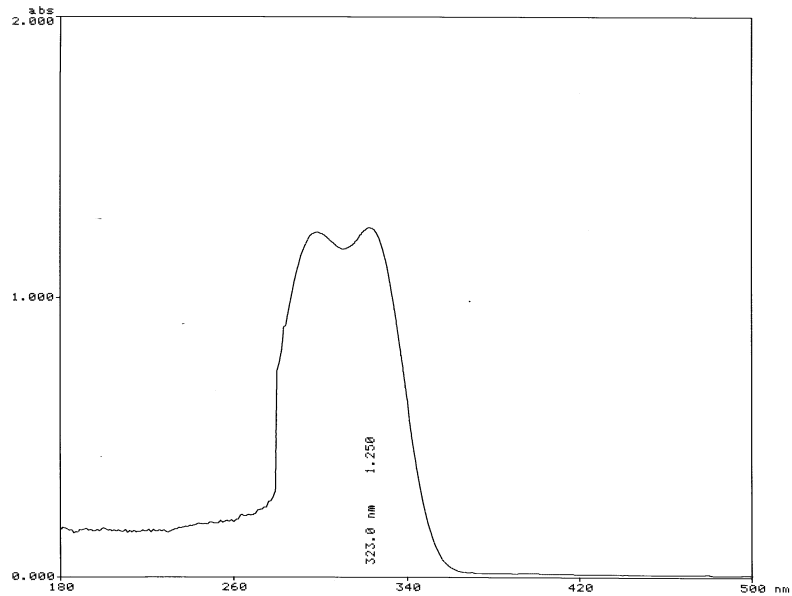
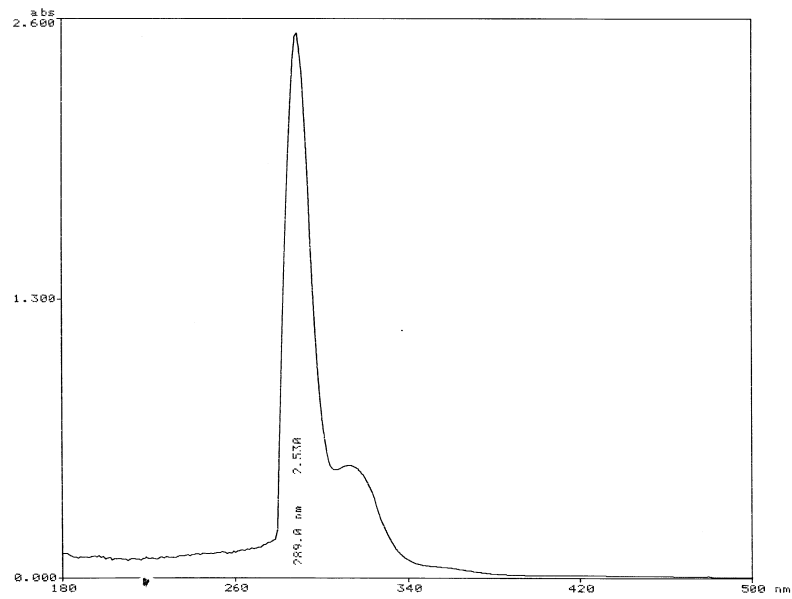
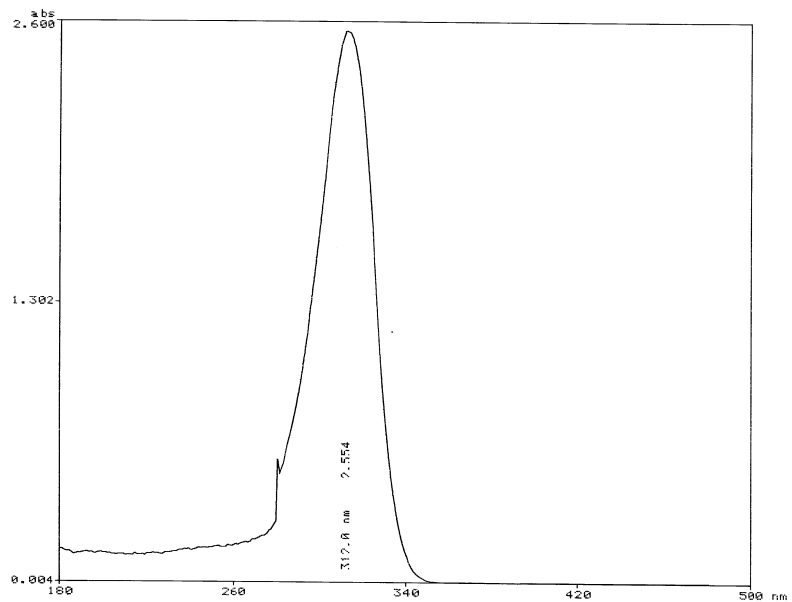
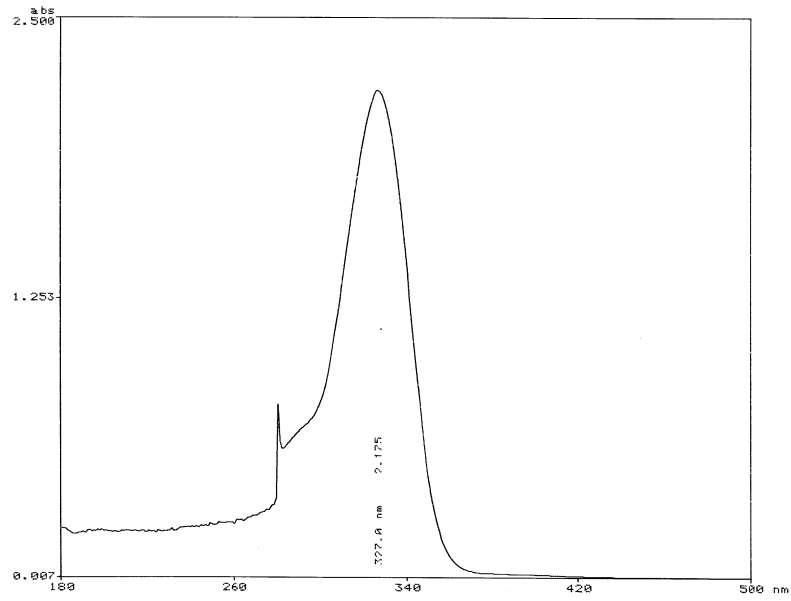
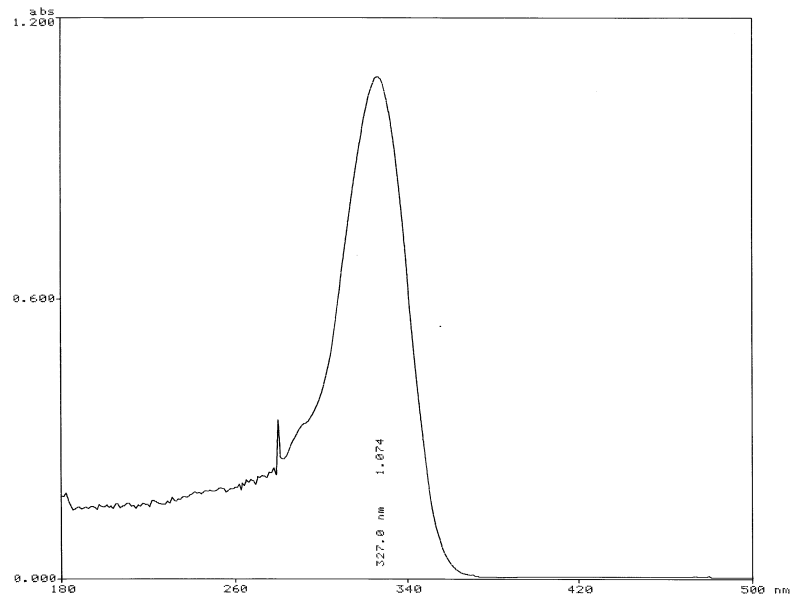
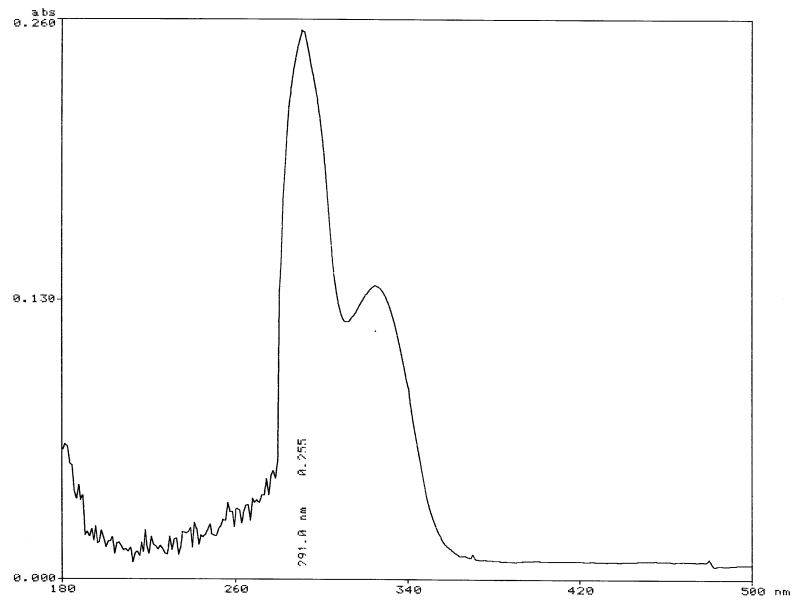
7.4.8 *UV-VIS-SPEKTRUM VON PYRIDOXIN-5'-PHOSPHAT*

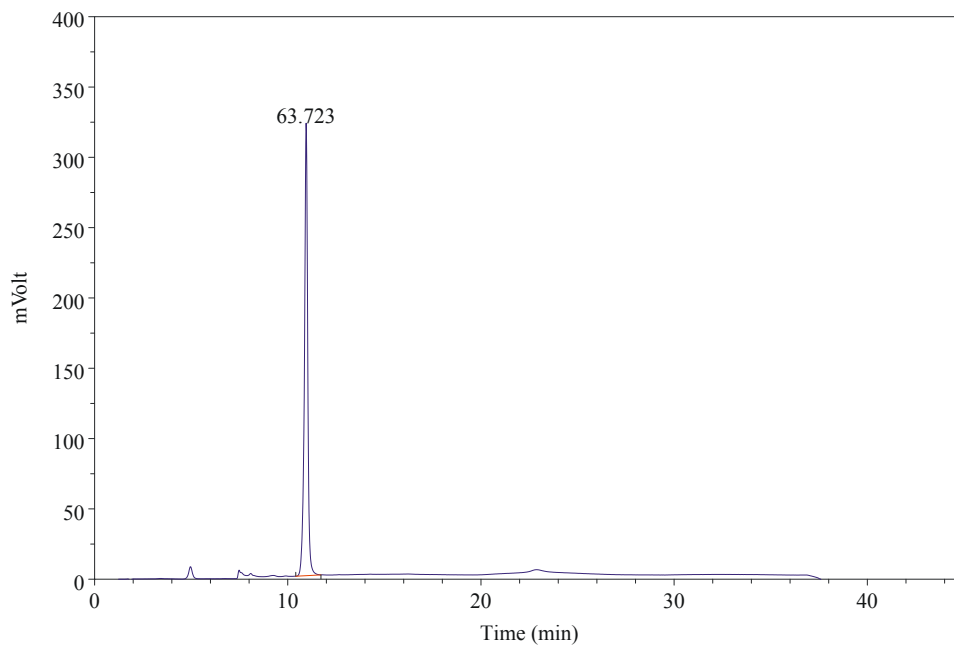
Abbildung 7.12 UV-Vis-Spektrum von Pyridoxin-5'-phosphat

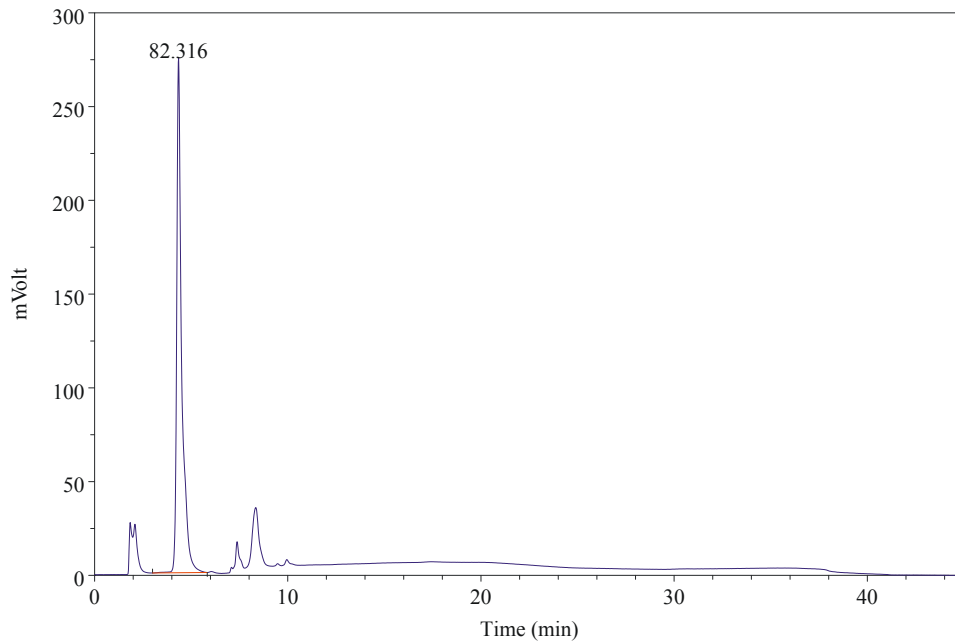
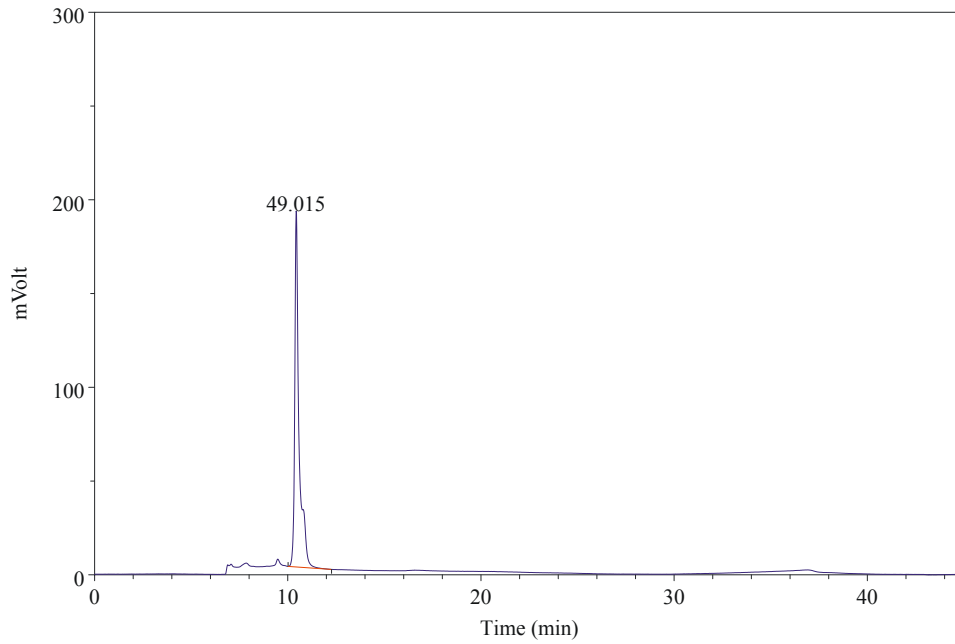
7.4.9 *UV-VIS-SPEKTRUM VON DESOXYPYRIDOXIN***Abbildung 7.13** UV-Vis-Spektrum von Desoxypyridoxin7.4.10 *UV-VIS-SPEKTRUM VON DESOXYPYRIDOXIN-5'-PHOSPHAT***Abbildung 7.14** UV-Vis-Spektrum von Desoxypyridoxin-5'-phosphat

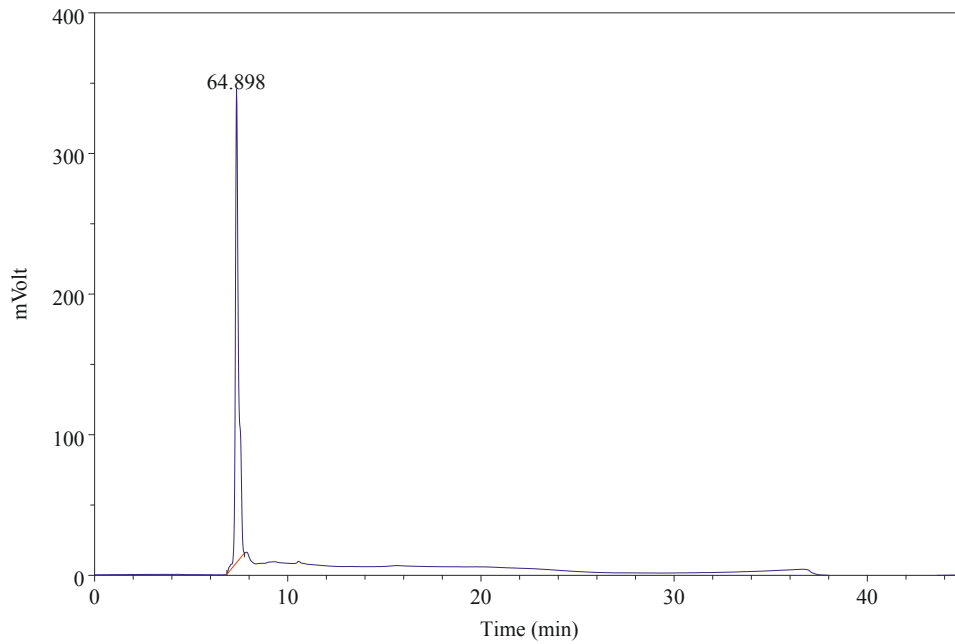
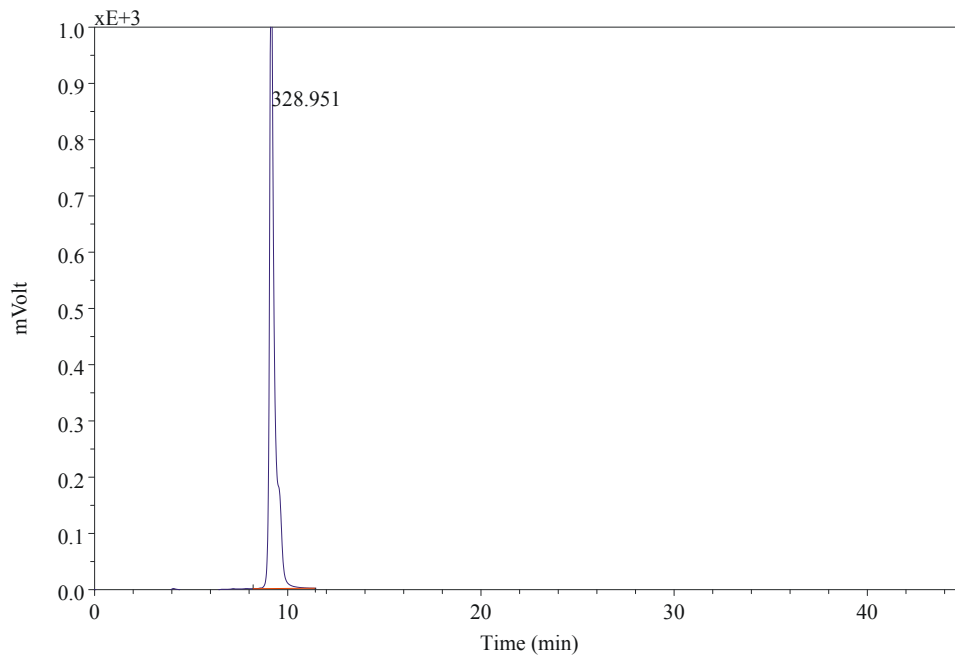
7.4.11 *UV-VIS-SPEKTRUM VON GINKGOTOXIN***Abbildung 7.15** UV-Vis-Spektrum von Ginkgotoxin7.4.12 *UV-VIS-SPEKTRUM VON GINKGOTOXIN IN n-OCTANOL GESÄTTIGTEM WASSER***Abbildung 7.16** UV-Vis-Spektrum von Ginkgotoxin in n-Octanol gesättigtem Wasser

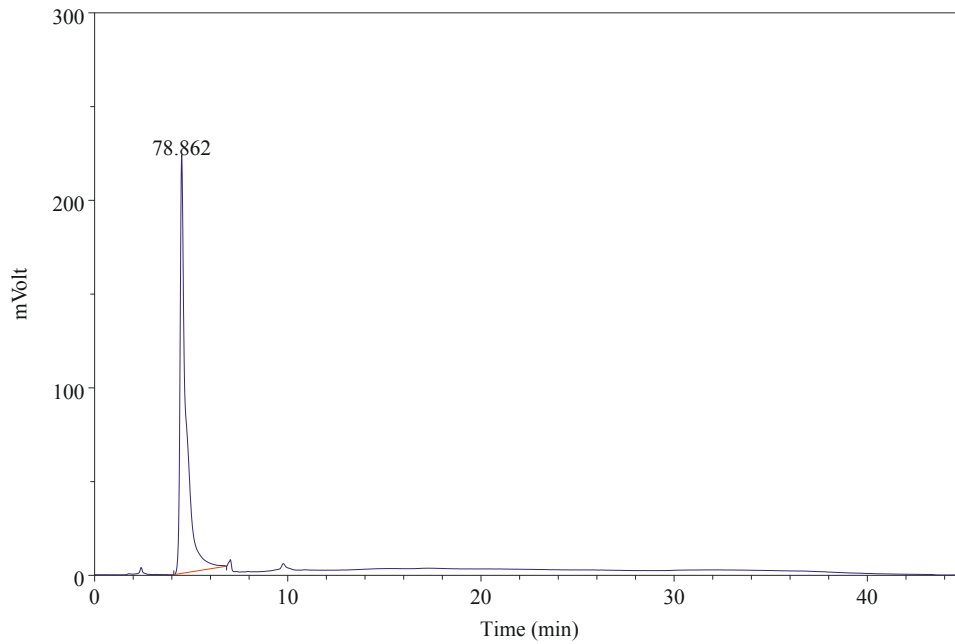
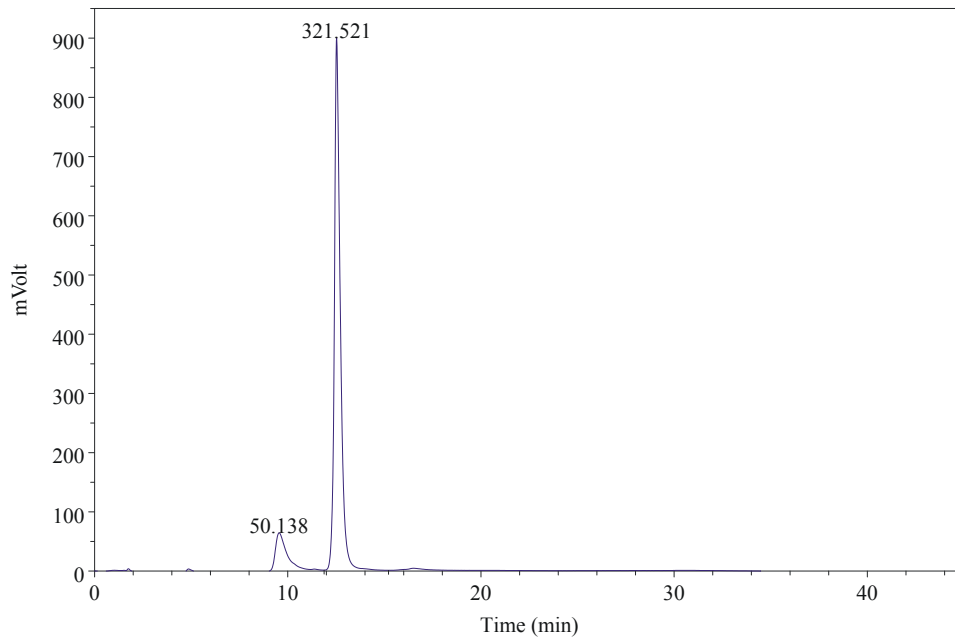
7.4.13 *UV-VIS-SPEKTRUM VON GINGKOTOXIN-5'-PHOSPHAT***Abbildung 7.17** UV-Vis-Spektrum von Ginkgotoxin-5'-phosphat

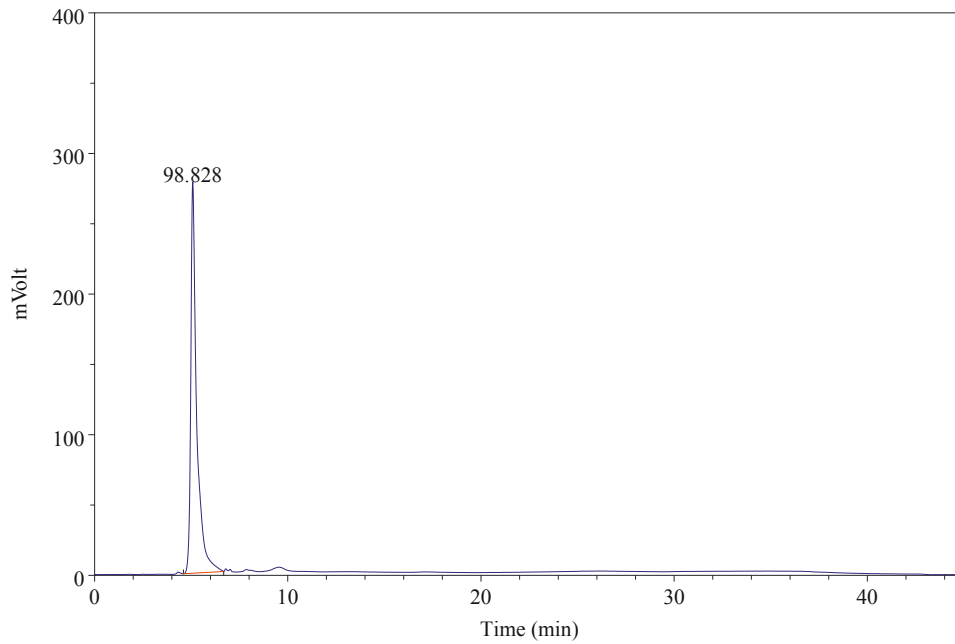
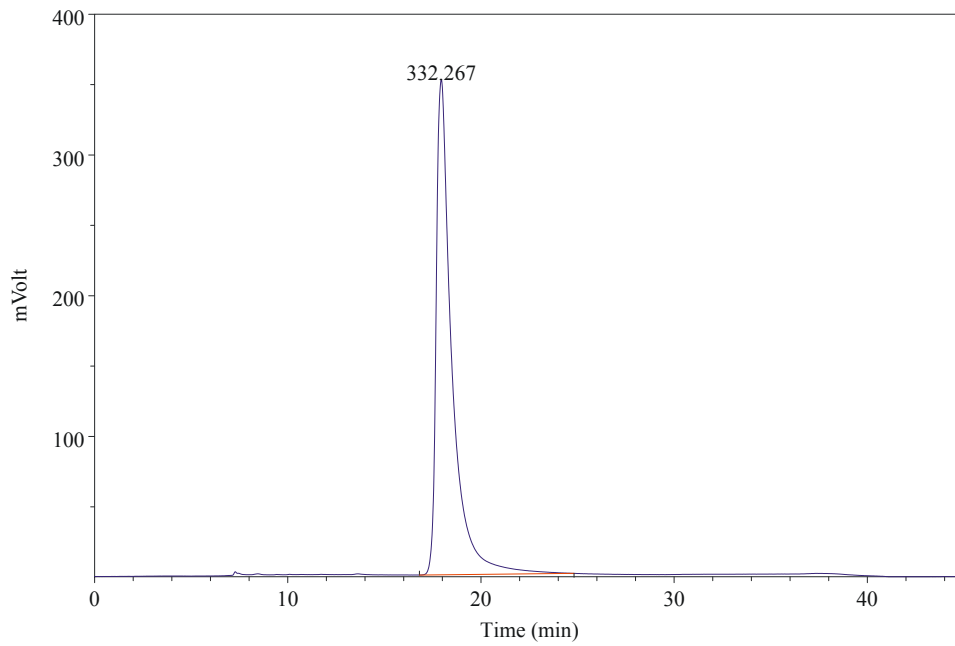
7.5 HPLC-Chromatogramme

7.5.1 *HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXAL***Abbildung 7.18** HPLC-Chromatogramm von Pyridoxal

7.5.2 *HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXAL-5'-PHOSPHAT***Abbildung 7.19** HPLC-Chromatogramm von Pyridoxal-5'-phosphat7.5.3 *HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXAMIN***Abbildung 7.20** HPLC-Chromatogramm von Pyridoxamin

7.5.4 *HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXAMIN-5'-PHOSPHAT***Abbildung 7.21** HPLC-Chromatogramm von Pyridoxamin-5'-phosphat7.5.5 *HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXIN***Abbildung 7.22** HPLC-Chromatogramm von Pyridoxin

7.5.6 *HPLC-CHROMATOGRAMM VON PYRIDOXIN-5'-PHOSPHAT***Abbildung 7.23** HPLC-Chromatogramm von Pyridoxin-5'-phosphat7.5.7 *HPLC-CHROMATOGRAMM VON DESOXYPYRIDOXIN***Abbildung 7.24** HPLC-Chromatogramm von Desoxyypyridoxin

7.5.8 *HPLC-CHROMATOGRAMM VON DESOXYPYRIDOXIN-5'-PHOSPHAT***Abbildung 7.25** HPLC-Chromatogramm von Desoxypyridoxin-5'-phosphat7.5.9 *HPLC-CHROMATOGRAMM VON GINKGOTOXIN***Abbildung 7.26** HPLC-Chromatogramm von Ginkgotoxin

7.5.10 HPLC-CHROMATOGRAMM VON GINGGOTOXIN-5'-PHOSPHAT

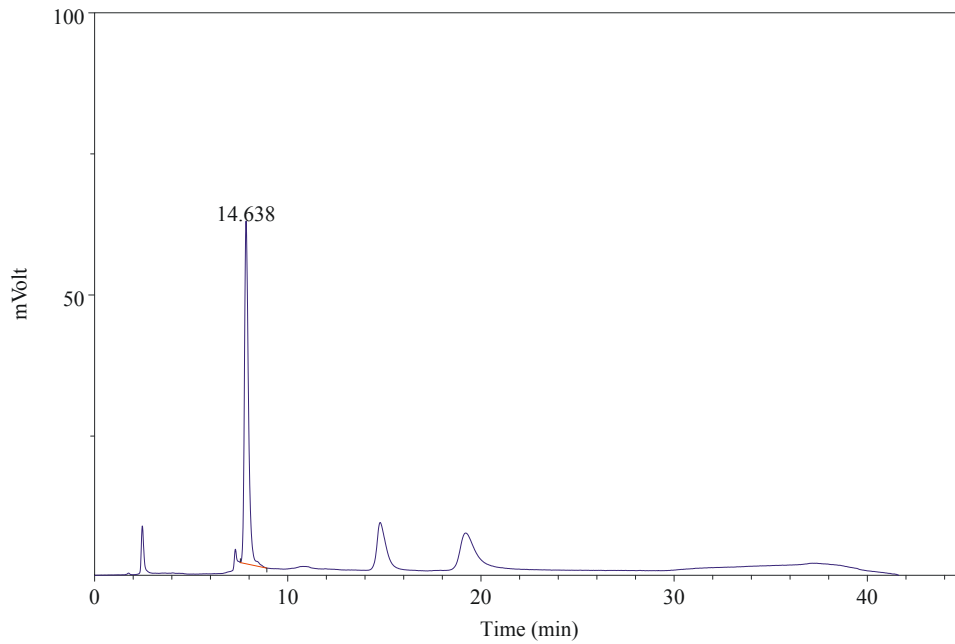


Abbildung 7.27 HPLC-Chromatogramm von Ginkgotoxin-5'-phosphat

7.5.11 HPLC-CHROMATOGRAMM DES FLIEßMITTELS

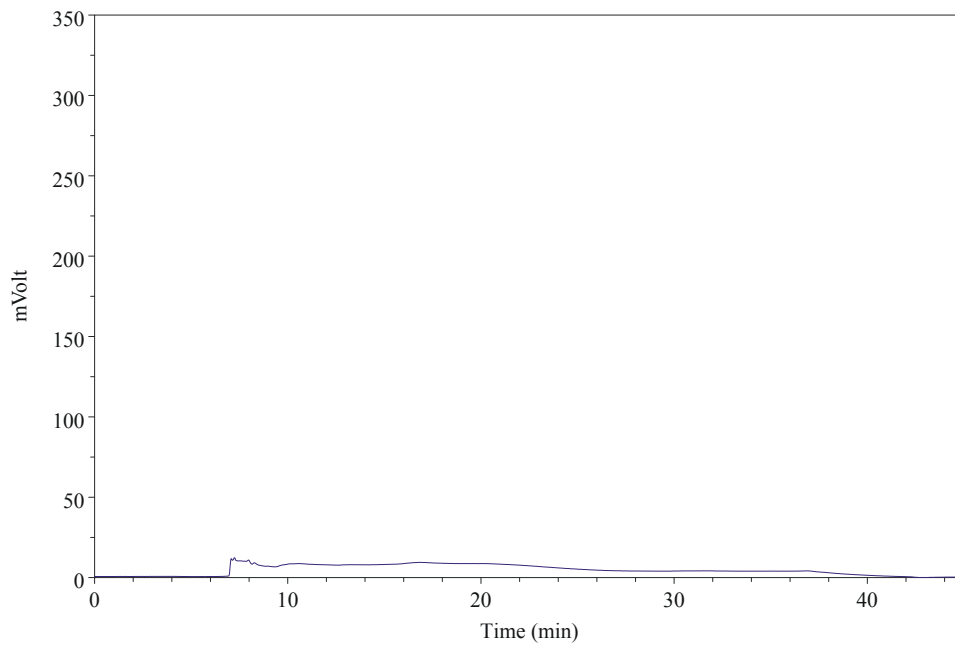


Abbildung 7.28 HPLC-Chromatogramm des Fließmittels

7.6 Herstellerangaben

7.6.1 *QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT, QIAGEN*

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /Herstellerangaben/Qiagen/.

7.6.2 *ABI-PRISM™ 377 GELSYSTEM, APPLIED BIOSYSTEMS*

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /Herstellerangaben/Applied Biosystems/.

7.6.3 *PMAL™ PROTEIN FUSION AND PURIFICATION SYSTEM, NEW ENGLAND BIOLABS*

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /Herstellerangaben/New England Biolabs/.

7.6.4 *EAH-SEPHAROSE 4B, AMERSHAM BIOSCIENCES*

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /Herstellerangaben/Amersham Biosciences/.

7.6.5 *SEPHADEX G15, AMERSHAM BIOSCIENCES*

Die Angaben befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM unter /Herstellerangaben/Amersham Biosciences/.