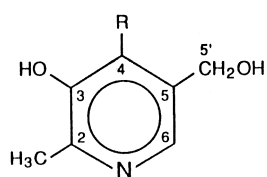


## 1. Einleitung

### 1.1. Vitamin B6

#### 1.1.1. Struktur und biochemische Eigenschaften

Die Bezeichnung Vitamin B6 umfasst eine Gruppe von Derivaten des 3-Hydroxy-2-methylpyridins, welche sich durch unterschiedliche Substitution am C4-Atom voneinander unterscheiden: Die alkoholische Form Pyridoxin (PN), das Aldehyd Pyridoxal (PL) und das Amid Pyridoxamin (PM) (Abb. 1). Des Weiteren werden die 5'-Phosphorsäureester Pyridoxinphosphat (PNP), Pyridoxalphosphat (PLP) und Pyridoxaminphosphat (PMP) dazugezählt. Alle sechs genannten Substanzen besitzen biologische Aktivität in der Ratte; Coenzymfunktion besitzen nur PLP und PMP. Im Organismus können nach Bedarf alle sechs Derivate ineinander überführt werden. Vitamin B6 gehört zu den wasserlöslichen Vitaminen, es wird unter Lichteinfluss rasch inaktiviert, während es gegenüber Hitzeeinwirkung relativ stabil ist. Das Vorliegen in neutraler oder alkalischer Lösung führt zur Zerstörung des Vitamin B6-Komplexes [1].



Pyridoxin R = CH<sub>2</sub>OH

Pyridoxal R = CHO

Pyridoxamin R = CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

**Abb. 1: Chemische Struktur der Vitamin B6-Derivate.** Durch Substitution der angegebenen Reste in C4-Position entstehen die verschiedenen Derivate PN, PL und PM. Durch Esterbindung eines Phosphorsäurerestes in C5-Position entstehen PNP, PLP und PMP.

### 1.1.2. Natürliche Quellen, Bedarf und Vitaminstatus

In Pflanzen und Mikroorganismen erfolgt die Biosynthese des 3-Hydroxy-2-methylpyridins aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Der tierische Organismus kann nach exogener Zufuhr von 3-Hydroxy-2-methylpyridin die wirksamen Derivate der Vitamin B6-Gruppe synthetisieren. Eine ausreichende Zufuhr kann sowohl über pflanzliche Nahrung, in der vorwiegend Pyridoxin vorliegt, als auch über die Aufnahme fleischlicher Nahrung mit überwiegendem Vorliegen von Pyridoxal und Pyridoxamin gewährleistet werden. Der tägliche Bedarf richtet sich aufgrund der Schlüsselfunktion im Aminosäurestoffwechsel nach der Menge aufgenommenen Proteins und wird mit 15-16 µg Vitamin B6 pro Gramm Nahrungsprotein angegeben [2]. Die tägliche Zufuhr sollte für Erwachsene 2,2 mg/d und für Schwangere 2,8 mg/d betragen [3]. In der Regel ist eine ausreichende Aufnahme von Vitamin B6 durch das Getreide in einer normalen Ernährung gewährleistet. Der Gesamtkörperbestand an Vitamin B6 beläuft sich auf 50-150 mg, von denen sich 80% im Muskelgewebe, dem größten Reservoir für PLP, befinden [4]. PLP liegt im Muskel an die Glykogenphosphorylase gebunden vor, im Erythrozyten ist es an Hämoglobin und im Plasma an Albumin gebunden [5,6].

### 1.1.3. Aufnahme und Utilisierung

Die unphosphorylierten Derivate des Vitamin B6 (PN, PL und PM) werden aus der Nahrung aufgenommen und durch passive Diffusion im proximalen Jejunum resorbiert. Die phosphorylierten, hydrophilen Formen PNP, PLP und PMP werden zu einem geringen Teil direkt, zum Großteil nach Dephosphorylierung durch die intestinale alkalische Phosphatase resorbiert [6,7]. In der Mucosazelle findet die Phosphorylierung in der 5'-Position durch die Pyridoxalkinase statt. Der Transport zur Leber über den Blutstrom findet Protein-gebunden in dephosphorylierter Form statt. Im Hepatozyten werden nach erneuter Phosphorylierung die Derivate PNP und PMP zu PLP oxidiert und Albumin-gebunden über das Blut transportiert. Die Aufnahme des PLP durch die periphere Zelle erfolgt wiederum durch passive Diffusion nach Hydrolyse zu PL und nachfolgender intrazellulärer Rephosphorylierung. Neben der Leber verfügen vor allem Erythrozyten und das Gehirn über die vollständige Enzymausstattung des Vitamin B6-Stoffwechsels. Der Muskel ist aufgrund des Fehlens einer Oxidaseaktivität auf das in der Leber gebildete PL angewiesen.

#### 1.1.4. Abbau und Ausscheidung

PL wird in der Leber durch eine FAD-abhängige Aldehydoxidase oder die NAD<sup>+</sup>-abhängige Aldehyddehydrogenase zur inaktiven Pyridoxinsäure oxidiert, welche über die Niere ausgeschieden wird. Die tägliche Ausscheidung an Pyridoxinsäure bei einer normalen, suffizienten Ernährung beträgt 0,4 - 1,2 mg/d [1]. In Zuständen übermäßiger Vitamin B6-Zufuhr werden größere Mengen an Pyridoxinsäure, aber auch geringe Mengen an PN, PM und PL über die Niere ausgeschieden. Der Nachweis der Pyridoxinsäure im Urin gibt damit Aufschluss über die aktuelle Vitaminzufuhr.

#### 1.1.5. Funktionen im Metabolismus

PLP ist ein wichtiges Coenzym des Aminosäurestoffwechsels. Es ist an der Regulation der humoralen und zellulären Immunantwort beteiligt und als Bestandteil der Glykogenphosphorylase wird PLP für die Bereitstellung von Glucose-1-phosphat aus Glykogen benötigt. In den 80er Jahren wurde eine mögliche Rolle des PLP bei der Regulation der Steroid-abhängigen und später auch der Steroid-unabhängigen Genexpression gezeigt.

##### Immunsystem

Vitamin B6-Mangel führt im Immunsystem zu einer Verminderung der Produktion von Interleukin-2 und zu einer verminderten Zell-Lyserate durch natürliche Killerzellen. Zudem kommt es zu einer Reduktion der Lymphozytenproliferation und Abnahme der Anzahl an CD 4<sup>+</sup> T-Helferzellen, sowie einer verminderten Antikörperproduktion. Ein Vitamin B6-Mangel wirkt sich somit sowohl auf die humorale, als auch auf die zelluläre Immunantwort des Organismus aus (s.u. 1.1.7.) [8-10].

##### Coenzymfunktion im Aminosäurestoffwechsel

Als Coenzym des Aminosäurestoffwechsels ist PLP an der Synthese einer Vielzahl von Substanzen (z. B. Neurotransmitter, Entzündungsmediatoren) beteiligt. Zwischen der Aldehydfunktion des PLP und der Aminogruppe der Aminosäure bildet sich eine Schiffsche Base, die, abhängig vom Enzymprotein, verschiedene Umlagerungen (Transaminierungen, Decarboxylierungen und Eliminationen) am alpha-C-Atom der Aminosäure ermöglicht. Die Transaminierung ist dabei der quantitativ wichtigste Beitrag [11,12].

**Tab. 1: Beispiele für PLP-abhängige Decarboxylierungen von Aminosäuren und deren biologisch aktive Produkte.**

Aminosäure	Amin	Bedeutung im Organismus
Aspartat	beta-Alanin	Bestandteil des Coenzym A
Glutamat	GABA	Neurotransmitter
Serin	Ethanolamin	Phospholipidbiosynthese
Histidin	Histamin	Gewebshormon
3,4-Dihydroxyphenyl-Alanin	Dopamin	Neurotransmitter und Vorstufe der Katecholaminbiosynthese

Auswahl weiterer PLP-abhängiger Enzyme:

$\delta$ -Aminolävulinsäuresynthetase:	Hämoglobinsynthese
Lysyloxidase:	Kovalente Quervernetzung der Kollagen- und Elastinmikrofibrillen des Bindegewebes
Serinpalmityltransferase:	Synthese von Sphingomyelin im Rahmen des Aufbaus von Biomembranen
Glykogenphosphorylase:	Abbau von Glykogen zu Glucose-1-Phosphat-Einheiten zur Bereitstellung von Energiereserven
Cystathionin- $\beta$ -Synthetase:	Methioninabbau; bei verminderter Aktivität besteht die Stoffwechselerkrankung Homocystinurie
Cystathionin- $\gamma$ -Lyase:	Methioninabbau; bei verminderter Aktivität besteht die Stoffwechselerkrankung Cystathioninurie

### Modulation der Steroid-vermittelten Genexpression

Die Steroidhormone (Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene, Östrogene, Progesterone) entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an spezifische Regulationssequenzen der DNA, sogenannte Hormone-Response-Elements (HRE). Diese HRE sind den Promotorregionen von hormonregulierten Genen benachbart und bewirken eine Unterdrückung oder Verstärkung der Transkription dieser Gene [13]. Die Bindung an die DNA erfolgt jedoch nicht direkt; sie ist von der Bindung an einen cytosolischen Steroidrezeptor abhängig, der auch den Eintritt des rezeptorgebundenen Hormons in den Zellkern ermöglicht.

Mehrere Beobachtungen legten in den 80er Jahren eine Beeinflussung dieser Mechanismen durch Vitamin B6 nahe:

- 1.) In Vitamin B6-Mangelzuständen wurde der Steroid-Rezeptor-Komplex vermehrt im Zellkern angetroffen [14-16].
- 2.) Die Transkriptionsrate von Steroid-regulierten, nicht PLP-abhängigen Enzymen wurde durch Vitamin B6-Mangel deutlich erhöht, durch einen Überschuss jedoch gehemmt [17,18].
- 3.) Der unter physiologischen PLP-Konzentrationen fest an der DNA gebundene Steroid-Rezeptor-Komplex wurde durch einen PLP-Überschuss von der DNA abgelöst [19,20].

In jüngster Zeit konnten die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und deren Beeinflussung durch PLP beschrieben werden [21-23]. Eine dimere Region des Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes bindet an die DNA, interagiert direkt mit dem Transkriptionsfaktor NF1 und steigert dadurch die Genexpressionsrate. Es konnte nachgewiesen werden, dass PLP mit Anteilen des Glucocorticoid-Rezeptors eine Schiff'sche Base bildet. Dieser PLP-gebundene Komplex scheint in seiner Rezeptorkonformation so verändert zu sein, dass die Interaktion mit NF1 gestört ist und eine Genexpression trotz ausreichender Hormonkonzentrationen gehemmt wird [24]. Erniedrigte PLP-Konzentrationen hingegen erhöhen die Empfindlichkeit der Zielzelle für das Steroid. Weitere Unterstützung erhielten diese Ergebnisse 1995 durch Oka et al., die nachweisen konnten, dass PLP die Genexpression der cytosolischen Aspartataminotransferase über die Inaktivierung der Bindungsaktivität des Glucocorticoid-Rezeptors an die DNA hemmt [25]. Betrachtet man intrazelluläre

Konzentrationen an PLP in verschiedenen Geweben und Zelltypen, so findet man eine breite Variabilität, was eine differenzierte Antwort der verschiedenen Gewebe auf eine bestimmte Serumkonzentration eines Steroidhormones ermöglichen könnte. Es wurde nachgewiesen, dass von den verschiedenen Vitamin B6-Derivaten lediglich PLP Auswirkungen auf die Expression Steroid-regulierter Gene hat [26].

#### Modulation der Steroid-unabhängigen Genexpression

1993 wurden erste Hinweise auf eine zusätzliche, Steroid-unabhängige Beeinflussung der Genexpression durch Vitamin B6 gefunden. Oka et al. (1993) untersuchten hierbei die Aktivitäten der RNA-Polymerase I und II in der Rattenleber. In Lebern Vitamin B6-defizienter Tiere wurden erhöhte Aktivitäten der RNA-Polymerase I und II gefunden, die zu einer generalisierten Steigerung der Genexpression inklusive sogenannter Housekeeping-Gene ( $\beta$ -Actin, Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) führten [27]. Umgekehrt hatten Martial et al. (1975) gezeigt, dass Pyridoxalphosphat in der Rattenleber zu einer Inaktivierung der RNA-Polymerase I und II führte, während in der Bäckerhefe eine Inaktivierung der Polymerase I auftrat [28].

Ein weiterer Mechanismus der Beeinflussung der Genexpression durch PLP wurde 1995 von Oka et al. beschrieben: Der Gehalt an Albumin-mRNA in der Rattenleber unter Vitamin B6-Mangel war im Vergleich zu Kontrolltieren 7-fach erhöht, die Transkriptionsaktivität dieses Gens auf das 5-fache. Der zugrundeliegende Mechanismus wurde durch *in vitro*-Versuche näher untersucht: Die Transkription des Albumin-Gens ist gebunden an mehrere gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren wie HNF-1 und C/EBP. PLP bewirkt dabei eine verminderte Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden spezifischen Oligonucleotide, während die Konzentration der Faktoren konstant bleibt [29]. Untersuchungen der Transkriptionsrate der Albumin-mRNA an der humanen Hepatomzell-Linie HepG2 führten zu vergleichbaren Ergebnissen [30]. Im Rahmen der Untersuchung von mRNA-Konzentrationen der Glykogen-Phosphorylase und von  $\beta$ -Actin in Rattenleber und -muskel konnte erstmals eine organspezifische Modulation der Genexpression beschrieben werden [31]: In Lebern Vitamin B6-defizienter Tiere erhöhte sich die mRNA-Konzentration der Glykogen-Phosphorylase auf das 5-fache, während im Skelettmuskel eine Reduktion auf 40% im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden wurde. Die mRNA-Konzentration des  $\beta$ -Actins, die aufgrund ihrer Konstanz unter verschiedenen physiologischen Einflüssen häufig als interne

Kontrolle herangezogen wird, zeigte sich unter Vitamin B6-Mangel im Muskel unverändert, in der Leber jedoch erhöht.

### **1.1.6. Therapeutische Bedeutung**

Neben der prophylaktischen Substitution von Vitamin B6 bei Risikopatienten, z. B. unter INH-Therapie [32], bei chronischer Niereninsuffizienz mit Hämodialyse und bei schweren Lebererkrankungen [33-35], wird Vitamin B6 bei einigen Erkrankungen angewandt, bei denen die Wirkungsmechanismen unklar sind. So z. B. die Anwendung bei Menstruationsbeschwerden und dem Karpaltunnelsyndrom. Aktuelle Arbeiten haben gezeigt, dass durch die Substitution von Vitamin B6 nach erfolgreicher Coronardilatation mittels PTCA eine verminderte Restenoserate des betroffenen Gefäßes erreicht werden konnte. Ursache hierfür war die Senkung der Homocysteinkonzentration im Plasma durch Vitamin B6-Substitution (s.u. 1.1.7.) [36].

### **1.1.7. Auswirkungen eines Vitamin B6-Mangels auf Organe**

Die Aufnahme von Vitamin B6 ist bei normaler Ernährung in der Regel ausreichend; ein manifester Vitamin B6-Mangel ist extrem selten. Bei Risikopatienten (s.u. 1.1.6.) muss jedoch eine ausreichende Substitution und Überwachung erfolgen. Vitamin B6-Mangelercheinungen wurden in Versuchstieren bereits 1926 durch Goldberger beschrieben. Als Rattenakrodynie bezeichnete er das durch squamöse Hautläsionen, Schwellungen im Bereich der Pfoten und der Ohren der Ratten gekennzeichnete Krankheitsbild. Detailliertere Untersuchungen ergaben multiple Läsionen, in deren Vordergrund Affektionen des Nervensystems, Immunsystems, des endokrinen Systems und des Muskelaufbaus standen [3,37-39]:

- Entmyelinisierung peripherer Nerven, Ataxie und Paresen
- Wachstumsstörungen, Gewichtsverlust
- Gewichtszunahme der Nebennieren, Leber und Milz
- Muskelschwäche, Myokardhypertrophie mit konsekutiver Dilatation und ischämischen Myokardläsionen
- Atrophie der Keimdrüsen
- Hemmung der humoralen und zellulären Immunantwort

In Untersuchungen an freiwilligen Versuchspersonen wurden Auswirkungen des Vitamin B6-Mangels auf den menschlichen Organismus beschrieben. Es traten Gewichtsverluste, Adynamie, Depressionen und Schlaflosigkeit, Erosionen der Haut und Schleimhäute, periphere sensible und motorische Neuropathien, hypochrome Anämie und eine erhöhte Infektanfälligkeit auf [40]. Aufgrund der zentralen Rolle des Vitamin B6 im Aminosäurestoffwechsel, lassen sich folgende Erklärungen für die Mangelsymptome finden: Eine gestörte Aminosäuresynthese und Proteinsynthese führt zu Wachstumsstörungen, Muskelatrophien und Hauterosionen. Die Anämie resultiert aus der Hemmung der Hämsynthese auf der Ebene der PLP-abhängigen  $\delta$ -Aminolävulinsäuresynthetase. Neuropathien können aufgrund eines gestörten Membranaufbaus der Nervenzellen durch eine gehemmte Bildung von Sphingosin entstehen, sowie funktionell aus einer verminderten Transmittersynthese (PLP-abhängige Bildung von z.B. GABA, Dopamin und Serotonin) resultieren. Durch eine Hemmung der PLP-abhängigen Serinhydroxymethyltransferase kommt es zu einer verminderten Bildung von C1-Einheiten, welche u.a. für die Nucleinsäure-synthese, DNA- und mRNA-Synthese benötigt werden. Dies kann sowohl zu einer verminderten Antikörperproduktion, als auch zu einer reduzierten Lymphozytenproliferation führen und bedingt damit die erhöhte Infektanfälligkeit [8-10]. Vitamin B6-Mangel kann zudem ein Krankheitsbild ähnlich der autosomal-rezessiv vererbten Homocystinurie verursachen: Hierbei kann es durch Hemmung der PLP-abhängigen Cystathioninsynthase zu einem Aufstau von Homocystein kommen, welches dann zu Homocystin dimerisiert. Die Akkumulation dieses Disulfids im Blut kann zu Endothelschäden und letztlich zu Gefäßverschlüssen führen. Schnyder et al. (2001) konnten zeigen, dass durch die Gabe von Vitamin B6 in Kombination mit Folsäure in Patienten mit coronarer Herzerkrankung eine Senkung der Homocystein-konzentration erreicht werden konnte und in der Folge die Restenoserate nach PTCA deutlich verringert werden konnte [36].

#### **1.1.8. Alters- und zeitabhängiger Anstieg von Uracilnucleotiden in der Rattenleber unter Vitamin B6-Mangel**

In Vorversuchen dieser Arbeitsgruppe ergaben sich erste Hinweise auf eine Beeinflussung des Uracilnucleotidstoffwechsels durch einen Vitamin B6-Mangel in der Rattenleber. In der Arbeit von A. Renner (2001) [41], die den Einfluss eines Vitamin B6-Mangels auf den Uracilnucleotidgehalt der Rattenleber untersuchte, konnten folgende Veränderungen beschrieben werden:



- 1.) Vitamin B6-Mangel führte bei Ratten, die zu Diätbeginn ein Alter von drei Wochen erreicht hatten, zu einem charakteristischen Anstieg von Uracilnucleotiden und Uracilnucleotidzuckern, sowie von CTP, während andere Nucleotidphosphate unbeeinflusst blieben.
- 2.) Der Anstieg der Uracilnucleotide war abhängig von der Dauer der Mangelernährung: In 3 Wochen alten Jungtieren, die mangelernährt wurden, zeigte sich bereits nach der 1. Diätwoche eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen der Uracilnucleotide, die zwischen der 2. und 3. Woche der Mangelernährung ein Maximum erreichte und dann bis zur 5. Woche unter der Diät wieder auf den Normalbereich zurückfiel.
- 3.) Weiterhin waren diese Beobachtungen altersabhängig: Eine deutliche Erhöhung der Uracilnucleotide trat lediglich bei Jungtieren auf, die zu Beginn der Vitamin B6-Mangeldiät 3 Wochen alt waren, während der Uracilnucleotid-Pool in erwachsenen, zu Beginn der Diät 2 Monate alten Tieren unverändert blieb.
- 4.) Die genannten Veränderungen waren geschlechtsunabhängig.
- 5.) Die Erhöhungen von Uracilnucleotiden und -zuckern sowie CTP im Bereich des Konzentrationsmaximums (nach der 2. Woche Mangelernährung) beliefen sich auf ein Mehrfaches der Konzentrationen, die in Kontrolltieren gefunden wurden (s. Tabelle 2).

**Tab. 2: Darstellung der Faktoren des Konzentrationsanstieges von Uracilnucleotiden und -zuckern sowie CTP in den Lebern von Vitamin B6-Mangelratten.** Die Werte beziehen sich auf Jungtiere, die nach Absetzen vom Muttertier für 2 Wochen ausschließlich Vitamin B6-Mangelfutter erhielten. Daten nach Renner [41].

Substanzen	Faktoren des Konzentrationsanstieges
UTP	6,3
UDP-GlcNAc	4,1
UDP-GalNAc	3,9
UDP-Glc und UDP-Gal	3,1
UDP-GA	1,6
CTP	2,4

## **1.2. Veränderung des Glykosylierungsspektrums von Glykoproteinen bei erhöhten intrazellulären UDP-Zucker-Konzentrationen**

### **1.2.1. Beeinflussung der Sialylierung von Glykoproteinen durch erhöhte Uracilnucleotid-Konzentrationen in Rattenhepatozyten**

Wie unter 3.2.5. beschrieben, wird die Proteinglykosylierung auf verschiedenen Ebenen reguliert: Der Expressionsgrad und die Verteilung von Glykosyltransferasen und Glucosidasen auf intrazelluläre Kompartimente, die Passagezeiten durch die Prozessierungskompartimente Golgi-Apparat und ER und der intrazelluläre UDP-N-Acetylhexosamin-Pool sind offenbar wesentliche Einflussfaktoren. In jüngster Zeit wurden mehrere *in vitro*-Arbeiten veröffentlicht, die eine Änderung des Glykosylierungsspektrums von Glykoproteinen in Abhängigkeit vom intrazellulären UDP-Zuckerpool untersuchten. Pels Rijcken et al. (1995) behandelten Rattenhepatozyten mit Uridin und induzierten damit deutliche Konzentrationssteigerungen von UTP (6,7-fach), UDP-GA (2,5-fach), UDP-Hexosamin (4,6-fach), UDP-Hexosen (3,8-fach) und CTP (2,5-fach), während der CDP-N-Acetylneuraminsäure-Gehalt unverändert blieb [42]. Die Aufnahme von <sup>3</sup>H-markierten Zuckern in Zell-assoziierte Glykokonjugate und Sekretionsproteine in so vorbehandelten Hepatozyten zeigten eine erhöhte Aufnahme von N-Acetylhexosaminen in beiden Fraktionen, während der Sialylierungsgrad der Glykane abnahm.

### **1.2.2. Beeinflussung der Komplexität von N-Glykanen durch den intrazellulären UDP-Zuckerpool in BHK-Zellen**

Vergleichbare Ergebnisse zeigten die Untersuchungen von Grammatikos et al. (1998) an rekombinanten BHK-Zellen, die eine Interleukin-2-Variante exprimierten. Nach Vorbehandlung der Zellen mit Glucosamin und Uridin verschob sich das Glykosylierungsmuster des Interleukin-2 hin zu höhergradig verzweigten Glykanen bei jedoch unverändertem Sialylierungsgrad. Nach Normalisierung des Nucleotidpools auf physiologische Werte zeigte sich eine Rückkehr zum ursprünglichen Glykanmuster [43]. Auch Gawlizek et al. (1998) konnten in BHK-Zellen eine höhere Komplexität der Glykosylierung durch Erhöhung der intrazellulären Uracilnucleotidpools nachweisen [44].