



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Molekulare Mechanismen zur Absorption von
wasserlöslichen Vitaminen und deren
Einflussfaktoren

Verfasserin

Daniela Stieger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, Oktober 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig verfasst und in der Bearbeitung und Abfassung keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Die vorliegende Diplomarbeit ist noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Wien, Oktober 2012

Danke

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen Dank aussprechen, die mich während des Entstehens und Fertigstellens dieser Diplomarbeit in jeder Hinsicht tatkräftig unterstützt haben

- .meinen Dank richte ich zunächst an Herrn Univ. Prof. Dr. Jürgen König für die Bereitstellung des Themas sowie für die professionelle und motivierende Begleitung während des Verfassens dieser Arbeit.
- .besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die mir das Studium ermöglicht haben und mich immer unterstützten und für die erholsamen Tage im Grünen.
- .meiner Schwester Nicole und meiner gesamten Familie danke ich für den Glauben an mich und die wertvoll motivierenden Gespräche.
- .meinen Studienkolleginnen und Freundinnen Anja, Barbara, Martina und Lena für das gewissenhafte Korrekturlesen und die unersetzliche Motivation.
- .Isabel und Bernadette die mit mir alle Höhen und Tiefen durchlebt haben, danke für eure Ermutigungen, emotionale Unterstützung und die vielen kleinen Gesten.
- Doris, Johanna und Tanja, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen sowie für ihre andere Sichtweisen und anspornenden Worte.
- .meinen Arbeitskolleginnen und .kollegen für den Freiraum und Unterstützung in jeder Hinsicht.
- meinem gesamten Freundeskreis, ihr habt meine Studienzeit erst komplett gemacht.

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	11
1. Einleitung	1
2. Biotin	2
2.1 Allgemeine Aspekte	2
2.2 Der natriumabhängige Multivitamintransporter SMVT	3
2.2.1 Charakterisierung des Transportes von Biotin	3
2.2.2 SMVT und seine Substratspezifität.....	6
2.2.3 Molekulare Identität des intestinalen Biotin-Transport-Prozesses.....	7
2.3 Molekulare Charakterisierung der 5´-regulatorischen Region des SMVT.....	8
2.3.1 Transkriptionale Aktivität des hSMVT-Genes.....	8
2.3.2 Regelung des humanen intestinalen Biotin-Aufnahme-Prozesses	10
2.3.3 Die hochaffine Biotin-Aufnahme und ihre Einflussfaktoren	11
3. Pantothersäure	15
3.1 Allgemeine Aspekte	15
3.2 Biochemische Aspekte von Pantothersäure und Coenzym A.....	16
3.2.1 Biosynthese von Pantothersäure.....	17
3.2.2 Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit.....	18
3.3 Die Aufnahme von Pantothersäure und ihre Einflussfaktoren	19
3.3.1 Interaktion mit anderen Nährstoffen.....	19
4. Niacin.....	22
4.1 Allgemeine Aspekte	22
4.2 Biosynthese von Nicotinsäure/NAD und ihre Einflussfaktoren	23
4.3 Mechanismen zur Absorption von Nicotinsäure	25
4.4 Charakterisierung des Natrium-gekoppelten Monocarboxylat-Transporters SLC5A8.....	27
4.5 Funktionale Merkmale des SMCT-vermittelten Nicotinsäure-Transportes.....	28

4.6	Reabsorption von Nicotinat	29
4.7	Natrium-gekoppelter Monocarboxylat-Transporter (SMCT) versus Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1).....	30
5.	Thiamin.....	32
5.1	Allgemeine Aspekte	32
5.2	Charakterisierung der intestinalen Absorption und des Transportes von Thiamin	33
5.3	Molekulare Identität der Thiamin-Transporter hTHTR-1 und hTHTR-2.....	35
5.4	Transkriptionale Regulierung der Thiamin-Absorption.....	36
5.5	Thiamin-Absorption: Einfluss von Ethylalkohol und Chronischer Nierenerkrankung sowie deren Auswirkungen	39
6.	Pyridoxin (Vitamin B₆)	41
6.1	Allgemeine Aspekte	41
6.2	Charakterisierung der Absorption von Vitamin B ₆	42
6.3	Regulierung der Pyridoxin-Absorption in humanen Epithelzellen.....	44
6.4	Pyridoxin-Absorption in humanen Kolonozyten.....	45
6.5	Einfluss und Regulierung des Pyridoxin-Absorptionsprozesses in Kolonozyten.....	47
6.6	Einflussfaktoren auf die Pyridoxin-Aufnahme	48
6.6.1	Der Effekt von Alkohol.....	49
6.6.2	Der Effekt von Ballaststoffen	50
7.	Riboflavin	51
7.1	Allgemeine Aspekte	51
7.2	Absorption und Transport von Riboflavin.....	52
7.3	Charakterisierung und molekulare Identität der Riboflavin- Transportsysteme.....	54
7.4	Resorption von bakteriell synthetisierten Vitamin B ₂ im Dickdarm	56
7.5	Einflussfaktoren auf die Absorption von Riboflavin und Riboflavin-Mangel.....	57
8.	Vitamin C	59
8.1	Allgemeine Aspekte	59

8.2	Absorption von Ascorbinsäure.....	61
8.2.1	Dehydroascorbinsäure und Einflussfaktoren auf die Vitamin C-Absorption.....	62
8.3	Charakterisierung der Vitamin C - Transporter SVCT1 und SVCT2.....	63
8.4	Substratspezifität von SVCT	64
8.5	Molekularer Mechanismus des SVCT1 und SVCT2	65
8.6	Transkriptionale Regulierung der Ascorbinsäure-Absorption.....	66
9.	Folsäure.....	69
9.1	Allgemeine Faktoren	69
9.2	Absorption von Folaten	70
9.3	Charakterisierung der Folat-Transportsysteme	71
9.4	Struktur des humanen reduzierten Folat Carriers (hRFC)	72
9.5	Regulierung des humanen reduzierten Folat-Carriers (hRFC)	73
9.6	Der Protonen-gekoppelte Folat-Transporter (PCFT) PCFT/SLC46A1	74
9.7	Funktionen des Protonen-gekoppelten Folat-Transporters und die erbliche Folsäure-Malabsorption.....	75
9.8	Regulierung des PCFT (SLC46A1) durch den nuklearen respiratorischen Faktor (NRF-1)	76
9.9	Folsäure-Absorption im Kolon	76
9.10	Einflussfaktoren auf die Folsäure-Absorption	77
10.	Zusammenfassung.....	79
11.	Abstract.....	81
12.	Literaturverzeichnis	83
13.	Curriculum Vitae.....	89

Verzeichnis der Abkürzungen

ACP	Acylproteine
AMV	Humane, native Zelllinie
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB	Apolipoprotein B
AP-1	(engl.: activating protein - 1)
AP-2	(engl.: activating protein - 2)
ATG	Adenin Thymin Guanin, ein Startcodon im genetischen Code
ATP	Adenosintriphosphat
AUG	Startcodon der mRNA
BBM	Bürstensaummembran
BBMV	Bürstensaummembranvesikel
BLM	Basolaterale Membran
BVVL-Syndrom	Brown . Vialetto - Van Laere - Syndrom
Caco-2	humane Kolonkarzinomzelllinie
cDNA	komplementäre DNS
C/EBP	(engl.: Enhancer Binding Protein)
CKD	Chronische Nierenerkrankung
CpG	Cytosin. phosphatidyl-Guanin
CoA	Coenzym A
COS-7	Fibroblasten - Zelllinie
DHAA	Dehydroascorbinsäure
DHF	Dihydrofolat
DIDS	4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonsäure
DGNP	Deutsche Gesellschaft für Nährstoffmedizin und Prävention
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ER	Endoplasmatischen Reticulum
FAD	Flavin . adenosin - dinucleotid
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FL-Syndrom	Fazio Londe - Syndrom
FMN	Riboflavin. 5-phosphat
FR	Folsäure - Rezeptor
GATA-1	Transkriptionsfaktor
GC-Gehalt	Gehalt an Guanin und Cytosin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GKLF	(engl.: Gut - enriched Krüppel - like factor) transkriptionaler Regulator
HepG2	(engl.: human hepatocellular carcinoma) Zelllinie
HFM	erbliche Folsäure Malabsorption

HM74A	Niacin-Rezeptor
hRFC	humanener reduzierter Fotal - Carrier
hRFT	humaner Riboflavin - Transporter
hSMVT	humaner Natrium - abhängiger Multivitamintransporter
hTHTR	humaner Thiamin - Transporter
hVSMC	(engl.: vascular smooth muscle cells)
IEC-6	Darmepithelzelllinie
IUPAC	(engl.: International Union of Pure and Applied Chemistry)
MCT	Monocarboxylattransporter
mRNA	(engl.: messenger ribonuclein acid)
mtDNA	mitochondriale DNA
NAD	Nicotinamid. adenin-dinucleotid
NÄ	Niacinäquivalent
NADP	Nicotinamid. adenin. dinucleotid-diphosphat
NCM460	Zelllinie von humanen Kolonepithelzellen
NF-1	Neurofibromin 1
n_H	Hill - Koeffizient
NO	Stickstoffmonoxid
NRF-1	Nukleare respiratorische Faktor - 1
K_m	Michaeliskonstante (Maß für die Enzymaffinität)
K_t	Michaelis . Menten - Konstante (Affinitätskonstante des Transporters)
MCT	Monocarboxylat - Transporter
OAT	organischen Anionen - Transporter
ORF	(engl.: open reading frame)
PaA	Pantothensäure
P1, P2, P3	Promotoren
PBMC	(engl.: periphhal blood mononuclear cells) humane Lymphozyten
PCFR	Protonen - gekoppelter Folat - Transporter
pK_a	dekadischer Logarithmus der Säurekonstante (K_s)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PL	Pyridoxal
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PM	Pyridoxamin
PMA	(engl.: phorbol 12 myristate 13-acetate)
PMP	Pyridoxinamin-5'-phosphat
PN	Pyridoxol
PNP	Pyridoxin-5'-phosphat
PteGlu	Pteroylmonoglutamat
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase

RF	Riboflavin
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
siRNA	(engl.: small interfering RNA)
SITS	4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'- disulfonsäure
SLC16	Monocarboxylat-Transporter Genfamilie
SMCT	Natrium-gekoppelter Monocarboxylat-Transporter
SMVT	(engl.: sodium-dependent multivitamin transporter) Natrium-abhängiger-Multivitamintransporter
SP-1	Spezifischer Transkriptionsfaktor
SVCT	(engl.: sodium-dependent vitamin C transporter)
TATA	DNA-Sequenz, cis-regulatorisches Element
TDP	Thiamin-Diphosphat
THF	Tetrahydrofolsäure
TMD	Transmembrandomäne
TMP	Thiamin-Monophosphat
TTP	Thiamin-Triphosphat
UTR	5'-untranslatierten Region
YAMC	Zelllinie aus dem Kolon der Maus
4'-PP	Phosphopantethein
4'-PPA	4'-Phosphopantothenensäure
5-MTHF	5-methyliertes Tetrahydrofolat

1. Einleitung

Die wasserlöslichen Vitamine sind eine strukturell zu unterscheidende Gruppe an organischen Verbindungen, die essentiell für die menschliche Gesundheit sind. Es ist seit langem bekannt, dass sie eine wichtige Rolle im intermediären Stoffwechsel, der Energieproduktion und der Zelldifferenzierung sowie Proliferation spielen. [RAMASWAMY, 1999]

Da Menschen die Fähigkeit verloren haben, wasserlösliche Vitamine zu synthetisieren, erhalten sie diese Verbindungen aus exogenen Quellen über intestinale Absorption. Aus diesem Grund und da eine Vielzahl an Faktoren und Bedingungen die intestinale Absorption durch Vererbung oder sekundäre Ursachen beeinträchtigen können, ist ein detailliertes Verständnis der Mechanismen und Regulation ihrer intestinalen Aufnahme von hoher physiologischer, pathophysiologischer und ernährungsphysiologischer Bedeutung. [SAID, 2011]

Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass die Vitamine ausschließlich durch passive Diffusion aufgenommen werden, haben mehrere Studien gezeigt dass die Absorption von diesen Mikronährstoffen durch spezialisierte, hochaffine-Transport-Mechanismen erfolgt. [RAMASWAMY, 1999]

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den aktuellen Wissensstand der zellulären und molekularen Mechanismen der intestinalen Absorption der wasserlöslichen Vitamine zu beschreiben. Des Weiteres sollen deren Regulation, die Zellbiologie und die molekularen Charakteristika der beteiligten Carrier und ihre Membran-Expression, sowie die Faktoren und Bedingungen, die diese Mechanismen beeinträchtigen und beeinflussen können, geschildert werden. Der Fokus wird auf die Carrier-vermittelten Mechanismen gerichtet, durch die wasserlöslichen Vitamine im Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden.

2. Biotin

2.1 Allgemeine Aspekte

In der Natur existiert das Biotin-Molekül in Form von acht Stereoisomeren, wobei nur das cis-D(+)-Biotin Isomer mit der (3aS, 4S,6aR)-Konfiguration biologisch aktiv ist. [SAID, 2009]

Im menschlichen Organismus spielt das (+)-Stereoisomer des Vitamins Biotin (Vitamin H) eine signifikante Rolle als Coenzym für fünf Carboxylasen. [MARDACH et.al., 2002] Die beiden Isoformen der Acetyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.2) befinden sich im Zytoplasma, während die Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1), Propionyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.3) und die Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.2) mitochondrial lokalisiert sind. [STOLZ, 2009] Diese Enzymgruppe katalysiert die ATP-abhängige CO₂-Fixierung und Übertragung und spielt eine wichtige Rolle bei der Lipogenese, der Gluconeogenese, beim Abbau von Aminosäuren, bei der Fettsäurebiosynthese und darüber hinaus bei der Metabolisierung von Fettsäuren mit ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen und bei der Synthese von Tricarbonsäuren im Organismus. [GRAFE, 2004]

Die Biotinidase sowie die Holocarboxylasesynthetase sind zwei weitere Enzyme, welche mit der Funktion des Biotins als Coenzym, zusammenhängen. [GRAFE, 2004] Während des normalen Turnovers werden biotinylierte Proteine proteolytisch zu Biocytin (Biotinyl-Lysin) und biotinylierte Oligopeptide abgebaut, welche anschließend von der Biotinidase (EC 3.5.1.12) gespalten werden. [MARDACH et.al., 2002] Neben der Funktion als Coenzym hat Biotin auch einen Einfluss auf die Genexpression; es reagiert mit Histonen und bindet kovalent an diese. Hierbei besteht die Funktion der Biotinidase darin, als intrazelluläres, biotinbindendes Protein zu wirken und auch die kovalente Bindung an die Histone zu katalysieren. [GRAFE, 2004]

In Lebensmitteln vorkommendes Biotin liegt sowohl in freier, als auch in proteingebundener Form vor. Proteingebundenes Biotin wird durch Magen-Darm-Proteasen und Peptidasen durch Proteolyse zu Biocytin (N-Biotinyl-L-Lysin) und biotinhaltigen kurzen Peptiden verdaut. Diese Formen von Biotin werden dann durch Einwirkung von Biotinidase in freies Biotin umgewandelt. Dieser Hydrolyseschritt scheint für eine effiziente Absorption und eine optimale Bioverfügbarkeit des diätetischen Biotins von Bedeutung zu sein. Es wird angenommen, dass die Quelle der intestinalen Biotinidase der Pankreassaft ist. Dadurch, dass das Enzym geklont wurde, konnte gezeigt werden, dass es sich um ein Produkt eines single-copy-Gens handelt. [SAID et al., 2004]

In den letzten Jahren wurde mit zunehmender Häufigkeit von Biotinmangel und suboptimaler Versorgung berichtet, welche durch eine Vielzahl von Ursachen auftreten können. Dazu zählen unter anderem angeborene Fehler im Biotin-Metabolismus/-Transport, sowie die chronische Anwendung von Antikonvulsiva und auch der langfristige Einsatz von parenteraler Ernährung. [SAID et al., 2004]

2.2 Der natriumabhängige Multivitamintransporter SMVT

2.2.1 Charakterisierung des Transportes von Biotin

Menschen sind, sowie andere Säugetiere, nicht in der Lage, Biotin selbst zu synthetisieren, somit muss es aus einer exogenen Quelle dem Körper zugeführt werden. [SAID et al., 2004] Seit den 1940er Jahren ist bekannt, dass Bakterien, die in der normalen Darmflora enthalten sind, neben den anderen B-Vitaminen auch Biotin produzieren und in Abhängigkeit von der Bakterienart und der zur Verfügung stehenden Zeit ihre Umgebung in unterschiedlichem Maße damit anreichern. [BURKHOLDER und

McVEIGH, 1942] Da der Mechanismus zur Aufnahme von Biotin lange ungeklärt war, fanden Studien an den unterschiedlichsten Gewebetypen statt, beispielsweise an der Leber, der Niere, der Plazenta, der Blut-Hirn-Schranke und dem Darm, um den Biotintransporter charakterisieren zu können. [GRAFE, 2004] Studien über den Biotin-Transport in Erythrozyten liefern den Beweis, dass Biotin die Plasmamembran in sinnvollen Raten nicht ohne einen Transporter durchqueren kann. [MARDACH et al., 2004] Die Aufnahme von freiem Biotin durch menschliche Dünndarmepithelzellen erfolgt über einen effizienten, Na^+ -abhängigen, Carrier-vermittelten Mechanismus, der den mikromolaren Bereich sättigt. Die Carboxylgruppe der Valeriansäure-Einheit des Biotin-Moleküls muss frei sein für das reibungslose Erfassen durch den beteiligten Mechanismus. Da der Transport über die stark polarisierten, humanen, intestinalen Epithelzellen verläuft, stellt sich die Bewegung des Biotins über zwei strukturell und funktionell verschiedene Membran-Domänen, die Bürstensaummembran (BBM) und die basolateralen Membran (BLM)-Domänen dar, wobei das Verständnis des Mechanismus bei jedem Transportschritt von Bedeutung ist. Die Biotinaufnahme durch humane, intestinale BBM-Vesikel, tritt über ein Carrier-vermitteltes System, welches vom Na^+ -Gradienten abhängig und in der Lage ist, das Substrat gegen den Konzentrationsgradienten zu bewegen, auf. [SAID, 2009] Studien, welche isolierte Hepatozyten und Bürstensaummembran-Präparate aus Tieren und Menschen verwendet haben, zeigen, dass der Biotin-Transport aus dem Plasma in das Leberparenchym Na^+ -abhängig, elektroneutral, strukturspezifisch und gesättigt ist, sowie auch Energie benötigt. Diese Eigenschaften sind im Einklang mit einem oder mehreren Biotin-Transportern. Berichtet wurde über K_T -Werte von etwa 100 mol/l und somit einer im Wesentlichen normalen Plasmakonzentration von Biotin (0,5 nmol/l). [MARDACH et al., 2004]

Das intestinale Biotin-Aufnahmesystem wird auch von zwei anderen, unabhängigen Mikronährstoffen, nämlich dem wasserlöslichen Vitamin Pantothersäure und dem für den Stoffwechsel wichtigen Substrat

- Lipoat - genutzt. Eine ähnliche Wechselwirkung zwischen Biotin und den beiden anderen Substanzen kommt auch in anderen Zelltypen, wie denen des Dickdarms, der Blut-Hirn-Schranke, dem Herz und der Plazenta vor. Aus diesen Gründen wird dieses Biotin-Transport-System als Na⁺-abhängiger Multivitamin-Transporter (SMVT; sodium-dependant multivitamin transporter) bezeichnet. [SAID et al., 2009] Einerseits ist der SMVT zur Aufnahme der Vitamine aus der Nahrung im Darm notwendig, andererseits zur Verteilung derselben im Organismus. Abhängig ist die Aktivität des Multivitamintransporters von unterschiedlichen endogenen und exogenen Faktoren. [GRAFE, 2004]

Der Biotin-Transport entlang den menschlichen intestinalen BBM reagiert empfindlich auf die hemmende Wirkung der Antikonvulsiva Carbamazepin und Primodon. [SAID, 2009] Es wurde auch nachgewiesen, dass es bei chronischer Alkoholfuhr sowie bei Nierenerkrankungen zu einer reduzierten Biotin-Aufnahme im Darm kommt. [GRAFE, 2004]

In Bezug auf die bakterielle Biotin-Quelle synthetisiert und gibt die normale Mikroflora des Dickdarms in das Darmlumen eine wesentliche Menge an freiem Biotin ab. In vivo Studien haben gezeigt, dass der menschliche Dickdarm imstande ist, Biotin zu absorbieren. Der Mechanismus, der im Dickdarm an der intestinalen Biotin-Absorption beteiligt ist, wurde unter Verwendung von kultivierten, menschlichen Kolonepithelzellen NCM460 untersucht, mit dem Ergebnis, dass die Existenz eines effizienten Na⁺-abhängigen, Carrier-vermittelten Prozesses bestätigt wurde. Auch dieser Mechanismus wird mit Pantothersäure und Lipoat geteilt. Allerdings beeinflussen die reichlich vorhandenen (und negativ geladenen) kurzkettigen Fettsäuren Acetat und Butyrat, welche auch durch die normale Mikroflora des Dickdarms produziert werden, die intestinale Biotin-Aufnahme nicht störend. [SAID, 2009]

Weiters wurde auch die molekulare Identität des intestinalen Biotin-Aufnahme-Systems durch SMVT bestimmt. Studien haben auch die Existenz einer erheblichen Heterogenität in der 5'-untranslatierten Region

(5'-untranslated region, UTR) der Ratte von SMVT gezeigt und es wurden vier verschiedene Varianten identifiziert (I, II, III, IV). Festgestellt wurde, dass Variante II als vorherrschende Form bei der Ratte in Dünn- und Dickdarm exprimiert wird. Die funktionelle Identifizierung der geklonten intestinalen cDNAs wurde durch Expression in verschiedenen zellulären Ebenen etabliert und zeigt eine deutliche und spezifische Erhöhung der Aufnahme von Biotin und Pantothersäure. Die induzierte Vitaminaufnahme ist Na^+ -abhängig und gesättigt mit einer scheinbaren K_m , welche der in den intestinalen Epithelzellen gefundenen ähnlich ist. Zottenzellen exprimieren auf deutlich höherem Niveau SMVT-Signale als Kryptenzellen; ein Befund, der verglichen mit den Kryptenzellen mit der höheren Carrier-vermittelten Biotin-Aufnahme in Zottenzellen korreliert. In Bezug auf die Längsachsenverteilung von SMVT wurde ein ähnliches Niveau der Expression entlang der Länge des Dünn- und Dickdarms gefunden. [SAID et al., 2004]

2.2.2 SMVT und seine Substratspezifität

Anhand der Untersuchungen der Substratspezifität an humanen Keratinozyten konnte unter anderem festgestellt werden, dass der Transport um etwa 80% reduziert wurde, sobald Pantothersäure, unmarkiertes Biotin oder Liponsäure vorhanden waren. Aufgrund dieser Beobachtung kann der Schluss gezogen werden, dass das gleiche Transportsystem für diese drei Substanzen verantwortlich ist. Um weitere Aussagen über die strukturellen Voraussetzungen des Transportes treffen zu können, wurden Untersuchungen von Biocytin, Desthiobiotin und auch Biotinmethylester durchgeführt. Einerseits kann eine vergleichbare Hemmung mit Biotin bei Desthiobiotin beobachtet werden, andererseits erzielte Biotinmethylester eine minimale, aber trotzdem signifikante Reduktion der [^3H]Biotinaufnahme. Im Fall von Biocytin konnte bezugnehmend auf die aufgenommene Biotinmenge keine Verringerung festgestellt werden. Aufgrund dieser Beobachtungen können Aussagen

über die strukturellen Voraussetzungen getroffen werden: Fest steht, dass Pantothersäure, Liponsäure, Biotin sowie auch Desthiobiotin eine lange Seitenkette mit einer freien Carboxylgruppe aufweisen. Kommt es durch Amidbindung (Biocytin) oder Veresterung (Biotinmethylester) zu einer Veränderung dieser Gruppierung, reduziert sich in Folge die Affinität oder sie wird ganz aufgehoben. Es liegt die Vermutung nahe, dass für die Bindung an den SMVT die freie Carboxylgruppe essentiell ist. [GRAFE, 2004]

2.2.3 Molekulare Identität des intestinalen Biotin-Transport-Prozesses

Das Wissen über die molekulare Identität des menschlichen intestinalen Na^+ -abhängigen Biotin-Aufnahme-Systems (hSMVT) wurde, im Wesentlichen durch das Klonen des Systems, erhöht. Das hSMVT Protein, bestehend aus 635 Aminosäuren, ist das Produkt des Gens SCL5A6, welches am Chromosom 2p23 lokalisiert ist und aus 17 Exonen besteht. Das Protein weist eine beträchtliche Homologie mit Elementen der Na^+ :Glucose-Transporter-Familie auf; weiters zeigt sich auch eine Sequenzhomologie, sowohl auf Nukleotid-, als auch auf Aminosäureebenen mit SMVT anderer Säugetierspezies. Das hSMVT Polypeptid weist bis zu 12 Transmembrandomänen auf, sowie eine Reihe von möglichen posttranslationalen Modifikationen (d.h. Phosphorylierungs- und Glykosylierungsstellen); somit sind beide, die Amino- und die Carboxy-Termini des Polypeptids, der Innenseite der Zelle zugewandt. Die funktionelle Charakterisierung der hSMVT in heterogenen Systemen deuten auf eine hohe Na^+ -Abhängigkeit und die Nutzung durch Pantothersäure und Lipoat hin. Weiters zeigt sich auch, dass die kinetischen Parameter der Aufnahme denen des nativen intestinalen Aufnahmeprozesses ähneln. Die Schlussfolgerungen basieren auf Studien unter Verwendung von genspezifischer, kurzer interferierender RNA und selektivem Zerlegen des endogenen hSMVT Systems menschlicher

intestinaler, epithelialer Caco-2-Zellen. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass die Vorbehandlung mit der hSMVT-spezifischen siRNA zu einer spezifischen und deutlichen Verringerung der Level von hSMVT mRNA sowie auch Protein führt und es in Folge zu einer starken Hemmung der Carrier-vermittelten Biotin-Aufnahme kommt. [SAID, 2009] Die Biotin-Rückgewinnung in der Niere ist ebenfalls Na⁺-gekoppelt, strukturell spezifisch, sättigbar und erfordert Energie, was auf die Existenz eines oder mehrerer renaler Biotin-Transporter hinweist. Die beobachtete K_T beträgt etwa 300 mol/l. Dieser Wert ist deutlich über der Konzentration von Biotin im Plasma und im glomerulären Filtrat (etwa 0,5 nmol/l). Bei solchen Konzentrationen wird der Transport wahrscheinlich durch den SMVT vermittelt und die gezogenen Schlussfolgerungen sind möglicherweise bei physiologischen Konzentrationen nicht auf den Biotin-Transport anwendbar. [MARDACH et al., 2002]

2.3 Molekulare Charakterisierung der 5'-regulatorischen Region des SMVT

2.3.1 Transkriptionale Aktivität des hSMVT-Genes

In einer Studie von Chatterjee et.al. wurde die Methode der RT-PCR, sowie das Wissen, wie aus dem klonierten plazentaren SMVT cDNA zur Lösung dieses Problems gewonnen wird, verwendet. Diese Studie hat einen cDNA Klon identifiziert, welcher eine identische ORF zu der des SMVT besitzt, wobei diese eine Heterogenität in der 5'UTR zeigt. [CHATTERJEE et al., 1999] Dieses Ergebnis erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Promotoren beim Antrieb der Transkription des Gens SMVT beteiligt sind. [CHATTERJEE et al., 2001] Es wurden drei Transkriptvarianten (II, III und IV) im Dünndarm identifiziert, sowie auch die Variante I (die plazentare Form), welche nicht im Dünndarm vorkommt. Die Existenz von mehreren Varianten legt die

mögliche Beteiligung von alternativem Spleißen (Splicing) des Transkripts nahe, ebenso wie die mögliche Beteiligung von mehreren Promotoren während der laufenden Transkription der klonierten intestinalen cDNA. Von den verschiedenen 5'UTR Varianten, die im Darm identifiziert wurden, stellt Variante II die vorherrschende Form dar und weist eine höhere Expression im Dünndarm im Vergleich zum Dickdarm auf. Diese Variante wurde auch in anderen Geweben der Ratte, einschließlich der Niere und dem Herz, exprimiert nachgewiesen. Obwohl Variante I wie erwähnt im Dünndarm nicht nachgewiesen werden konnte, wurden trotzdem Spuren davon im Dickdarm erkannt. [CHATTERJEE et al., 1999]

Um die Möglichkeiten zu testen, ob, wie erwähnt, mehrere Promotoren beim Antrieb der Transkription des SMVT Gens beteiligt sind, wurde die 5'-regulatorische Region des Gens SMVT durch Genome Walking geklont. Ein 6,5-kb großes genomisches DNA Fragment wurde identifiziert und sequenziert. Es wurden drei Promotoren (P1, P2 und P3) gefunden, welche von den Exonen der zuvor identifizierten vier Transkriptvarianten (I-IV) getrennt wurden. Es wurde herausgefunden, dass P1 mehrere vermeintlich, regulatorische Regionen wie GATA-1, AP-1, AP-2 und C/EBP enthält, welche wiederholt purinreiche Regionen, sowie zwei TATA-Elemente aufweisen. Untersuchungen von P2 und P3 ergaben, dass diese GC-reich sind und auch in Gegenwart von einigen regulatorischen Elementen mehrere Übereinstimmungen der SP-1 Sequenzen zeigten. [CHATTERJEE et al., 2001]

Die funktionelle Identität eines jeden Promotors und die minimale Region, die für seine Funktion erforderlich ist, wurden wie folgt bestimmt: Die Promotoren-Konstrukte wurden an das Luciferase-Reporter-Gen von Glühwürmchen gekoppelt und anschließend in von Ratten stammende IEC-6 Darmepithelzellen verpflanzt; in welchen anschließend die Luciferase-Aktivität bestimmt wurde. Die höchste funktionelle Aktivität der geklonten Promotoren besteht in der Größenordnung von $P1 > P2 > P3$. Zwei verschiedene Promotoren (P1 und P2) wurden identifiziert und erwiesen sich als TATA-los, CAAT-los, enthalten GC-reiche Regionen und haben mehrere vermeintlich cis-regulatorische Elemente (z.B. AP1, AP2, C/EBP, AP1,

NF1 und GATA). Die Aktivität der beiden Promotoren, die für die basale Aktivität der minimalen Region benötigt wird, wird unter Verwendung des Luciferase-Reporter-Gen-Assays von Glühwürmchen durch Transfektion in die vom Menschen stammenden intestinalen epithelialen Caco-2-Zellen eingebracht. Die minimale Region, die für die basale Aktivität von P1 benötigt wurde, wurde durch eine Sequenz zwischen 5846 und -5313 kodiert, wohingegen die für P2 durch eine Sequenz zwischen -4417 und -4244 bezogen auf das Translationsinitiationscodon kodiert wurde. [SAID, 2004]

Diese Ergebnisse stellen die erste Charakterisierung der 5'-regulatorischen Region eines jeden Säugetier-SMVT-Gens dar und sollten zu dem Verständnis der Regulation der Transkription dieses Gens beitragen. [CHATTERJEE et al., 2001]

2.3.2 Regelung des humanen intestinalen Biotin-Aufnahme-Prozesses

Der intestinale Biotin-Aufnahme-Prozess wird sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell adaptiv durch Substratebenen geregelt. Ein Biotin-Mangel führt zu einer wesentlichen und spezifischen Hochregulation der Biotin-Aufnahme durch menschliche, intestinale, epitheliale Caco-2 Zellen; der Effekt wird über eine Zunahme (258%) in der V_{\max} des Vitamin-Aufnahme-Prozesses vermittelt. Diese Hochregulation der Biotin-Aufnahme wird auch mit einer deutlichen Induktion des Protein- und mRNA-Levels von hSMVT assoziiert. Die Erhöhung des hSMVT mRNA-Levels liegt nicht an einer Erhöhung der RNA-Stabilität, sondern war das Ergebnis einer Induktion der Aktivität des Promotors hSMVT. Eine auf Biotinmangel reagierende Region, welche die Reaktion des Biotinmangels überträgt, wurde in einer 103-bp Region innerhalb des hSMVT Promotors lokalisiert. Diese Region enthielt KLF4 Stellen, deren Mutation zur Aufhebung der hSMVT-Antwort beim Biotin-Mangel führte. [SAID, 2009]

2.3.3 Die hochaffine Biotin-Aufnahme und ihre Einflussfaktoren

Wie bereits erwähnt, legen Erkenntnisse nahe, dass Biotin und Pantothersäure das gleiche Aufnahmesystem in Zellen nützen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch beim Herzen, der Plazenta und dem Dünndarm gemacht. Im Gegensatz dazu kann Pantothersäure nicht den Transport von Biotin über die kapillaren Endothelzellen des Gehirns beeinflussen. Was die Auswirkungen der kurzkettigen Fettsäuren Acetat und Butyrat auf die Biotinaufnahme betrifft, wurde keine Hemmung durch beide Verbindungen beobachtet.

Anders ist es beim Biotintransport durch die Blut-Hirn-Schranke, welcher durch die Nonansäure (Pelargonsäure), eine geradkettige Fettsäure, gehemmt wurde. In anderen Studien wurde das Potential für intrazelluläre Regulation des Biotinaufnahmeprozesses nach NCM460 Zellen durch PKC- und PKA-abhängigen Wegen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass einerseits die Vorbehandlung der Zellen mit PMA (aber nicht mit seiner Negativ-Kontrolle, 4 -PMA) und mit 1,2-Dioctanoyl-*sn*-glycerol, welche Aktivatoren der PKC sind, eine signifikante Hemmung in der Biotin-Aufnahme verursachen. Andererseits, verursacht die Vorbehandlung der Zellen mit Staurosporin und Chelerythrin, welche Inhibitoren der PKC sind, zwar eine geringe, aber durchaus signifikante Stimulation der Biotin-Aufnahme. Weiters wurde die Hemmung von PMA signifikant reduziert, wenn Staurosporine zu dem Puffer, der zur Vorbehandlung verwendet wird, hinzugefügt wurde. Diese Erkenntnisse weisen auf die Beteiligung eines PKC-vermittelten Weges in der Regulation der Biotin-Aufnahme in diesen Zellen hin. Es wurde herausgefunden, dass die Wirkung der PKC-Aktivierung durch PMA auf die Biotin-Aufnahme durch eine deutliche Hemmung der V_{max} des Aufnahmeprozesses und eine leichte Erhöhung der scheinbaren K_m vermittelt wird. Dies deutet darauf hin, dass die PKC-Aktivierung zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität und/oder zu einer Verminderung der

Anzahl der funktionellen Biotin-Aufnahme-Carrier sowie zu einem leichten Rückgang in ihrer Affinität führt. Im Gegensatz zu der Funktion der PKC spielt die Regulation der Biotin-Aufnahme durch NCM460 Zellen für PKA-vermittelte Signalwege keine Rolle. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Beobachtung, dass spezifische Modulatoren dieses Signalweges keinen signifikanten Einfluss auf die Biotin-Aufnahme in diesen Zellen haben. [SAID et al., 1998]

Zempleni et al. untersuchten die Problematik, ob für den hochaffinen Transport von Biotin in den PBMC (humanen Lymphozyten), der Monocarboxylattransporter MCT zuständig ist. Der Einfluss von verschiedenen MCT- Substraten . Pyruvat, Acetat, -Ketoisocaprat, Laktat, Hexanoat und DL- -Hydroxybutyrat . wurde getestet. Es wurde herausgefunden, dass die Biotinaufnahme in die PBMC durch die genannten Substanzen sowie auch durch Inhibitoren des MCT . Sulfinpyrazon, p-Chloromercuribenzensulfonsäure, Probenecid und 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure . gehemmt wurde. Einen weiteren Punkt dieser Untersuchung stellte die Expression unterschiedlicher Monocarboxylattransporter in PBMC Zellen dar. Das Ergebnis zeigte, dass Lymphozyten Gene exprimieren, welche MCT1, MCT2 und MCT3 kodieren. Nach der Expression von MCT1 in den humanen T-Zellen nahm die Biotin-Aufnahme zu, es wurde nach der Expression in die humanen Lungen- und Plazentazellen und in die Prostatazellen der Ratte keine Veränderung festgestellt. Innerhalb dieser Studie wurde auch der Einfluss der Proliferation der Zellen auf den Transport von Laktat - als ein Substrat von MCT - untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Aufnahme im Verlauf der Proliferation erhöht. Das Resümee einer anderen Studie deutet darauf hin, dass das Ergebnis der erhöhten Anzahl an Transportproteinen auf der Zelloberfläche bei gleichbleibender Affinität während der Proliferation der PBMC die gesteigerte Aufnahme von Biotin darstellt. Es kann also darauf geschlossen werden, dass MCT die Biotin-Aufnahme in humane Lymphozyten vermittelt. [GRAFE, 2004]

Mardach et al., [2002] behandelten in ihrer Studie den Holocarboxylase-Synthetase-Mangel sowie auch den Biotinidasemangel, welche beide sowohl einen multiplen Carboxylasemangel als auch eine Biotinabhängigkeit verursachen. Schwere Formen des Holocarboxylase-Synthetase-Mangels treten in der Regel mit schweren Symptomen während der Kindheit auf. Klinische Merkmale inkludieren charakteristische Fütterungsprobleme, Acidose und eine akute progressive Enzephalopathie. Im Gegensatz dazu tritt der Biotinidasemangel üblicherweise nach dem Säuglingsalter auf. Die Symptome umfassen Haarausfall, Hautausschlag, Entwicklungsverzögerungen, Hypotonie, Krampfanfälle, Azidose, Azidurie, Hörprobleme und Sehstörungen. Der Biotinidasemangel kann klinisch nicht von der milden Form des Holocarboxylase-Synthetase-Mangels unterschieden werden. Beide Erkrankungen sprechen typischerweise auf die Biotintherapie an. Sowohl der ernährungsbedingte Mangel an Biotin, als auch der vererbte enzymatische Mangel an biotinabhängigen Carboxylasen verursachen eine charakteristisch höhere Exkretion von organischen Säuren im Harn. Zu diesen Verbindungen zählen folgende:

- a. 3-Methylcrotonyl Glycin und 3-Hydroxy-Isovaerate (3HIA) reflektieren den Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel
- b. 3-Hydroxypropionat (3HPA), Propionglycerin und Methylcitrate reflektieren den Propionyl-CoA-Carboxylase-Mangel und
- c. Lactat, welches sich wahrscheinlich auf einen Pyruvat-Carboxylase-Mangel bezieht. [MARDACH et al., 2002]

Beschrieben wurde ein dreijähriger Junge, der eine hohe Biotinabhängigkeit aufwies, die weder auf eine zu geringe Biotinzufuhr mit der Nahrung noch auf einen Holocarboxylase- oder Biotinidasemangel zurückzuführen ist, sondern auf einem Defekt im Transportsystem begründet ist. Bei einem Biotinentzug konnte folgendes beobachtet werden: Trotz unveränderter Aktivität biotinabhängiger Carboxylasen in Lymphozyten und Fibroblasten kam es zu einer abnormalen Azidurie; weiters wurde auch ein intrazellulärer Biotinmangel als Folge festgestellt. Es kam zu einer signifikanten Reduzierung der Aufnahme in die

Blutzellen. Untersuchungen zur Klärung dieses heterozygoten, autosomal rezessiven Gendefekts zeigten, dass die Transportrate von Pantothersäure und die SMVT-Gensequenz keine Auffälligkeiten aufwiesen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der beobachtete Biotinmangel in den Zellen durch ein anderes defektes Transportsystem hervorgerufen wurde und nicht auf einen Defekt des Multivitamintransporters zurückzuführen ist. [GRAFE, 2004]

Einen weiteren Einfluss auf die Biotinaufnahme übt das Glykoprotein Avidin aus. Avidin, welches im Hühnereiweiß vorkommt, ist ein tetrameres Glykoprotein, das bis zu vier Biotin-Moleküle binden kann und aus 128 Aminosäuren besteht. [GENERAL et al., 2011] Avidin ist resistent gegen Proteasen (Pepsin, Trypsin) und bindet fest an freies Biotin und an Biotin-Proteine, was zur Folge hat, dass das Biotin aus der Nahrung und aus der enteralen Synthese nicht aufgenommen werden kann. Streptavidin ist mit Avidin strukturverwandt und bindet ebenso fest an Biotin. [STOLZ, 2011]

3. Pantothensäure

3.1 Allgemeine Aspekte

Pantothensäure, auch als Vitamin B₅ bezeichnet, ist ein Mitglied des Vitamin B-Komplexes, das im Jahr 1933 identifiziert, aus der Leber im Jahre 1938 isoliert und extrahiert und 1940 erstmals synthetisiert wurde. [KELLY, 2011]

Vitamin B₅ setzt sich aus 2,4-Dihydroxy-3,3-Dimethylbutyrat und -Alanin zusammen und kann in der menschlichen Zelle nicht synthetisiert werden. Die physiologischen Formen von Pantothensäure sind Coenzym A und D(+)-Pantothensäure. [SAID et al., 1998] Nur das rechtsdrehende D-Isomer von Pantothensäure . D-Pantothensäure . besitzt biologische Aktivität. [KELLY, 2011] Das Vitamin Pantothensäure ist in die Stoffwechselsynthese von Coenzym A (CoA) und Acyl-Carrier-Proteinen und somit auch in den Stoffwechsel von Kohlenhydraten, Fett und in geringem Maße von Protein involviert. [SAID, 2004] CoA ist auch bei der Synthese von Hormonen beteiligt und wirkt als Wachstumsfaktor von Haut, Haaren und Nerven. Weiters wurde über Pantothensäure berichtet, dass sie Zellen und Organe gegen Peroxidschäden durch Erhöhung des Gehaltes von Glutathion in den Zellen schütze. [YAMAMOTO et al., 2009]

Die D-Pantothensäure ist relativ instabil . sie kann durch Wärme und unter sauren oder alkalischen Bedingungen zerstört werden. Stabiler im Vergleich ist Calciumpantothenat, jene Form von Vitamin B₅, die üblicherweise in Nahrungsergänzungsmitteln zu finden ist. Calciumpantothenat ist ebenfalls wasserlöslich, kristallin und besitzt eine weiße Farbe. Zehn Milligramm Calciumpantothenat entsprechen äquivalent 9,2 mg der reinen D-Pantothensäure. Die Disulfid-Form von Pantothensäure . Pantethin . wird unter anderem als Nahrungsergänzungsmittel verwendet. Pantethin gilt als eine der aktivsten Formen von Vitamin B₅, da die enthaltene Sulfhydryl-Gruppe für die

biologische Aktivität in Coenzymen benötigt wird. Die flüssigen Formen von Vitamin B₅ . Despanthenol, D-Dexpanthenol, D-Panthenol oder Penthenol . sind ebenfalls verfügbar. [KELLY, 2011]

3.2 Biochemische Aspekte von Pantothersäure und Coenzym A

Pantothersäure wird in CoA- und Acyl-Proteinen (ACP) verwendet, um die Acetyl- und Acylgruppen zu transportieren bzw. zu übertragen. Es wird angenommen, dass in vivo Effekte der Pantothersäure ein Ergebnis von dessen Einbau in diesen Molekülen ist. CoA ist ein essentieller Cofaktor in der Fettsäureoxidation, Fettsäure-Synthese und der Fettsäure-Elongation. Es wird bei der Herstellung von vielen sekundären Metaboliten verwendet, wie polyisoprenoidhaltigen Verbindungen (z.B. Dolichol, Ubichinon [CoQ10], Squalen und Cholesterin), Steroid-Molekülen (z.B. Steroidhormonen, Vitamin D und Gallensäuren), acetylierte Verbindungen (z.B. acetylierte Aminosucker Derivate [N-Acetylglucosamine], acetylierte Neurotransmitter [N-Acetylserotonin, Acetylcholin]) und Prostaglandinen wie auch Prostaglandin-ähnlichen Verbindungen. Weiters ist Coenzym A für die Biosynthese von Phospholipiden (z.B. Phosphatidylcholin, -ethanolamin, -serin, -inositol, -cardiolipin) sowie von Plasmalogen, Sphingenin und Ceramid erforderlich. Direkt oder indirekt ist Coenzym A an dem Zusammenbruch des Kohlenstoffgerüsts der meisten Aminosäuren beteiligt. Die Aufgliederung der Pyrimidinbasen - Cytosin, Uracil und Thymin - ist ebenfalls von Coenzym A abhängig. Acyl-Proteine sind in Fettsäuresynthasen, Polypeptidsynthasen, der Lysin-Synthese und in der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase vorhanden. Die meisten Pflanzen und Mikroorganismen bewirken die Biosynthese von Pantothersäure durch die enzymatische Kombination von Pantoinsäure und -Alanin. Säugetieren fehlt das Enzym für diesen Syntheseschritt, und sie sind somit unfähig, Pantothersäure zu synthetisieren. Bei Säugetieren

beginnt die endogene Synthese von CoA und ACP mit Pantothersäure. [KELLY, 2011]

3.2.1 Biosynthese von Pantothersäure

Die Biosynthese von Pantothersäure beginnt mit einer Phosphorylierungsreaktion, die durch ein Magnesium-abhängiges Enzym . Pantothenat-Kinase (auch als Pantothersäure-Kinase bezeichnet) . katalysiert wird, was zur Bildung von 4'-Phosphopantothersäure (4'-PPA) führt. Dieser Schritt wird als der wichtigste Kontrollschritt in der Biosynthese von Pantothersäure-abhängigen Enzymen betrachtet. Der nächste Vorgang ist eine Betrachtung der Reaktion mit Cystein, welche die Verbindung 4'-Phosphopantothenyl-Cystein hervorbringt. In Abwesenheit von Cystein sammelt sich 4'-PPA an, was darauf hinweist, dass das Fehlen von Cystein als Substrat ein limitierender Faktor bei der Biosynthese von Pantothersäure und den downline-Metaboliten darstellt. 4'-Phosphopantethein (4'-PP) wird durch eine Decarboxylierungsreaktion gebildet. Die Reaktionsgeschwindigkeit des enzymatischen Schrittes wird durch die Verfügbarkeit von Protein-Sulfhydrylverbindungen, wie Cystein, erhöht. Die beiden letzten Schritte der Synthese von CoA umfassen die Zugabe einer Adenosylgruppe von ATP und der Phosphorylierung dieses Moleküls. Beide enzymatischen Reaktionen benötigen Magnesium als Cofaktor. Während CoA für einen großen Anteil der zellulären Pantothersäure verantwortlich ist, enthält ACP auch ein Pantothersäure-Molekül. Die Synthese von ACP ist noch nicht vollständig geklärt, doch in CoA wurde 4'-PP als prosthetische Gruppe identifiziert. [KELLY, 2001]

In einer Studie von Villaseñor et al. wurde untersucht, welchen Beitrag das *Housekeeping gene* zur Pantothenat-Biosynthese leistet. Ein traditionelles Konzept in der Bakteriengenetik, an welchem das Housekeeping-Gen beteiligt ist und den Grundumsatz für die Aufrechterhaltung und Funktion der Zelle involviert, gibt an, dass es im

Chromosom kodiert ist, wohingegen Gene, die für den Umgang mit schwierigen Umweltbedingungen erforderlich sind, in Plasmiden lokalisiert sind. [VILLASEÑOR et al., 2009] Das Housekeeping Gene dient dazu, spezifische Effekte auf die Expressierung des Zielgenes zu messen, um zwischen einer allgemeinen Erhöhung der Expressionsrate und der genspezifischen zu unterscheiden. Sie enthalten oft keine TATA-Box, dafür aber CAAT- oder GC-Boxen. [KOOLMAN und RÖHM, 2009] Es wurde der experimentelle Beweis erbracht, dass im Kern angeordnete *panC* Gene in Plasmiden von *R. etli* und *R. leguminosarum* für die Synthese von Pantothenat unerlässlich sind. Die Gegenwart von *panCB* Genen in Plasmiden der *Rhizobiales* ist für eine intragenomische Übertragung von Chromosom zu Plasmid nötig. [VILLASEÑOR et al., 2009]

3.2.2 Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit

Es gibt Hinweise für eine Bioverfügbarkeit von Pantothensäure in einer Bandbreite von 40 bis 63%. Es scheint als würde Pantothensäure nach einer oralen Dosis schnell absorbiert werden, was wiederum zu einer erhöhten Gewebekonzentration von Coenzym A und anderen Pantothensäuremetaboliten binnen sechs Stunden führt. Der Gehalt von Coenzym A und Pantothensäure steigt signifikant in den Leukozyten und im Urin innerhalb von sechs bis 24 Stunden nach oraler Zufuhr an. Bei Mäusen tritt die Absorption von PaA im Dünndarm auf und ist Na⁺-abhängig sowie auch gesättigt. Die unterschiedliche Aufnahme von Pantothensäure in niedrigen, normalen oder hohen Dosen hat keinen signifikanten Einfluss auf die physiologische intestinale Aufnahme. Nach Absorption von PaA in die Zellen, kann es zu CoA oder ACP, durch eine Reihe von enzymatischen Reaktionen umgewandelt werden. Bei Tieren scheint sich PaA in der Leber, den Muskeln und im Blut zu konzentrieren. Tierversuche lassen darauf schließen, dass Pantothensäure durch ein

gesättigtes Transportsystem in das Gehirn und die Rückenmarksflüssigkeit ein- und wieder austreten kann. [KELLY, 2011]

3.3 Die Aufnahme von Pantothersäure und ihre Einflussfaktoren

3.3.1 Interaktion mit anderen Nährstoffen

Die normale Mikroflora des Dickdarms synthetisiert nicht ausschließlich signifikante Mengen an Pantothersäure, sondern auch andere Substrate, wie Biotin und auch kurzkettige Fettsäuren, unter anderem Acetate und Butyrate. [SAID et al., 1998]

Der Darm ist also zwei unterschiedlichen Quellen von Pantothersäure ausgesetzt: der diätetischen und der bakteriellen Quelle. In der Nahrung existiert Pantothersäure hauptsächlich in Form von Coenzym A, welches vor der Absorption im Darm zu freier Pantothersäure und Phosphorsäureestern hydrolysiert wird; ungespaltenes Coenzym A wird nicht absorbiert. Danach folgt der Transport von freier Pantothersäure in die absorbierenden Zellen über den SMVT (siehe unter 2.3.3 Die hochaffine Biotin-Aufnahme und ihre Einflussfaktoren). Der Transport der bakteriell synthetisierten Pantothersäure in den Dickdarm erfolgt ebenfalls über den SMVT. Interaktionen zwischen Pantothersäure, Biotin und Lipoat auf dem Level des Membrantransportes sind nicht spezifisch für den Darm, sondern finden in anderen zellulären Systemen statt. [SAID, 2004]

Die Substrate - wie Biotin - existieren auch als Anionen im physiologischen pH-Wert des großen Darmlumens, und damit ist nichts anderes zu erwarten, als dass sie mit der anionischen Biotin-Aufnahme interagieren oder sie stören. Aus diesem Grund, und weil die Pantothersäure und die Fettsäuren gezeigt haben, dass sie die Biotin-

Aufnahme in anderen Systemen hemmen, wurde die Wirkung auf die Biotin-Aufnahme durch die NCM460 Zellen untersucht. Die Pantothersäure verursacht eine konzentrationsabhängige, kompetitive Hemmung der Biotin-Aufnahme. Die Tatsache, dass Pantothersäure zu einer deutlichen Zunahme der scheinbaren K_m der Biotin-Aufnahme führt, ohne die V_{max} des Aufnahmeprozesses zu beeinflussen, bestätigt ferner die Art der Wettbewerbssituation in der Hemmung. Es sei auch erwähnt, dass die K_m für Pantothersäure in der Nähe der scheinbaren K_m der Biotin-Aufnahme durch diese Zellen liegt. Diese Erkenntnisse legen also nahe, dass Pantothersäure und Biotin das gleiche Aufnahmesystem in diesen Zellen nutzen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch vom Herzen, der Plazenta und dem Dünndarm gemacht. Im Gegensatz dazu kann Pantothersäure nicht den Transport von Biotin über die kapillaren Endothelzellen des Gehirns beeinflussen. [SAID et al., 1998]

Ascorbinsäure scheint einen schonenden Effekt auf Pantothersäure bei Ratten zu haben. Der Zusatz von Ascorbinsäure zur Nahrung von Ratten erlaubt dem Großteil der Tiere normal zu wachsen und verhindert Mangelerscheinungen. Die Steigerung eines Pantothersäure-Mangels mit Zusatz von Ascorbinsäure bei weiblichen Ratten führte bei den Nachkommen zu einem signifikant höheren Blut-, Leber- und Gewebespiegel von Pantothersäure im Vergleich zu den Nachkommen von weiblichen Ratten, die mit einer PaA-defizienten Nahrung ohne Zusatz von Ascorbinsäure gefüttert wurden. Ascorbinsäure beugt auch einigen histochemischen Unterschieden in den Nebennieren der Nachkommen vor. [KELLY, 2011]

Es ist auch bekannt, dass Pantothersäure eine wichtige Rolle in den männlichen und weiblichen Fortpflanzungsorganen spielt. Ein Mangel an Pantothersäure in der Ernährung von weiblichen Ratten führte zu einer abnormen Entwicklung der Eierstöcke und der Gebärmutter und einige Tiere zeigten auch Anomalien in ihrem Ovarienzyklus. Die durchgeführte Studie zu dieser Frage hat deutlich gezeigt, dass ein Ernährungsmangel

die Pantothersäure betreffend Anomalien in der Hodenfunktion und der Spermatogene bei Ratten hervorruft. Darüber hinaus kann gesagt werden, dass der Mangel an Pantothersäure vor allem durch den Rückgang der endogenen Produktion von Cholesterin in den Hoden und der Nebennierenrinde vermittelt wird. [YAMAMOTO et al., 2009]

Aufgrund der weiten Verbreitung der Pantothersäure kommt durch die Ernährung verursachter Mangel beim Menschen, außer unter extremer Mangelercheinung, nicht vor. [ELMADFA et al., 1998]

4. Niacin

4.1 Allgemeine Aspekte

Die Bezeichnung Niacin stellt für chemische Strukturen der Pyridin-3-Carbonsäure einen Sammelbegriff dar. Dazu zählen die biologisch aktiven Coenzyme Nicotinamid-adenin-dinucleotid-diphosphat (NADP) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) sowie auch die Nicotinsäure und deren Amid, das Nicotinamid. [PIETRZIK et al., 2008]

Das wasserlösliche Vitamin Niacin (Nicotinsäure) dient als Vorläufer für die Synthese der Coenzyme NAD und NADP. NAD- und NADP-gekoppelte Enzyme sind an einigen metabolischen Reaktionen beteiligt, die den Redox-Zustand von Zellen aufrechterhalten, einschließlich des Pentose-Phosphat-Zyklus und der Glykolyse. [SAID et al., 2007]

In pharmakologischen Dosen verringert Niacin im Plasma die Konzentration von Triglyceriden, Cholesterin und atherogenen Apolipoproteinen B (ApoB)-Lipoproteinen und erhöht die Konzentration von antiatherogenen ApoA-I-enthaltenden Lipoproteinen, welche eine atherosklerotische kardiovaskuläre Erkrankung verhindern können. [NABOKINA et al., 2005]

Nicotinsäure wird auch klinisch eingesetzt, da es - wie bereits erwähnt - eine Lipid-regulierende Wirkung aufzeigt. [SAID et al., 2007]

In Form der Coenzyme NAD und NADP ist Nicotinamid bevorzugt im tierischen Organismus zu finden. In pflanzlichen Geweben, wie unter anderem in Getreide und Kaffeebohnen, kommt vorrangig Nicotinsäure, in geringeren Mengen und hauptsächlich kovalent an Makromoleküle gebunden vor. Diese Form wird als Niacytin bezeichnet, welche eine nicht verwertbare Form für den Menschen darstellt. [DGNP, 2012]

Zusätzlich zu dem präformierten Vitamin, ist in vivo eine wichtige Vorstufe die Aminosäure L-Tryptophan, die dem Nahrungsprotein entnommen wird.

Da die gesamte menschliche Niacin-Versorgung und somit auch der Niacin-Status von der diätetischen Tryptophan-Versorgung abhängt, sowie auch von der Menge präformierten diätetischen Niacins und dessen Bioverfügbarkeit, wurde es zur gängigen Praxis, die Niacin-Aufnahme als $\text{Niacin-Äquivalente}$ darzustellen, einer Kombination aus präformierten Milligramm Niacin und diätetischen Milligramm Niacin durch die Umwandlung aus Tryptophan innerhalb des Körpers. [CABALLERO et al., 2005]

Ein Mangel an Nicotinsäure tritt beim Menschen selten auf, aber wenn doch, führt er zu Pellagra, einer Krankheit, die durch Entzündung der Schleimhäute, Hautveränderungen und Durchfall gekennzeichnet ist. Nicotinsäure-Mangel und suboptimale Konzentrationen wurden bei Patienten, die an der Hartnup-Krankheit leiden, und bei Alkoholikern festgestellt. Patienten mit der Hartnup-Krankheit weisen Mutationen in dem Gen auf, welches die Membran-Transporter der Aminosäure Tryptophan, die eine endogene Vorstufe der Nicotinsäure darstellt, kodiert. [SAID et al., 2007]

4.2 Biosynthese von Nicotinsäure/NAD und ihre Einflussfaktoren

NAD kann im menschlichen Körper auf drei verschiedenen Wegen hergestellt werden. Die für die NAD-Synthese wichtigen Ausgangsprodukte sind das Nicotinamid, die Nicotinsäure und auch die essentielle Aminosäure Tryptophan. Allerdings nur in der Niere und der Leber spielt diese NAD-Synthese aus L-Tryptophan eine Rolle. Hierbei sind durchschnittlich 60 mg L-Tryptophan einem Milligramm Nicotinamid äquivalent. Der Bedarf an Niacin wird somit in Niacinäquivalenten angegeben ($1 \text{ Niacinäquivalent (NÄ)} = 1 \text{ mg Niacin} = 60 \text{ mg L-Tryptophan}$). Bei Tryptophan-armer Ernährung gilt dieses Verhältnis

allerdings nicht, da die Proteinbiosynthese bei niedriger L-Tryptophanzufuhr limitiert ist und, bis ein Überschuss über den Bedarf zur Proteinsynthese die NAD-Synthese ermöglicht, L-Tryptophan ausschließlich für die Proteinsynthese verwendet wird. Folgernd ist darauf zu achten, dass ausreichend Tryptophan zugeführt wird. Wesentlich ist außerdem, dass auch Riboflavin, Pyridoxin und Folat in ausreichenden Mengen zugeführt werden, da auch diese Vitamine eine Beteiligung am Tryptophanstoffwechsel aufweisen. Weitere Einflussfaktoren der Niacin-Synthese aus L-Tryptophan stellen die Quantität und Qualität des Proteinkonsums und das Fettsäuremuster dar. Bei erhöhter Proteinzufuhr (> 30 %) sinkt die Konversionsrate von Tryptophan zu NAD, während bei erhöhter Zufuhr ungesättigter Fettsäuren die Umsetzung zunimmt. Vor allem ein Überschuss der Aminosäure Leucin löst Störungen im Niacin- beziehungsweise im Tryptophanstoffwechsel aus, da einerseits die Aktivität der Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase und in Folge auch die NAD-Synthese und andererseits die zelluläre Aufnahme von Tryptophan gehemmt werden. Somit kann gesagt werden, dass die endogene Synthese von Niacin aus L-Tryptophan in Abhängigkeit von der Qualität der Nahrung schwankt. Bei einer durchschnittliche Umsetzung von 60 mg Tryptophan zu 1 mg NÄ liegt die Schwankungsbreite zwischen 34 und 86 mg Tryptophan. Demzufolge ist es nicht möglich, genaue Angaben über die Eigensynthese von Niacin aus Tryptophan zu machen. [DGNP, 2012]

Menschen beziehen Nicotinsäure aus zwei unterschiedlichen Quellen: einer exogenen Quelle, bei der das Vitamin aus der Nahrung über intestinale Absorption bezogen wird, und einer endogenen Quelle, wobei das Vitamin (sofern die exogene Zufuhr des Vitamins niedrig ist) über die metabolische Umwandlung von Tryptophan erhalten wird. Nicotinsäure wird durch Zirkulation in verschiedenen Körpergeweben verteilt, wobei das Vitamin im Plasma mit einer Konzentration von $0,1 \cdot 1 \mu\text{M}$ vorliegt. [SAID et al., 2007]

4.3 Mechanismen zur Absorption von Nicotinsäure

Nach der Aufspaltung der Coenzyme im Magen, wird Nicotinamid bereits im oberen Dünndarm zum größten Teil nach bakterieller Hydrolyse in Form von freier Nicotinsäure fast vollständig absorbiert. Einem dosisabhängigen dualen Transportmechanismus nach, folgt die intestinale Aufnahme in die Mucosazellen. [DGNP, 2012]

Durch passive Diffusion werden höhere Dosen (3 . 4 mg) an Niacin absorbiert, und die Absorption von niedrigeren Niacindosen erfolgt durch einen Natrium-abhängigen, Carrier-vermittelten Transport. Im oberen Dünndarm erfolgt ebenfalls die rasche und nahezu vollständige Absorption von Nicotinsäure durch den gleichen Mechanismus. Die gleichzeitige Nahrungsaufnahme übt auf die Resorption von Nicotinsäure und Nicotinamid keinen Einfluss aus. [PIETRZIK et al., 2008]

Chemisch betrachtet ist Nicotinsäure eine Monocarbonsäure mit einem pK_a -Wert von 4,9. Der Transport von Monocarbonsäuren (z.B. Laktat, Pyruvat und die Ketonkörper Acetoacatat und -Hydroxy-Butyrat) wird in Zellen von Säugetieren durch die Familie der Monocarboxylat-Transporter (MCT) vermittelt. MCT's sind Carrier mit niedriger Affinität und zeigen eine scheinbare K_m im millimolaren Bereich. Frühere Studien haben über eine Hemmung der Niacin-Aufnahme durch Monocarbonsäuren berichtet, was die Einbeziehung der MCT-Systeme in der Niacin-Aufnahme möglich macht.

Um diese Fragestellung zu klären, wurden in einer Studie humane Darmepithelzellen, Caco-2-Zellen verwendet, sowie auch gereinigte Bürstensaummembranvesikel (BBMVs) aus dem Jejunum von Organspendern isoliert. Die Ergebnisse bezugnehmend auf die Niacin-Aufnahme von Caco-2 Zellen zeigen, dass sie:

1. Temperatur- und Energie-abhängig verläuft;
2. Na^+ -unabhängig und in hohem Maße von extrazellulären saurem pH ist;

3. sättigbar als Funktion der Konzentration, mit einer scheinbaren K_m von $0,53 \pm 0,08 \mu\text{M}$ abläuft;
4. durch die Membran-impermeablen Sulfhydrylgruppen von Reagenzien stark gehemmt wird und
5. hochspezifisch für Niacin ist und nicht die Monocarbonsäuren betrifft.

Es wurde auch beobachtet, dass durch eine deutliche *trans*-Stimulation von [^3H]Niacin aus vorgeladenen Caco-2-Zellen, unmarkiertes Niacin in den Inkubationspuffer läuft. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung eines spezialisierten, pH-abhängigen, Carrier-vermittelten Mechanismus für die intestinale Niacin-Aufnahme hin. Dieser Ansatz wurde in Studien mit nativen, humanen, intestinalen BBMV's bestätigt. Weiters wurde eine mögliche Regulierung der Niacin-Aufnahme durch Caco-2-Zellen über spezifische intrazelluläre Regulationsmechanismen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die PKA-, PKC- und CA^{2+} /Calmodulin-vermittelten Regulationsmechanismen keine Rolle bei der Regulierung der Niacin-Aufnahme spielen, im Gegensatz dazu aber eine Funktion für einen Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)-vermittelten Signalweg offensichtlich ist. Das Niacin Aufnahme-System in den Caco-2-Zellen scheint hochspezifisch zu sein. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Beobachtung, dass mit Ausnahme von unmarkiertem Niacin, die strukturellen Analoga nicht auf die Wirkung der Substrataufnahme getestet wurden (dazu zählen: Isonicotinsäure, Nicotinursäure, Niacinamid, Nicotinylnikotin und Iso-nicotinsäurehydrazid). Auch die verwandte Verbindung 5-Methyl-1H-pyrazol-3-Carbonsäure, die eine hohe Affinität für Liganden des Niacin-Rezeptors HM74A zeigt, beeinflusst nicht die Niacin-Aufnahme von Caco-2-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass der Aufnahme-Prozess der Caco-2-Zellen nichts mit diesem Rezeptor zu tun hat. [NABOKINA et al., 2005]

4.4 Charakterisierung des Natrium-gekoppelten Monocarboxylat-Transporters SLC5A8

Wie bereits beschrieben, wurde festgestellt, dass MCT1, eines der Mitglieder der Monocarboxylat-Transporter Genfamilie SLC16, Nikotinsäure transportieren kann. Dieser Mechanismus ist zumindest teilweise verantwortlich für die intestinale Absorption von Nicotinsäure. Der Transport von Nicotinsäure durch MCT1 beinhaltet einen elektroneutralen Co-Transport von Nicotinat und H^+ (Stöchiometrie von H^+ /Nicotinat, 1:1). Bilitranslokase, ein Membranprotein, das für die Extraktion von konjugiertem Bilirubin aus dem Blut in Hepatozyten zuständig ist, hat gezeigt, dass der Transport von Nicotinat über einen elektrisch aktiven Mechanismus erfolgt, allerdings gibt es keinen Co-Transport von anderen Ionen in diesem Prozess. Da jedoch die Expression von Bilitranslokase auf die Leber und den Magen beschränkt ist, während sich die Expression des MCT ubiquitär zeigt, wird angenommen, dass dieser der primäre Transporter für die Aufnahme von Nicotinat in den meisten Arten von Zellen ist. Aber MCT1 und Bilitranslokase sind nicht die einzigen Transporter, die für die Aufnahme von Nicotinat in Zellen von Säugetieren zuständig sind. Es wird ein Mitglied der Na^+ /Glucose-Co-Transporter Genfamilie beschrieben, welches kurzkettige Fettsäuren, Lactat und Pyruvat nach einer Na^+ -gekoppelten und elektrogenerischen Methode transportiert. Dieser Transporter, bekannt als SMCT (Natrium-gekoppelter Monocarboxylat-Transporter), wird im Dickdarm und in der Niere exprimiert und fungiert dort als Anionenaustauscher für Iodid. [GOPAL et al., 2005]

Auch wenn es keine strukturelle Ähnlichkeit zwischen MCT1 und SMCT gibt, und der Transportmechanismus sich in Bezug auf die Ionenkopplung und Elektrogenität unterscheidet, zeigen beide Transporter eine ähnliche Substratspezifität. [CUI und MORRIS, 2009]

SMCT ist ein Na^+ -gekoppelter Transporter und wird in der Niere exprimiert. Deshalb ist SMCT ein potentieller Kandidat für den Na^+ -gekoppelten Transport von Nicotinat, welcher in den renalen

Bürstensaummembranvesikeln beobachtet wurde. In einer Studie wurde anhand zweier unterschiedlicher Systeme die heterologe Expression von aus der Maus stammenden SMCT (slc5a8) gezeigt, welche in der Tat zur Vermittlung von Na^+ -gekoppelten und elektrogenen Transport von Nicotinat fähig ist. [GOPAL et al., 2005]

4.5 Funktionale Merkmale des SMCT-vermittelten Nicotinsäure-Transportes

Zu den funktionalen Merkmalen des SMCT-vermittelten Nicotinsäure-Transportes gehören folgende:

- a. Der Transportprozess ist zwingend abhängig von der Gegenwart von Na^+ .
- b. Der Transporter erkennt die anionische Form von Nicotinsäure (Nicotinat) als Substrat, da diese unter den experimentellen Bedingungen der Studie vorwiegend verwendet wurde.
- c. Lactat, Pyruvat und kurzkettige Fettsäuren, die Substrate die für SMCT bekannt sind, konkurrieren mit Nicotinat um den Transportprozess.
- d. Der Transportprozess ist elektrogen mit einer Stöchiometrie Na^+ /Nicotinat von 2:1.
- e. K_t für die Interaktion des Transporters mit Nicotinat beträgt 200 . 300 μM , in Abhängigkeit von dem experimentellen Verfahren zur Bestimmung der kinetischen Konstante.

Wenn die Fähigkeit von SMCT verschiedene strukturelle Analoga von Nicotinsäure zu transportieren, analysiert wird, ist ein Muster erkennbar. Das Substrat für den Transporter muss in der anionischen Form vorliegen, da das Unvermögen des Transporters, Nicotinamid und Methylnicotinat als Substrat zu erkennen, offensichtlich ist. Die Position der Carboxylatgruppe in Bezug auf das Stickstoffatom des Pyridinringes scheint für die Erkennung durch den Transporter wichtig

zu sein. Nicotinat, in der die Carboxylatgruppe und das Stickstoffatom durch ein Kohlenstoffatom getrennt sind, ist das beste Substrat. Wenn die Carboxylat-Gruppe zu dem Stickstoffatom benachbart ist, wie in 2-Picolinat, nimmt die Effizienz des Transportes zu. Liegt die Carboxylgruppe weiter vom Stickstoffatom entfernt, wie in Isonicotinat, nimmt die Effizienz des Transportes allerdings ab. Die Anwesenheit von mehr als einer anionischen Gruppe im Molekül, beeinträchtigt in erheblichem Maße die Fähigkeit des Transporters, die Verbindung als ein Substrat zu erkennen. [GOPAL et al., 2005]

4.6 Reabsorption von Nicotinat

SMCT wird hauptsächlich in der Niere, dem Dickdarm und der Schilddrüse exprimiert. In der Niere ist der Transporter für die Reabsorption von Lactat, Pyruvat und auch Nicotinat verantwortlich. [CUI und MORRIS, 2009] Anhand der Ergebnisse, dass SMCT nicht nur Lactat, sondern auch Nicotinat als seine Substrate erkennt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die renale Reabsorption von Nicotinat und Lactat durch den einzigen Transporter, nämlich SMCT, vermittelt wird. Allerdings gibt es einige Unterschiede in Bezug auf den Transportmechanismus für den SMCT-vermittelten Nicotinat/Lactat-Transport und für den Nicotinat/Lactat-Transport in den renalen Bürstensaummembranvesikeln. Mehrere Studien haben nachgewiesen, dass SMCT als elektrogener Transporter fungiert, unabhängig davon, ob das Substrat Lactat oder Nicotinat vorliegt. Es wurde festgestellt, dass die renale Reabsorption von Nicotinat und Lactat durch den gleichen Transporter, nämlich SMCT, durch den transmembranen elektrochemischen Gradienten für Na^+ aktiv ist. [GOPAL et al., 2005]

4.7 Natrium-gekoppelter Monocarboxylat-Transporter (SMCT) versus Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1)

Da SMCT im Gewebe von Säugetieren ubiquitär exprimiert ist, kann man darauf schließen, dass dieser Transporter nicht für den Transport von Nicotinsäure in jede Zelle zuständig ist. Der MCT1 kann Nicotinsäure transportieren und wird auch ubiquitär exprimiert. Deshalb kann angenommen werden, dass MCT1 eine bedeutende Rolle bei dem Transport von Nicotinsäure in den meisten Säugetierzellen spielt. Der Transport der Nicotinsäure, basierend auf den bekannten energetischen Aspekten, ist wahrscheinlich nicht effizient genug. MCT1 vermittelt die zelluläre Aufnahme von Nicotinat durch einen H⁺-gekoppelten Mechanismus mit einer H⁺/Nicotinat Stöchiometrie von 1:1. Dieses Kopplungsverhältnis macht den Transportprozess elektroneutral. Da es keinen signifikanten, transmembranen H⁺-Gradienten entlang der Plasmamembran in den meisten Zellen des Körpers gibt, kann die Aufnahme von Nicotinat über MCT1 nicht aktiv sein. Im Gegensatz dazu vermittelt SMCT den Transport von Nicotinat durch einen Na⁺-gekoppelten, elektrogenen Mechanismus. Das Na⁺/Nicotinat Kopplungsverhältnis von 2:1 und die elektrogene Natur machen den Transportprozess hochaktiv. Dies macht den Transporter SMCT zu einem geeigneten Transporter von Nicotinsäure bei der Reabsorption in der Niere. SMCT ist der einzige Transporter in der Niere, der für die Reabsorption von Nicotinsäure entlang der Bürstensaummembran fungiert, da es keinen Beweis für die Expression von MCT1 in dieser Membran gibt. Der hochaktive, Energie-gekoppelte Transportprozess, welcher durch SMCT vermittelt wird, ist von wesentlicher Bedeutung für eine effiziente Rückgewinnung von Nicotinsäure aus dem glomerulären Filtrat, da sehr geringe Mengen dieses Vitamins zirkulieren (0,1 . 3 µM). Die Situation im Intestinaltrakt sieht jedoch anders aus. MCT1 ist in der Bürstensaummembran des Dünndarms und des Dickdarms exprimiert.

Es ist klar, dass MCT1 eine Rolle bei der Absorption von Nicotinsäure im Dünndarm spielt. Darüber hinaus gibt es einen signifikanten transmembranen H^+ -Gradienten entlang der intestinalen Bürstensaummembran. Aufgrund des sauren mikroklimatischen pH-Wertes liegt dieser auf der luminalen Seite der Schleimhautzellen. Aus diesem Grund kann MCT1 einen erheblichen Teil zur intestinalen Absorption von Niacin beitragen. Da SMCT auch im Darm exprimiert ist, steht fest, dass sowohl SMCT als auch MCT1 an der aktiven intestinalen Absorption von diätetischer Nicotinsäure beteiligt sind. [GOPAL et al., 2005]

5. Thiamin

5.1 Allgemeine Aspekte

Thiamin zählt auch zu den wasserlöslichen Vitaminen, und seine Struktur besteht aus einem Pyrimidin- und einem Thiazolring, welche durch eine Methylenebrücke verbunden sind. In ihren metabolisch aktiven Formen wird die Hydroxylgruppe der Thiazoleinheit durch ein, zwei oder drei Phosphatgruppen ersetzt und zu drei phosphorylierten Coenzymen umgewandelt. [CABALLERO et al., 2005]

Vitamin B₁ ist an einer Vielzahl metabolischer Reaktionen beteiligt und somit notwendig für normale Funktionen, Wachstum und Entwicklung aller Säugetierzellen. [NABOKINA et al., 2005]

Thiamin fungiert als Coenzym TDP im Stoffwechsel von Kohlenhydraten und verzweigtkettigen Aminosäuren (-Keto-Isocapronsäure, -Keto- -Methylvaleriansäure und -Keto-Isovaleriansäuren). In Verbindung mit Mg²⁺ Ionen ist TDP wichtig (1) in verschiedenen Dehydrogenase-Komplexen für die Oxidation von -Ketosäuren (Pyruvat, -Ketoglutarat und die verzweigtkettigen -Ketosäuren) und (2) zur Bildung eines -Ketols zwischen der Hexose und dem Pentose-Phosphat das durch die Transketolase (EC 2.2.1.1) katalysiert wird. Somit hat ein Mangel an Thiamin schwerwiegende Folgen für die Energieerzeugung und für Aminosäure-Verbindungen, welche eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel, der Zellproliferation und neuraler Aktivität spielen.

Ein gut versorgter menschlicher Körper eines Erwachsenen enthält etwa 30 mg Thiamin: etwa 80-90 % in Form von Thiamin-Diphosphat (TDP), 10 % als Thiamin-Triphosphat (TTP) und eine kleine Menge an Thiamin-Monophosphat (TMP) sowie Thiamin. Wie für die meisten wasserlöslichen Vitamine gibt es keinen definierbaren Speicher im Körper; die einzigen Reserven sind Thiamin-Coenzyme, die in den meisten Zellen in Kombination mit Enzymen, welche Thiamin-abhängig sind, bestehen. Der Umsatz von Thiamin verläuft sehr rasch und das Fehlen von Speicher

macht eine kontinuierliche Versorgung mit dem Vitamin erforderlich. Somit kann der Thiamin-Status ziemlich schnell durch die Aufnahme betreffenden Faktoren (z.B. Erbrechen oder Alkoholmissbrauch), und die übermäßige Ausscheidung betreffend (z.B. induziert durch Diuretika), beeinträchtigt werden. [CABALLERO et al., 2005]

5.2 Charakterisierung der intestinalen Absorption und des Transportes von Thiamin

Menschen und andere Säugetiere können Thiamin nicht selbst synthetisieren, sondern gewinnen dies aus exogenen Quellen über intestinale Absorption. Der Mensch nutzt zwei Quellen an Thiamin: eine diätetische Quelle und eine bakterielle, bei der das Vitamin durch die Mikroflora des Dickdarms synthetisiert wird. Diätetisches Thiamin besteht überwiegend in Form von Thiamin-Pyrophosphat, welches im intestinalen Lumen durch intestinale Phosphatase zu freiem Thiamin hydrolysiert wird. [SAID, 2004]

Der Darm spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung und Regulierung der normalen Thiamin-Homöostase des Körpers. [SAID et al., 2004]

Die Absorption von Thiamin erfolgt im Zwölffingerdarm und im proximalen Jejunum durch einen dualen Mechanismus, der überwiegend sättigbar bei niedrigen, physiologischen Konzentrationen des Vitamins ($< 2,5 \mu\text{mol/l}$) ist und weitgehend nicht sättigbar (diffus) bei höheren Konzentrationen. Eine signifikante Menge des Thiamins, die den Enterozyten entnommen wird, phosphoryliert hauptsächlich zu TDP, wodurch es zu einem Einschließen des transportierten Thiamins innerhalb der absorbierenden Zelle kommt. Intrazelluläres TDP wird von mikrosomalen Phosphatasen vor dem Austritt zu freiem Thiamin phosphoryliert. Said et al. untersuchten 2004 die Aufnahme von radioaktiven [^3H]Thiamin anhand einer Zellkultur, die

konfluente Monolayer der humanen intestinalen Caco-2 Epithelzellen umfasste. Es wurde festgestellt, dass die Thiamin-Aufnahme

1. abhängig von Temperatur und Stoffwechsel-Energie,
2. pH-abhängig,
3. Na⁺-unabhängig,
4. gesättigt als eine Funktion der Konzentration und
5. durch strukturelle Analoga von Thiamin kompetitiv gehemmt ist.

Die Sättigbarkeit und kompetitive Hemmung deuten auf einen Carrier-vermittelten Transportprozess hin. Die Hemmung des Ca²⁺/Calmodulin-second-messenger-Systems resultiert in einer signifikanten Hemmung der Thiamin-Aufnahme, inklusive der Regulation der Thiamin-Absorption. Die Wirkung eines solchen Inhibitors, wie Trifluoperazin, verringert zwar die V_{max} nicht, aber die K_m des Thiamin-Aufnahmeprozesses. Dies deutet darauf hin, dass die hemmende Wirkung von Trifluoperazin über eine Down-Regulation des Thiamin-Carriers an der Bürstensaummembran vermittelt wird, die keine Auswirkung auf die Carrier-Affinität hat. [BALL, 2006]

Der Austritt von Thiamin aus den Enterozyten wurde unter Verwendung von jejunalen BLMVs, die von Organspendern isoliert wurden, untersucht, und es scheint ein spezialisierter, pH-abhängiger, elektroneutraler und Carrier-vermittelter Mechanismus involviert zu sein. Über ähnliche Ergebnisse wurde für den Thiamin-Transport durch BLMV des Rattendünndarms berichtet, mit der Ausnahme, dass in der Studie an Ratten, die Thiamin-Aufnahme Na⁺-K⁺-ATPase-abhängig verlief, während in Humanstudien keine derartige Abhängigkeit gefunden wurde. [SAID, 2004]

5.3 Molekulare Identität der Thiamin-Transporter hTHTR-1 und hTHTR-2

Einen Einblick in die molekulare Identität des Transportmechanismus von Thiamin im menschlichen Darm erhielt man nach der Klonierung der Thiamin-Transporter hTHTR-1 und hTHTR-2 aus einer Reihe von humanen Geweben. [SAID et al., 2004]

Zwei Proteine aus der Carrier-Genfamilie SLC19A wurden als humane Thiamin-Transporter (hTHTR), SLC19A2 (hTHTR-1) und SLC19A3 (hTHTR-2) identifiziert. Beide Transporter sind co-exprimiert, aber in unterschiedlichen polarisierten Zelltypen, welche den vektionalen Thiamin-Transport vermitteln (z.B. Nieren und Darmepithelzellen). Es ist wichtig die Struktur der Domänen dieser Proteine zu verstehen, nämlich diese Regionen innerhalb der Polypeptidsequenz, die für den physiologischen Transport an die Zelloberfläche wichtig sind, um die Auswirkungen von klinisch relevanten Mutationen im Thiamin-Transport nachzuvollziehen. [SUBRAMANIAN et al., 2006]

Die Membran-Domänen, an der diese beiden Proteine in den polarisierten intestinalen Epithelzellen exprimiert werden, unterscheiden sich voneinander. Obwohl es scheint, dass das THTR-1 Protein sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Membran-Domäne der polarisierten Enterozyten exprimiert wird, scheint im Gegensatz dazu die Expression des THTR-2 Proteins auf der apikalen Membran-Domäne begrenzt zu sein. [NABOKINA et al., 2005]

Die cDNA des hTHTR-1 kodiert ein Protein von 497 Aminosäuren, die 12 mutmaßliche Transmembran-Domänen aufweist, sowie einen Anteil von ~ 40 % der Identität mit dem humanen reduzierten Fotal-Carrier (hRFC). Es wurden jedoch keine funktionellen Überschneidungen zwischen diesen Transportern gefunden, das heißt, hTHTR-1 transportiert kein Folat und hRFC transportiert kein Thiamin. hTHTR-1 wird in verschiedenen Geweben des menschlichen Gastrointestinaltraktes exprimiert,

einschließlich des Dün- und Dickdarmes, sowie in den vom Menschen stammenden intestinalen Epithelzellen, Caco-2. [SAID et al., 2004]

Es wurde festgestellt, dass SLC19A2 in allen gastrointestinalen Geweben in folgender Reihenfolge exprimiert wird: Leber Magen Duodenum Jejunum Cecum Rectum Ileum. Die Expression von SLC19A1 wurde auch auf Proteinebene im nativen menschlichen Darm nachgewiesen. Mit dem Ansatz, dass die siDNA die einzelnen Thiamin-Transporter-Gene (SLC19A2 und SLC19A3) ausschaltet, haben Studien mit Caco-2-Zellen gezeigt, dass beide Transporter eine Rolle bei der normalen, intestinalen Thiamin-Absorption spielen. [SAID, 2004]

5.4 Transkriptionale Regulierung der Thiamin-Absorption

Die Regulierung des Thiamin-Aufnahmeprozesses im Dünndarm wurde ebenfalls untersucht unter Verwendung von Caco-2-Zellen als in vitro Modellsysteme für die absorptiven Enterozyten. Diese Zellen besitzen einen Thiamin-Aufnahmemechanismus, der ähnlich dem im nativen humanen Darm ist, das heißt spezifisch, pH-abhängig, Amilorid-sensitiv und Carrier-vermittelt. Unter Verwendung dieser Zellen, deutet einiges darauf hin, dass der Thiamin-Aufnahmeprozess unter der Regulation eines intrazellulären Ca^{2+} /CaM-vermittelten Signalweges abläuft. In einer anderen Studie mit intestinalen Mucosaschleimhaut-Biopsien wurde eine Hochregulation in der Thiamin-Aufnahme verglichen mit der Kontrollprobe gefunden, was darauf hindeutet, dass eine mögliche adaptive Regelung des intestinalen Thiamin-Aufnahmeprozesses durch die Substratebene stattfindet. [SAID, 2004]

In dem Versuch, die Regulation der Expression des humanen SLC19A2 Thiamin-Transporters darzustellen, haben Studien über die Klonierung und funktionelle Charakterisierung der 5'-regulatorischen Region berichtet, wobei die minimale Promotorregion, die für die basale Aktivität erforderlich ist, identifiziert wurde. In dieser Studie wurde in vitro der minimale Promotor SLC19A2 charakterisiert - unter Verwendung der Caco-2 Zellen - durch die Untersuchung der vermeintlichen cis-Elemente in ihrer regulatorischen Funktion der Promotor-Aktivität. Darüber hinaus wurde die Aktivität des SLC19A2-Promotors in vivo unter der Verwendung von transgenen Mäusen bestätigt und das Muster der Expression des SLC19A2 Promotor-Luciferase-Transgens etabliert. Die in vitro Ergebnisse haben die Aktivität des SLC19A2-Promotors bestätigt, die in den HepG2-Zellen der Leber signifikant höher ist als in den intestinalen epithelialen Caco-2-Zellen. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Aktivitäten des SLC19A2 Minimal-Promotors in Caco-2- und HepG2-Zellen variieren, und dass diese Aktivität gut mit dem endogenen RNA-Level korreliert. Es wird auch gezeigt, dass die cis-Elemente von GKLf, NF-1 und SP-1 zur Promotoraktivität in den intestinalen Epithelzellen beitragen, mit SP-1 speziell die Promotoraktivität, und dass die Transkriptionsfaktoren auch bei der Bildung von spezifischen DNA/Protein-Komplexen mit dem SLC19A2 Minimalpromotor beteiligt sind. Die Schlussfolgerung ist, dass menschliche Gewebe die Expression von SLC19A2 durch die Promotor- und cis-regulatorischen Elemente differentiell regulieren und die Faktoren GKLf, NF-1 und/oder SP-1 eine Rolle bei der Regulation spielen. [REIDLING et al., 2003]

Eine Studie von Nabokina et al., 2005 zeigte erstmals, dass die Differenzierung von intestinalen Epithelzellen mit einer Up-Regulation im Thiamin-Aufnahme-Prozess assoziiert ist, und dass diese Hochregulation, die über einen transkriptionellen, regulatorischen Mechanismus vermittelt wird, die SLC19A2 und SLC19A4 Gene involviert. Weiters wurde demonstriert, dass der intestinale Thiamin-Aufnahmeprozess durch einen Thiamin-Mangel reguliert wird, sowie auch durch die Ontogenese, und

dass diese regulatorischen Ereignisse transkriptionale regulatorische Mechanismen miteinbeziehen. Die Darmepithelzellen unterziehen sich der Differenzierung, während sie sich entlang der Krypten/Zotten-Achse bewegen. Diese Differenzierung wird mit der Up- und Down-Regulation der Expression von einer Vielzahl von Genen, einschließlich derjenigen, die an der Nährstoffabsorption beteiligt sind, assoziiert. Zum Beispiel wird die Differenzierung der intestinalen Epithelzellen assoziiert mit der Hochregulation auf Ebene der Expression der Gene in der Aufnahme von Ascorbinsäure und Eisen, während eine Abnahme im Niveau der Expression der Gene in die Glutamin-Aufnahme involviert ist. Um die Frage nach der Regulation der intestinalen Thiaminaufnahme während der Differenzierung zu klären, wurden zwei Modelle verwendet: die humanen intestinalen epithelialen Caco-2-Zellen und der Maus-Darm. Die Maus stellt ein hervorragendes Tiermodell dar, um die physiologische Relevanz der in vitro Beobachtung in Bezug auf die Thiamin-Aufnahme im Darm zu etablieren, da es die Orthologie der hTHTR-1 und hTHTR-2 ausdrückt, das heißt, die SLC19A und SLC19A3 Gene werden exprimiert. Auch gut charakterisiert sind transgene Linien von Mäusen, die funktionale, humane SLC19A2 und SLC19A3 Promotoren transportieren und als gutes Modell dienen um den Effekt der Differenzierung von intestinalen Epithelzellen auf die Promotoraktivität in vivo zu untersuchen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Differenzierung von Epithelzellen mit einer Hochregulation der intestinalen Carrier-vermittelten Thiamin-Aufnahme assoziiert ist. Es wurde festgestellt, dass diese Hochregulation der Thiamin-Aufnahme (zumindest teilweise) über transkriptionelle Regulationsmechanismen vermittelt wird, in welche die Induktion der Aktivitäten beider humanen SLC19A2 und SLC19A3 involviert sind. [NABOKINA et al., 2005]

5.5 Thiamin-Absorption: Einfluss von Ethylalkohol und Chronischer Nierenerkrankung sowie deren Auswirkungen

Ein zweiter passiver Absorptionsprozess findet nach der Zufuhr von Thiamin > 5 mg statt, allerdings ist das Maximum einer oralen Dosis, die so absorbiert werden kann, auf $2 - 5$ mg festgesetzt. Der aktive Absorptionsprozess wird durch Ethylalkohol beeinträchtigt. So wurden zum Beispiel 55 % einer oralen Dosis von 5 mg gekennzeichnetem Thiamin über 72 Stunden bei gesunden Erwachsenen gewonnen, was allerdings um $25 - 40$ % reduziert wird bei der Gabe von $1,5 - 2$ g Alkohol/kg. Bei Menschen mit einer Fettleber, die auf Alkoholmissbrauch zurückzuführen ist, ist die Thiamin-Absorption um 60 % reduziert. Allerdings ist weder die passive Absorption von Thiamin durch Alkohol beeinträchtigt, noch ist der Eintritt von Thiamin in die Leber oder der Thiamin-Stoffwechsel in den Geweben gestört. Die Absorption von Thiamin kann durch gastrointestinale Störungen, wie Erbrechen und Durchfall, Colitis ulcerosa und Neoplasien, sowie bei Patienten mit Lebererkrankungen und Achlorhydrie reduziert werden. [CABALLERO et al., 2005]

Chronische Nierenerkrankung (CKD) ist assoziiert mit signifikanten, kardiovaskulären, neurologischen und metabolischen Komplikationen. Thiamin und Folsäure sind wichtig für Wachstum, Entwicklung und normale zelluläre Funktionen, und ihre Aufnahme wird durch ein reguliertes Transportsystem vermittelt. Während die Plasmaspiegel von Folsäure und Thiamin in der Regel bei CKD im Normbereich liegen, zeigen sich jedoch häufig Erscheinungen, die einem Vitaminmangel ähnlich sind. Studien haben über eine verminderte intestinale Absorption von mehreren B-Vitaminen bei experimenteller CKD berichtet. Chronische Nierenerkrankung ergibt sich aus der gekennzeichneten Down-Regulation der Expression von Thiamin- und Folsäure-Transporters in Darm, Herz, Leber und Gehirn. Diese Ereignisse können zu einer reduzierten

intestinalen Absorption und beeinträchtigt zelluläre Homöostase dieser essentiellen Mikronährstoffe, trotz ihres normalen Plasmaspiegels, führen. Thiamin dient als Cofaktor für mehrere Enzyme in entscheidenden metabolischen Reaktionen, die im Energiestoffwechsel aktiv sind. Da es auch eine Überleitung vom glykolytischen zum Pentose-Phosphat-Weg gibt, ist Thiamin auch kritisch für die Erhaltung der Reduktionskraft in den Zellen zu betrachten. Daher spielt Thiamin eine wichtige Rolle bei der Verringerung von zellulärem, oxidativem Stress. Folgend kann gesagt werden, dass niedrige, intrazelluläre Konzentrationen von Thiamin zu einer Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels führen und eine Tendenz zu oxidativem Stress zeigen, was ein häufiger Befund bei CKD ist. Auf der klinischen Ebene führt Thiamin-Mangel zu einer Vielzahl von Anomalien, die neurologische (Neuropathie, Wernicke-Korsakoff-Syndrom) und kardiovaskuläre (zum Beispiel Vasodilatation, biventrikuläres myocardiales Versagen, Ödeme und potentiell akuter Kreislaufkollaps) Erkrankungen umfassen. [BUKHARI et al., 2011]

6. Pyridoxin (Vitamin B₆)

6.1 Allgemeine Aspekte

Das wasserlösliche Vitamin B₆ stellt einen Sammelbegriff für alle vitaminwirksamen Derivate des 3-Hydroxy-2-Methylpyridins dar. Durch ihre verschiedenen Substituenten am vierten Kohlenstoffatom (C₄) unterscheiden sich diese Pyridinderivate voneinander. Es handelt sich bei den Substituenten um Aldehydreste, Methyl-Hydroxygruppen oder Methyl-Aminogruppen. Man unterscheidet also demnach zwischen dem Aldehyd Pyridoxal (PL), dem Amid Pyridoxamin (PM) und dem Alkohol Pyridoxin beziehungsweise Pyridoxol (PN). Diese drei Formen, PL, PM und PN können an ihrem fünften Kohlenstoffatom (C₅) phosphoryliert werden, und in Folge entstehen daraus das Pyridoxal-5'-phosphat (PLP), Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP) und das Pyridoxin-5'-phosphat (PNP). Alle diese genannten Derivate weisen eine Vitaminaktivität auf und lassen sich binnen des Stoffwechsels ineinander überführen. Pyridoxal-5'-phosphat und Pyridoxamin-5'-phosphat stellen die eigentlichen biologisch aktiven Formen dar. [DGNP, 2012]

Vitamin B₆ spielt eine wesentliche Rolle als Cofaktor bei einer Vielzahl von metabolischen Reaktionen, die den Aminosäuren- (Homocystein), Kohlenhydrat- und Neurotransmitterstoffwechsel sowie die Sphingolipid-Biosynthese umfassen. [SAID et al., 2008]

Es wirkt auch als Coenzym der Glycogenphosphorylase und reguliert die Aktivität von Steroiden und anderen Hormonen (einschließlich Retinoiden und Vitamin D), die bei der Regulierung der Genexpression eine Rolle spielen.

Ein erheblicher Anteil der Personen in Entwicklungsländern weist einen marginalen Vitamin B₆-Status auf. Dies wird mit einer erhöhten Reaktionsfähigkeit auf den Einfluss der Steroidhormone assoziiert und ist auch ein Faktor in der Entwicklung von hormonabhängigen Brust-,

Gebärmutter- und Prostatakrebs. Eine Reihe von Medikamenten weist eine Anitvitamin-Aktivität auf, was nach längerer Verabreichung und in Folge der Beeinträchtigung des Tryptophanstoffwechsels sekundär zu Pellagra führen kann. Östrogene verursachen keinen Vitamin B₆-Mangel. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass hohe Dosen an Vitamin B₆ einige Nebenwirkungen bewältigen können, die bei dem Einsatz von östrogenen Steroiden in Kontrazeptiva und auch bei der klimakteren Hormon-Ersatz-Therapie auftreten können. Bei der Einnahme von sehr hohen Dosen können Supplemente zu sensorischen Nervenschäden führen. [CABALLERO et al., 2005]

Vitamin B₆ wird von Pflanzenzellen und den meisten einzelligen Mikroorganismen synthetisiert, jedoch verfügen der Mensch und andere Säugetiere nicht über diese Fähigkeit, und somit muss es von einer exogenen Quelle über intestinale Absorption zugeführt werden. [SAID et al., 2008]

Der Darm ist zwei unterschiedlichen Quellen an Vitamin B₆ ausgesetzt: (1) der diätetischen und (2) der bakteriellen Quelle, bei der das Vitamin durch die normale Mikroflora des Dickdarms synthetisiert wird. [BALL, 2006]

Da im Kolon keine Absorption stattfindet, steht das dort synthetisierte Vitamin B₆ dem Körper nicht zur Verfügung. [PIETRZIK et al., 2008]

6.2 Charakterisierung der Absorption von Vitamin B₆

Vitamin B₆ ist in Lebensmitteln hauptsächlich in Form von PN, PLP und PMP zu finden. Hauptsächlich in Obst oder Gemüse liegen 30 % oder mehr des gesamten Vitamin B₆ als PN-Glycosid vor. Die Bindung von PLP an Protein durch Almidin (Schiff'sche Base) und eine substituierte Almidin-Verbindung ist reversibel sowie auch abhängig vom pH-Wert, weiters ist der Vitamin-Protein-Komplex unter den Bedingungen der normalen

Magensäure (niedriger pH-Wert) leicht dissoziiert. Die Freisetzung von PLP aus der Verbindung mit dem Protein ist ein wichtiger Schritt in der nachfolgenden Aufnahme von Vitamin B₆, da die Bindung an Protein den nächsten Schritt, die Hydrolyse von PLP durch Alkin-Phosphatase, hemmt. Die Absorption von PN, PL und PM findet hauptsächlich im Jejunum statt und ist ein dynamischer Prozess, der mehrere miteinander verbundene Ereignisse miteinschließt. Die Vitamere überqueren die Bürstensaummembran durch einfache Diffusion. Innerhalb der Enterozyten werden PN, PL, PM in ihre entsprechenden Phosphate durch katalytische Wirkung von zytoplasmatischer Pyridoxalkinase umgewandelt, und durch die Transaminase interkonvertieren PLP und PMP ineinander. Die Umwandlung von einem bestimmten Vitamin in eine andere Form durch den intrazellulären Stoffwechsel erzeugt einen Konzentrationsgradienten über der Bürstensaummembran für dieses Vitamin und führt somit zu einer Verbesserung dessen Aufnahme durch Diffusion. Die phosphorylierten Vitamere, die in der Zelle gebildet werden, sind weitgehend durch unspezifische Phosphatasen dephosphoryliert, wodurch es zu einer einfachen Verbreitung von B₆-Verbindungen an der basolateralen Membran kommt. Die Hauptform von Vitamin B₆, die im Pfortaderkreislauf freigesetzt wird, ist die nicht-phosphorylierte Form des vorherrschenden Vitamins im Darmlumen. [BALL, 2006]

Die phosphorylierten Vitamere sind durch membrangebundene alkalische Phosphatase in der Darmschleimhaut dephosphoryliert; alle drei Vitamere werden also durch Carrier-vermittelte-Diffusion absorbiert, gefolgt von Oxidation und Phosphorylierung. Somit kommt es zur Akkumulation von Pyridoxalphosphat, das die Zellmembran nicht durch *metabolic trapping* durchqueren kann. Beide, Pyridoxal und Phosphat, zirkulieren im Blut, wobei das Phosphat durch extrazelluläre alkalische Phosphatase dephosphoryliert wird und das Gewebe Pyridoxal durch Carrier-vermittelte Diffusion aufnimmt, gefolgt von *metabolic trapping* als Phosphatester. Pyridoxin und Pyridoxaminphosphat werden zu Pyridoxalphosphat oxidiert. Die Gewebskonzentration von Pyridoxalphosphat wird durch das

Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung gesteuert. Die Aktivität der Phosphatasen ist in den meisten Geweben größer als diejenige der Kinase, sodass Pyridoxalphosphat, das nicht an Enzyme gebunden ist, dephosphoryliert wird. Freies Pyridoxal verlässt entweder die Zelle oder wird durch die Aldehyd-Dehydrogenase zu 4-Pyridoxsäure oxidiert. Die Aldehyd-Dehydrogenase ist in allen Geweben präsent, sowie auch in der renalen und hepatischen Aldehydoxidase. [CABALLERO et al., 2005]

6.3 Regulierung der Pyridoxin-Absorption in humanen Epithelzellen

Aufgrund der Natur des wasserlöslichen Vitamins B₆ und der Demonstration, dass der Transport der anderen wasserlöslichen Vitamine in Darmepithelzellen durch einen Carrier-vermittelten Transport erfolgt, wird die Hypothese aufgestellt, dass der Transport von Vitamin B₆ in Caco-2-Zellen ebenfalls Carrier-vermittelt ist. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Pyridoxin-Transport in einem Modellsystem für humane Enterozyten, die vom Menschen abgeleiteten Darmepithelzellen Caco-2, untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Pyridoxin-Aufnahme

1. linear mit der Zeit bis zu 10 Minuten der Inkubation und mit minimaler Veränderung der metabolischen Alteration im transportierten Substrat austritt,
2. Temperatur- und Energie-abhängig, aber Na⁺-unabhängig ist,
3. pH-abhängig mit höherer Aufnahme bei saurem pH-Wert verglichen mit alkalischem pH-Wert verläuft,
4. sättigbar als Funktion der Konzentration mit einer scheinbaren Michaelis-Menten-Konstante von $11,99 \pm 1,41 \mu\text{M}$ und einer Maximalgeschwindigkeit von $67,63 \pm 3,87 \text{ pmol mg Protein}^{-1,3} \text{ min}^{-1}$ ist,

5. durch strukturelle Analoga von Pyridoxin (bei pH 5,5, aber nicht 7,4) aber nicht von unabhängigen Verbindungen gehemmt wird, und
6. in kompetitiver Weise durch Amilorid mit einer scheinbaren Hemmkonstante (K_i) von 0,39 nM inhibiert wird.

Es wurde auch die mögliche Regulierung der Pyridoxin-Aufnahme durch spezifische intrazelluläre Regulationsmechanismen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass, während Modulatoren von PKC-, Ca^{2+} /Calmodulin- und Stickstoffmonoxid-vermittelten Signalwegen keine Auswirkungen auf die Pyridoxin-Aufnahme hatten, Modulatoren von PKA-vermittelten Signalwegen eine signifikante Reduktion der Pyridoxin-Aufnahme verursachen. Diese Reduktion wurde über eine signifikante Hemmung der V_{max} , nicht aber der scheinbaren K_m der Pyridoxin-Aufnahme vermittelt. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die Vitamin B₆-Aufnahme durch humane intestinale Caco-2-Epithelzellen über einen spezialisierten, Carrier-vermittelten Mechanismus verläuft. Dieser Mechanismus ist pH-abhängig und Amilorid-sensitiv und scheint unter der durch einen intrazellulären Proteinkinase A - vermittelten Signalweg reguliert zu werden. [SAID et al., 2003]

6.4 Pyridoxin-Absorption in humanen Kolonozyten

Wie bereits erwähnt, wird eine erhebliche Menge an freiem Vitamin B₆ durch die normale Mikroflora des Dickdarms synthetisiert, das Vitamin existiert im Darmlumen und steht zur Absorption zur Verfügung. Es existieren Hinweise darauf, dass der Dickdarm das Vitamin aus dieser Quelle absorbieren kann. Um diese Problematik zu klären, wurde dies in einer Studie anhand der YAMC-Zellen aus kultiviertem Maus-Kolon und nativen humanen AMV-Zellen als Modell und Pyridoxin als Substrat untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Pyridoxin-Aufnahme pH-sensitiv ist, mit einem Anstieg des pH-Wertes während der Absorption auf

6,5 und höher, aber es zeigte sich eine verminderte Aufnahme bei niedrigen pH-Werten des Inkubationspuffers. Diese Eigenschaften der Pyridoxin-Aufnahme durch YAMC-Zellen des Kolons sind ähnlich den Charakteristika in den renalen Epithelzellen, wo ebenfalls eine Aufnahme bei höheren neutralen/alkalischen pH-Wert im Vergleich mit dem sauren pH-Wert des Inkubationspuffers festgestellt wurde. Die Aufnahme von Pyridoxin durch die YAMC-Zellen war Na^+ -unabhängig, und es gab einen isoosmotischen Austausch von Na^+ im Inkubationspuffer mit anderen monovalenten Kationen oder Mannitol. Das Fehlen der Funktion von Na^+ in der Pyridoxin-Aufnahme ist vergleichbar mit dem Modell der intestinalen Epithelzellen. Die Anfangsgeschwindigkeit der Pyridoxin-Aufnahme durch die YAMC-Zellen war gesättigt als eine Funktion der Erhöhung der Substratkonzentration im Inkubationsmedium, was darauf hindeutet, dass ein Carrier-vermittelter Mechanismus am Aufnahme-Prozess beteiligt ist. Diese Annahme wurde durch die Feststellung einer wesentlichen cis-Hemmung in der anfänglichen Rate der [^3H]Pyridoxin-Aufnahme durch unmarkiertes Pyridoxin, sowie Pyridoxin-verwandte Verbindungen . Pyridoxal, Pyridoxal-5'-Phosphat und Pyridoxin . bestätigt. Die Unfähigkeit des unabhängigen Penicillamin, Theophyllin und Homocystein, die anfängliche [^3H]Pyridoxin-Aufnahme durch YAMC zu beeinflussen, zeigt die Spezifität des kolonaren Pyridoxin-Aufnahmeprozesses. Nicht nur die Kolonozyten der Maus, sondern auch menschliche Kolonozyten haben einen funktionalen Pyridoxin-Aufnahmemechanismus. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Beobachtung einer signifikanten Hemmung der [^3H]Pyridoxin-Aufnahme durch unmarkiertes Pyridoxin in gereinigten nativen und humanen AMV des Kolons, die aus der Darmschleimhaut von Organspendern isoliert wurden. [SAID Z. et al., 2008]

6.5 Einfluss und Regulierung des Pyridoxin-Absorptionsprozesses in Kolonozyten

Der Pyridoxin-Aufnahmeprozess im Kolon scheint durch extrazelluläre und intrazelluläre Faktoren reguliert zu werden. Extrazelluläre Pyridoxin-Levels scheinen eine deutliche Wirkung auf die Aufnahme von Pyridoxin durch die YAMC-Zellen auszuüben. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Beobachtung, dass es bei der Beibehaltung dieser Zellen in einem Nährmedium in Abwesenheit von Pyridoxin-Übersupplementierung zu einer signifikanten höheren Aufnahme von [³H]Pyridoxin durch diese Zellen kam, verglichen mit den Zellen die einer Übersupplementierung an Pyridoxin ausgesetzt waren. Die Erhöhung der Pyridoxin-Aufnahme in Abwesenheit einer Übersupplementierung scheint über transkriptionale/translationale Mechanismen vermittelt zu sein. Dies beruht auf den Erkenntnissen, dass die Gegenwart von Actinomycin (Transkriptioninhibitor) und Cyclohexamin (Translationsinhibitor) die Induktion der Pyridoxin-Aufnahme durch Umschalten in den aufrechterhaltenden Zustand der Zelle von hohen zu niedrigen Pyridoxin-Levels inhibiert. Der Aufnahmeprozess von Pyridoxin im Dickdarm scheint auch intrazellulär geregelt zu werden. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung der Hemmung der Pyridoxin-Aufnahme durch Inhibitoren, die auf dem Ca²⁺/CaM-vermittelten Weg basieren. Die zellulären und molekularen Mechanismen, die die Ca²⁺/CaM-vermittelte Regulation der Pyridoxin-Aufnahme durch Kolonepithelzellen vermitteln, sind nicht bekannt, und es sind weitere Studien erforderlich, um diese Frage zu klären. Andere intrazelluläre Signalwege, wie PKA-, PKC- und NO-vermittelte Regulationswege, scheinen jedoch keinen regulatorischen Effekt auf die Pyridoxin-Aufnahme auszuüben. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen des Pyridoxin-Aufnahmeprozesses, der in Nierenepithelzellen beobachtet wurde, aber unterscheiden sich von jenen Ergebnissen mit den enterozytischen Caco-2-Zellen, in denen ein PKA- aber kein Ca²⁺/CaM-vermittelter Signalweg gefunden wurde, der eine Rolle in der Pyridoxin-Aufnahme spielt. Diese Befunde legen nahe, dass

unterschiedliche Zelltypen verschiedene Mechanismen zur Pyridoxin-Aufnahme verwenden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse die funktionale Existenz eines spezifischen Carrier-vermittelten Mechanismus für die Pyridoxin-Aufnahme in Kolonozyten von Säugetieren. Weiters wurde festgestellt, dass dieser Aufnahmeprozess von extrazellulären wie intrazellulären Faktoren reguliert wird. [SAID Z. et al., 2008]

6.6 Einflussfaktoren auf die Pyridoxin-Aufnahme

Ein Mangel an Vitamin B₆ bei Menschen, der zu einer Vielzahl klinischer Auffälligkeiten und neurologischen Erkrankungen führen kann, tritt unter Bedingungen wie chronischem Alkoholismus und Diabetes, bei Patienten mit Zöliakie und Nierenerkrankungen, sowie auch nach einer langfristigen Nutzung von Hydrazinen (z.B. Isoniazid) und Penicillamin, auf. Auf der anderen Seite ist eine Supplementierung mit Pyridoxin wirksam bei der Behandlung von Pyridoxin-abhängigen Anfällen bei Neugeborenen und Kleinkindern. Diese Anfälle stellen eine autosomal-rezessive, angeborene Störung des Stoffwechsels dar, und es wird angenommen, dass dies aufgrund einer Anomalie in der zellulären Pyridoxin-Aufnahme verursacht wird. [SAID Z. et al., 2008]

Die Synthese von Vitamin B₆ kann auch durch Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes beeinträchtigt werden. Eine signifikante Verringerung der Absorption und/oder der Bioverfügbarkeit von Vitamin B₆ ist auch bei geschädigten Transportmechanismen in der Dünndarmschleimhaut oder fehlenden Enzymsystemen zu beobachten. Weiters ist auch eine Wechselwirkung von Pharmaka und Vitamin B₆ zu beobachten. Tuberkulostatika, wie Isoniazid, erhöhen die renale Vitamin B₆-Ausscheidung, und gleichzeitig kommt es zur Bildung eines Hydrazon-Komplexes, der das Vitamin inaktiviert. Die verfügbare Menge an Vitamin

B₆ wird ebenso durch orale Kontrazeptiva oder durch Antihypertensiva, wie Hydralazin, vermindert. [DGNP, 2012]

In den folgenden zwei Punkten wird der Einfluss von Alkohol und Ballaststoffen auf die Absorption von Pyridoxin ausführlich besprochen.

6.6.1 Der Effekt von Alkohol

Der übermäßige Alkoholkonsum verringert die Nährstoffaufnahme um bis zu 50 %. Alkoholische Getränke, die als Nahrungersatz zugeführt werden, sind praktisch frei von Vitamin B₆, und in Folge ist der Alkoholiker daher wahrscheinlich mit Vitamin B₆ unterversorgt. Chronischer, übermäßiger Alkoholkonsum kann die normalen Prozesse des Vitamin B₆-Stoffwechsels negativ beeinflussen, was zu einem erhöhten Bedarf an Vitamin B₆ führt. Die Umwandlung von intravenös verabreichten PN zu PLP im Plasma ist bei alkoholkranken Patienten beeinträchtigt, was darauf hindeutet, dass Alkohol selbst oder seine Oxidationsprodukte den Stoffwechsel von Vitamin B₆ direkt stören. Es gibt in vitro Nachweise, dass Acetaldehyd die Dissoziation von PLP aus seiner Bindung mit dem Protein ermöglicht, wodurch die PLP für die Hydrolyse durch die membrangebundene alkalische Phosphatase verfügbar ist. So ist die Generierung von Acetaldehyd mit Alkoholismus assoziiert und beschleunigt die Degeneration von PLP, was zu einer Senkung der Plasmakonzentration und der Körperspeicher führt. Ethanol kann auch Impulse für die renale Ausscheidung von nicht-phosphorylierten Vitamin B₆-Vitaminen liefern. Die Absorption von Vitamin B₆ aus der Nahrung ist bei alkoholkranken Patienten mit Lebererkrankungen signifikant herabgesetzt, obwohl diese Patienten in der Regel in der Lage sind, synthetisches Vitamin B₆ zu absorbieren. Lebererkrankungen können ebenfalls die Fähigkeit der Leber beeinträchtigen, PLP zu synthetisieren. [BALL, 2006]

6.6.2 Der Effekt von Ballaststoffen

Experimentelle Studien mit Ratten oder Küken haben gezeigt, dass Ballaststoffe in gereinigter oder teilweise gereinigter Form keinen großen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Vitamin B₆ bei Tieren aufweisen. Eine große Vielzahl von Ballaststoffen (Polysaccharide, Lignin und Weizenkleie) binden nicht und schließen keine B₆-Vitamere in vitro ein, und in einer Ratten - Jejunum - Perfusions - Studie ließ sich in Bezug auf Cellulose, Pektin und Lignin kein Effekt bezüglich der Vitamin B₆ Absorption feststellen. Cellulose, Pektin und Kleie haben geringe oder keine Auswirkungen auf die Verfügbarkeit von Vitamin B₆ bezugnehmend auf einen Bioassay von Küken, und weder Cellulose oder die unverdaulichen Komponenten in Weizenkleie beeinträchtigen die Bioverfügbarkeit bei Ratten. Es ist wenig über eine mögliche hemmende Wirkung von Nahrungsfasern in der Bioverfügbarkeit von Vitamin B₆ beim Menschen bekannt. Die Verfügbarkeit von Vitamin B₆ in Vollkornbrot ist 5-10 % geringer als diese von Weißbrot, welches mit Vitamin B₆ angereichert ist, und die Zugabe von Weizenkleie (15 g/d) zur menschlichen Ernährung führte zu einer geringen Abnahme (maximal 17 %) der Verfügbarkeit des Vitamins. [BALL, 2006]

Ballaststoffe haben allerdings eine verminderte Verfügbarkeit von Pyridoxin zur Folge. Sie weisen die Fähigkeit zu Gelbildung . scage effect%o . auf, was dazu führt, dass Vitamin B₆ der Absorption entzogen und über die Nieren aus dem Organismus eliminiert wird. [DGNP, 2012]

7. Riboflavin

7.1 Allgemeine Aspekte

Riboflavin (Summenformel $C_{17}H_{20}N_4O_6$) ist eine Kurzbezeichnung für die biologisch-aktive Verbindung 7,8-Dimethyl-10-(1-D-ribityl)isoalloxazin, welche von der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) vorgeschlagen wird. [PIETRZIK et al., 2008]

Vitamin B₂ (Riboflavin, RF) ist für die normalen zellulären Funktionen, Wachstum und Entwicklung von wesentlicher Bedeutung. In der Form der Coenzyme (Riboflavin-5-phosphat, FMN und Flavin-adenosin-dinucleotid, FAD) spielt das Vitamin eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Übertragung von Elektronen in biologischen Oxidations-Reduktions-Reaktionen unter Beteiligung des Kohlenhydrat-, Lipid- und Aminosäuren-Stoffwechsels sowie der Umwandlung von Pyridoxin und Folat in ihre aktiven Formen. Studien haben auch eine Funktion für Riboflavin in der oxidativen Faltung der Proteine im Endoplasmatischen Reticulum (ER) demonstriert. [SUBRAMANIAN et al., 2011]

Das trizyklische Isoalloxazinringsystem stellt die Grundstruktur von Vitamin B₂ dar und besitzt ausgesprochene Redox Eigenschaften (Reduktions-/Oxidationseigenschaften). Ribit ist ein fünffacher Alkoholzucker, der am N₁₀-Atom des Isoalloxazinmoleküls gebunden und für die Vitaminwirksamkeit entscheidend ist. Riboflavin besitzt wie Thiamin eine hohe Strukturspezifität, und aus diesem Grund führen geringfügige Veränderungen am Molekülaufbau zu einer Minderung beziehungsweise zu einem Verlust der Vitaminwirksamkeit. In bestimmten Fällen kann dies auch mit einer antagonistischen Wirkungsweise einhergehen. Zur Entfaltung seiner biologischen Aktivität muss am C₅-Atom der Ribitolseitenkette, Riboflavin unter Einwirkung der Riboflavinkinase phosphoryliert (FMN) und danach anhand einer Pyrophosphorylase adenyliert (FAD) werden. [DGNP, 2012]

7.2 Absorption und Transport von Riboflavin

Menschen und andere Säugetiere können Riboflavin nicht synthetisieren, daher muss das Vitamin aus exogenen Quellen über intestinale Absorption zugeführt werden. [SUBRAMANIAN et al., 2011]

Das mit der Nahrung aufgenommene FMN und FAD wird durch eine nicht-kovalente Bindung an Flavoproteine gebunden als Folge der Acidifizierung im Magen und Darm, sowie intestinaler Proteolyse. Die Flavin-Coenzyme werden im oberen Dünndarm zu freiem Riboflavin hydrolysiert und anschließend absorbiert. Die Hydrolyse, sowohl von FMN als auch von FAD, wird durch eine alkalische Phosphatase bewirkt, die eine breite Spezifität aufweist und auf der Bürstensaummembran der Enterozyten lokalisiert ist. Zwei zusätzliche Bürstensaum-Enzyme, FMN-Phosphatase und FAD-Pyrophosphatase, sind Teil des Abbaus der Flavin-Coenzyme. Die wesentlich geringen Mengen an kovalent gebundenen Flavinen setzen 8 -(Peptidyl)-Riboflavine, welche zusammen mit freiem Riboflavin absorbiert werden, frei. [BALL, 2006]

Die Aufnahme über den Darm von freiem Riboflavin im oberen Dünndarm, vor allem jedoch im proximalen Jejunum, unterliegt einem dosisabhängigen dualen Transportmechanismus. Im physiologischen Bereich bis zu 25 mg wird Vitamin B₂ aktiv anhand eines Carriers und in Abhängigkeit eines Natrium-Gradienten nach der Sättigungskinetik resorbiert. Durch passive Diffusion erfolgt die Resorption von Vitamin B₂ oberhalb dieser physiologischen Dosen. [DGNP, 2012]

Obwohl der aktive Transport von Riboflavin durch die Darmwand und über andere Zellmembran-Barrieren innerhalb eines Tieres ein sättigbarer Prozess ist, verläuft dieser bei großen pharmakologischen Mengen langsamer und weniger effizient. Jedoch überwiegt der nichtsättigbare Prozess der passiven Diffusion und trägt wesentlich zum Stoffaustausch bei. Der aktive Transportprozess ist bei Riboflavin-Mangel erhöht und im Gegensatz dazu, bei hohem Riboflavin-Gehalt des Gewebes, verringert. Der Transportweg beinhaltet Calcium und Calmodulin, nicht aber Natrium.

Es wurden spezifische Riboflavin-Rezeptoren identifiziert, die eine Rolle für Mikrotubuli im Transport spielen. [CABALLERO et al., 2005]

Der Riboflavin-Transportprozess in polarisierten Darmepithelzellen umfasst die Bewegung des Vitamin-Moleküls, die Bürstensaummembran (BBM)- und die basolaterale Membran-Domäne. Diese Prozesse wurden unter Verwendung von gereinigten BBM-Vesikeln und BLM-Vesikeln aus dem Darm von Organspendern und Tiermodellen dargestellt und zeigen spezifische Carrier-vermittelte Mechanismen, die jede der genannten Membran-Domänen erfasst. Weiterhin wurde der intestinale Riboflavin-Aufnahmeprozess sensitiv für die inhibitorische Wirkung der Membran-impermeablen . SH-Gruppen Modifikatoren beschrieben. [SUBRAMANIAN et al., 2011]

Es wurde festgestellt, dass der Transport von Riboflavin entlang der Bürstensaum- und basolateralen Membran-Vesikel im Dünndarm von Kaninchen Natrium-abhängig und elektroneutral verläuft. Unter Verwendung von humanen intestinalen Caco-2 Epithelzellen wurde die Beteiligung der Carrier-vermittelten Prozesse in der Anfangsphase der Riboflavin-Aufnahme bestätigt. Die Riboflavin-Aufnahme war Na^+ -unabhängig, und es sind in der Anfangsphase keine metabolischen Veränderungen des transportierten Riboflavins aufgetreten. Die Inhibitoren des Anionentransportes erzeugen keine Hemmung in der Riboflavin-Aufnahme durch Caco-2-Zellen, somit zeigt Riboflavin keine Interaktion mit dem Anion in Bezug auf seinen intestinalen Transport an. Einiges des absorbierten Riboflavins wird zu FMN im Cytosol der Enterozyten, durch Flavinkinase (ATP:Riboflavin 5'-Phosphotransferase, EC 2.7.1.26) phosphoryliert, und das meiste an FMN wird ferner in FAD durch die FAD-Synthase umgewandelt (ATP:FMN Adenylyltransferase, EC 2.7.7.2). Beide Schritte erfordern metabolisches ATP, was heißt, dass sie von Energie abhängig sind. [BALL, 2006].

Es wird vermutet, dass ein PKA-vermittelter Signalweg an der Regulation des intestinalen Riboflavin-Aufnahmeprozesses beteiligt ist. [SAID, 2004]

7.3 Charakterisierung und molekulare Identität der Riboflavin-Transportsysteme

Die molekulare Identität der Riboflavin-Transportsysteme bei Säugetieren wurde nach Klonierung der drei Riboflavin-Transporter aus menschlichen Geweben beschrieben: hRFT-1, -2 und -3. Alle drei hRFT's sind im menschlichen Darm exprimiert, wobei die Expression der hRFT2 deutlich höher ist, als die der anderen Transporter. Diese reichliche Expression des hRFT2 im Darm, zusammen mit der Ähnlichkeit der Riboflavin-Transportkinetik, vermittelt durch hRFT2 und dem Riboflavin-Aufnahmeprozess durch Darmepithelzellen, hat eine erhebliche physiologische Bedeutung für diesen Transporter in der intestinalen Absorption von Riboflavin. Der hRFT2 ist ein Protein bestehend aus 469 Aminosäuren, von dem angenommen wird, dass es bis zu elf Transmembrandomänen (TMD's) und einen extrazellulär orientierten COOH-Terminus aufweist. Da der Darm eine entscheidende Rolle in der Regulierung der gesamten Riboflavin-Homöostase im Körper hat, ist das Verständnis der Zellbiologie von hRFT2 in den absorptiven Zellen wichtig. Es wurde herausgefunden, dass das Protein hRFT2 ausschließlich an der apikalen Membran-Domäne von lebenden Caco-2-Zellen exprimiert wird. Durch Mutationsanalyse stellte sich auch die wichtige Rolle für den COOH-terminalen Schwanz (und seiner Cytelinreste) in der Zelloberflächenexpression von hRFT2 in intestinalen Epithelzellen heraus. Viele Nährstofftransporter enthalten Targeting-Motive/Signale, die innerhalb ihrer Sequenz eingebettet sind, einschließlich binnen des COOH-Termins des Polypeptids. Dadurch, und weil eine COOH-terminale GFP-Fusion der vollen Länge des hRFT2-Transporters (hRFT2-GFP) die Zelloberflächenexpression und Funktion des Transporters inhibiert, wurde der Fokus auf diesen Bereich bei der Suche nach einem solchen Signal gelegt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine vollständige Deletion der COOH-terminalen Sequenz des hRFT2 (GFP-hRFT2) oder eine weitere Deletion im Rückgrat (GFP-hRFT2) zu einer Retention des Proteins im Endoplasmatischen Reticulum führt.

Diese Befunde legen nahe, dass der COOH-terminale Schwanz des hRFT2 eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Zelloberflächenexpression des Proteins spielt. Auf der Grundlage des COOH-terminalen Aminosäuresequenz-Abgleichs für verschiedene Isoformen entlang der humanen und der Nagetier . RFT - Sequenzen, konnten vier der 19 Reste in der Region konserviert werden. Zwei dieser vier konservierten Reste stellten sich als Cysteine ($C_{463}XXXC_{467}$) heraus. In der Studie wurde der Fokus auf diese Cysteinreste gelegt, da frühere Untersuchungen gezeigt haben, dass Membran-impermeable Modifikatoren der SH-Gruppen zu einer deutlichen Hemmung in der Riboflavin-Aufnahme durch intestinale Epithelzellen geführt hat. Weiters wurden auch Cysteinreste anderer Membrantransporter untersucht, die für die Funktion und Targeting dieser Proteine an der Plasmamembran wichtig sind. Nach der Mutation von C_{463} und C_{467} kam es zu einer intrazellulären Retention des hRFT2 Proteins und folgend zu einer Verminderung der Riboflavin-Aufnahme. Dies macht deutlich, welche wichtige Rolle C_{463} und C_{467} in der Membranexpression von hRFT2 spielen. Um festzustellen, ob diese Cysteinreste mit anderen Cysteinen im hRFTs Polypeptid, Disulfidbrücken ausbilden, wurde das Protein einer Modellierungsanalyse unterzogen. Diese Modellierung sagt eine potentielle Disulfidbrücke zwischen C_{463} und C_{386} vorher. Diese Prognose wurde dadurch gestützt, dass die Mutation von C_{386} des hRFT2 Polypeptids zum Zurückhalten des Proteins im Endoplasmatischen Reticulum führt und die Riboflavin-Aufnahme beeinträchtigt wird. Zusammenfassend zeigen diese Daten zum ersten Mal eine apikale Lokalisation des hRFT2 in polarisierten Darmepithelzellen, und dass die Rolle für Cysteinreste in der Regulation der Zelloberflächenexpression, sowie dass die Zufuhr an die Zelloberfläche von intakten Mikrotubuli abhängt. [SUBRAMANIAN et al., 2011]

In einer Studie wurde die Gewebsverteilung, zelluläre Lokalisierung und die funktionale Charakterisierung von hRFT1 untersucht, und es wurde festgestellt, dass hRFT1 eine wichtige Rolle bei der zellulären Aufnahme

von Riboflavin spielt. Eine inaktive Spleißvariante von hRFT1 . hRFT1sv . wurde ebenfalls geklont. Der hRFT1sv der cDNA enthält eine 118-bp Insertion zwischen Exon 2 und Exon 3 von hRFT1. Die Transfektion von hRFT1sv in HEK-293-Zellen, die nativ hRFT1 exprimieren, haben keinen Einfluss auf die Riboflavin-Aufnahme. Zusätzlich wurde das EGFT-markierte hRFT1sv im Zytoplasma nur in wenigen Zellen beobachtet und durch die Western-Blot-Analyse nicht nachgewiesen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass hRFT1sv weder ein Membranprotein, ein aktiver Transporter, noch ein dominant-negativer Transporter ist. [YONEZAWA et al., 2008]

7.4 Resorption von bakteriell synthetisierten Vitamin B₂ im Dickdarm

Die normale Mikroflora des Dickdarms synthetisiert erhebliche Mengen an Vitamin B₂, ein wesentlicher Teil davon existiert als freies Riboflavin. Die synthetisierten Mengen an Vitamin B₂ hängen von der Ernährung ab, das heißt, sie lagen deutlich höher beim Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln verglichen mit einer fleischbasierten Kost. In einer Studie mit menschlichen Probanden wurde gezeigt, dass Riboflavin direkt in das Lumen inmitten des diagonalen Kolon absorbiert wird, was anhand des Anstiegs der Plasma-Konzentration von Riboflavin beurteilt wurde. Eine kolonare Absorption von FMN-Natrium wurde auch in der Ratte nachgewiesen. [BALL, 2006]

Ein experimentelles Modellsystem für Kolonozyten in vitro mit von Menschen stammenden Kolon-Epithelzellen NCM460 hat festgestellt, dass an der Riboflavin-Aufnahme im Dickdarm ein spezialisierter Carrier-vermittelter Mechanismus beteiligt ist. Dieses System erwies sich ähnlich dem, welches für den Dünndarm beschrieben wurde; es ist temperatur- und energieabhängig, Na⁺-unabhängig und wird durch strukturelle

Analoga von Riboflavin sowie durch den Inhibitor Amilorid, welcher durch die Membran transportiert wird, gehemmt. Es wurde auch herausgefunden, dass der Riboflavin-Aufnahmeprozess im Kolon adaptiv durch extrazelluläre Riboflavin-Ebenen reguliert und durch einen intrazellulären Ca^2/CaM -vermittelten Signalweg moduliert wird. [SAID, 2004]

Eine adaptive Up- und Down-Regulation der Riboflavin-Aufnahme erfolgte, als die NCM460 Zellen jeweils in einem Riboflavin-defizienten oder über-supplementierten Medium gezüchtet wurden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen im Dünndarm und legen nahe, dass der gleiche Mechanismus auch im Dickdarm tätig ist, um das bakteriell synthetisierte Riboflavin zu absorbieren. [BALL, 2006]

7.5 Einflussfaktoren auf die Absorption von Riboflavin und Riboflavin-Mangel

Ein Riboflavin-Mangel führt zu schweren klinischen Auffälligkeiten, zu denen auch degenerative Veränderungen im Nervensystem, Anämie, Wachstumsstörungen, Hautveränderungen und eine erhöhte Anfälligkeit für Karzinogene gehören. Ein Mangel an Riboflavin tritt bei chronischen Alkoholikern, bei Patienten mit Diabetes mellitus und/oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf und denjenigen, die eine Chemotherapie erhalten, sowie bei älteren Patienten. Im Gegensatz zu den negativen Auswirkungen des Riboflavin-Mangels scheint eine Riboflavin-Supplementierung/Optimierung Potential zum Schutz lebenswichtiger Gewebe aus Ischämie-induzierter oxidativer Schädigung zu haben und ist wirksam in der Behandlung von Patienten mit Riboflavin-abhängigen multiplen Acyl-CoA-Dehydrierungs-Defekt, Brown-Vialetto-Van Laere- und Fazio-Londe-Syndrom (BVVL- und FL-Syndrom). Mutationen im humanen klinischen Riboflavin-Transporter-2 manifestieren sich als neurologische Störungen (BVVL- und FL-Syndrom), und das

hRFT2 Gen wird auch mit dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus sowie dem gastrokardialen Adenokarzinom in Verbindung gebracht. Genetische Analysen von Patienten mit BVVL- und FL-Syndrom klärten ein Spektrum von Mutationen im hRFT2 (c20orf54)-Gen auf. In Anbetracht der Erkenntnisse wird die Bedeutsamkeit für die COOH-terminale Sequenz in der hRFT2-Funktionalität offensichtlich. In der klinischen Literatur erkennt man, dass die Patienten vorzeitige Verkürzungen (z.B. E71X, Y213X) zeigten oder an einer COOH-terminalen Fehlstimulation (F457L) im Kindesalter starben, während Patienten, die Punktmutationen in einer anderen Stelle des hRFT2 Proteins aufweisen, bessere Prognosen nach der Diagnose von BVVL- und FL-Syndrom erhielten. Diese Ergebnisse unterstützen im Großen und Ganzen die Struktur/Funktion der Analysen von hRFT2, obwohl eine genaue Definition der zellbiologischen Konsequenzen dieser spezifischen Mutation noch nicht getroffen werden kann. [SUBRAMANIAN et al., 2011]

In der Studie von YONEZAWA et al., die unter Punkt 6.3 Charakterisierung und molekulare Identität der Riboflavin-Transportsysteme beschrieben wurde, wurde die Riboflavin-Aufnahme durch die Caco-2-Zellen teilweise durch hRFT1/hRFT1sv siRNA gehemmt. Die Bindungskonstante (K_d) für die Bürstensaummembran im Rattendarm wurde mit 0,07 μM und 12 μM berechnet, was darauf hindeutet, dass mehr als zwei Bindungsstellen in der Bürstensaummembran existieren. Darüber hinaus war die Aufnahme von Riboflavin durch HEK-293 Zellen, deren Riboflavin-Absorption teilweise durch hRFT1 vermittelt wurde, unabhängig von Na^+ , Membranpotential oder dem pH-Wert, durch Riboflavin-Analoga vollständig gehemmt. [YONEZAWA et al., 2008]

Es kann gesagt werden, dass die Nahrungsfaserquellen zu einer verbesserten Absorption von Riboflavin führt, wahrscheinlich durch eine Verlangsamung der Passage von Speisebrei im Darm. Dadurch wird die Dauer der Exposition, die für die Absorption verantwortlich ist, erhöht.

Chronischer Alkoholismus ist mit einer hohen Prävalenz von Vitamin B₂-Mangel assoziiert. In Ratten verringert Ethanol deutlich die Bioverfügbarkeit von FAD und in geringem Maße auch von Riboflavin. Ethanol beeinträchtigt die intraluminale Hydrolyse von FAD, und es werden auch deutlich die Aktivitäten der FMN-Phosphatase und FAD-Pyrophosphatase in vitro gehemmt. Diese Befunde legen nahe, dass Ethanol die Enzyme hemmt, die notwendig sind um Riboflavin von FMN und FAD zu lösen, und Ethanol vermindert dadurch die Menge der zur Absorption zur Verfügung stehenden Menge. [BALL, 2006]

8. Vitamin C

8.1 Allgemeine Aspekte

Vitamin C findet sich in der Nahrung in zwei Formen: der reduzierten Form Ascorbinsäure und der oxidierten Form, Dehydroascorbinsäure (DHAA). [SAID, 2004]

Der Gattungsname Vitamin C steht für L-Threo-hex-2-enono-1,4-lacton und deren Derivate, die qualitativ die biologische Wirkung von L-(+)-Ascorbinsäure aufweisen. Die Stereoisomere wie L-Isoascorbinsäure, D-Isoascorbinsäure (Erythrobinsäure) und D-Ascorbinsäure weisen jedoch keine biologische Aktivität auf und können als biologisch inaktiv bezeichnet werden. [PIETRZIK et al., 2008]

Die L-Ascorbinsäure verfügt über ein großes Redoxpotential und ist leicht autoxidabel in wässriger Lösung in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffpartialdruck und bei dem Vorkommen von Schwermetallspuren. In alkalischen Lösungen wird das Vitamin rasch oxidiert beziehungsweise zersetzt, während es in wässrigen sauren Lösungen (pH < 6) stabil bleibt. Als sogenannte Schutzstoffe für Vitamin C dienen Säuren, wie Zitronensäure, Peptide, Flavonoide, Mono- und

Polysaccharide, da sie die Zersetzung von Ascorbinsäure beträchtlich herabsetzen. Im Gegensatz dazu, beschleunigen Spuren von Schwermetallen, vor allem Kupfer- und Eisenionen den katalytisch zerstörenden Oxidationsprozess. Die L-Ascorbinsäure wird beim Oxidationsprozess reversibel, unter Abgabe eines Elektrons und über das Zwischenprodukt Semidehydroascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure umgewandelt. Durch die Öffnung des Lactonringes, kann Dehydroascorbinsäure irreversibel durch Hydratation zum vitaminunwirksamen Ausscheidungsmetaboliten - Diketogulonsäure - überführt werden, beziehungsweise durch Reduktion mittels Glutathion reversibel zu Ascorbinsäure recycelt werden. [DGNP, 2012]

Dehydroascorbinsäure unterscheidet sich strukturell von der Ascorbinsäure und ähnelt der Glucose. Seine Toxizität ist ähnlich der von Alloxan, das lange für endokrine Forschungen bei Studien an Labortieren angewendet wurde um Diabetes zu induzieren. [SAID, 2004]

Obwohl die meisten Säugetiere Vitamin C über den Signalweg der Glucuronsäure in der Leber synthetisieren, muss der Mensch, sowie auch das Meerschweinchen aufgrund eines Mangels des Enzyms L-gulonolacton-Oxidase, den wasserlöslichen Mikronährstoff aus Nahrungsquellen aufnehmen. Die aktive Form des Vitamins, die Ascorbinsäure, ist ein wirksames Antioxidans, welches als freier Radikalfänger fungiert und ein essentieller Cofaktor in zahlreichen enzymatischen Reaktionen, wie bei der Überleitung von Metallionen in ihre reduzierten Formen, in der Biosynthese von Proteinen der extrazellulären Matrix und Neurotransmittern sowie in der Regulierung der Eisenaufnahme beteiligt ist. [REIDLING und RUBIN, 2011; SAID, 2004]

Ein diätetischer Mangel an Vitamin C führt zu Skorbut. Weitere klinische Auffälligkeiten, die bei unzureichender Zufuhr auftreten sind verzögerte Wundheilung, Störungen im Knochenstoffwechsel und des Bindegewebes und vasomotorische Instabilität. Darüber hinaus haben Berichte angedeutet, dass die Optimierung der Vitamin C Homöostase des Körpers eine schützende Wirkung gegen Erkrankungen der Gallenblase,

nichtalkoholische Lebererkrankungen, Herz-Kreislaufferkrankungen, Krebs und Katarakt aufweist. [REIDLING und RUBIN, 2011]

8.2 Absorption von Ascorbinsäure

Die in der Nahrung vorliegende L-Ascorbinsäure wird nach oraler Aufnahme geringfügig durch die Mundschleimhaut durch einen Carrier-vermittelten, nicht-aktiven Prozess, absorbiert. Duodenum und proximales Jejunum stellen jedoch die Hauptorte für die Absorption dar. Der Mechanismus der jejunalen beziehungsweise duodenalen Absorption von Vitamin C ist abhängig von der Dosis und artspezifisch. Mittels einfacher Diffusion erfolgt die intestinale Aufnahme von L-Ascorbinsäure bei Hamstern und Ratten. Bei Menschen und Meerschweinchen wird L-Ascorbinsäure in niedrigen Dosen stereoselektiv durch ein aktives Natrium-Kalium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase)-getriebenes Transportsystem absorbiert. Nach einer Sättigungskinetik wird L-Ascorbinsäure in die Mukosazellen des oberen Dünndarms durch zwei Transportproteine . SVCT1 und SVCT2 . überführt. Hohe Konzentrationen von Vitamin C reduzieren die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und dadurch werden hohe Dosen an L-Ascorbinsäure passiv mittels Diffusion absorbiert. Die Dehydroascorbinsäure passiert im Gegensatz zur L-Ascorbinsäure die Enterozytenmembran ausschließlich durch erleichterte Diffusion. [DGNP, 2012]

8.2.1 Dehydroascorbinsäure und Einflussfaktoren auf die Vitamin C-Absorption

Studien über die zelluläre Aufnahme von Dehydroascorbinsäure haben gezeigt, dass die Enterozyten diese Verbindung durch die Bürstensaummembran anhand eines Na⁺-unabhängigen Prozesses aufnehmen. Es wurde berichtet, dass eine erhebliche Aufnahme von DHAA aus der serösen Oberfläche des intestinalen Gewebes auftritt, zum Beispiel entlang der basolateralen Membran. Die serosale Aufnahme von DHAA könnte im Austausch mit der reduzierten Form von Vitamin C, sowie es die Zelle verläßt, auftreten. Es wurde gezeigt, dass an dem System, das in die DHAA-Aufnahme der basolateralen Membran involviert ist, die Glukosetransporter 1, 3 und 4 beteiligt sind. [SAID, 2004]

Bei schlecht eingestelltem Diabetes mellitus, wird die Aufnahme von DHAA ins Gewebe aufgrund der Konkurrenz durch Glucose beeinträchtigt, und es kann ein funktionaler Mangel an Vitamin C trotz adäquater Zufuhr auftreten. [CABALLERO et al., 2005]

Anhand von Studien wurde gezeigt, dass Flavonoide (wie Quercetin) reversible und nicht kompetitive Inhibitoren des Ascorbinsäure-Transportes durch das SVCT1-System sind, obwohl sie nicht von diesem System transportiert werden. Hinsichtlich der Absorption von DHAA, nehmen die Enterozyten diese Form von Vitamin C auf und sie wird durch die Wirkung der DHAA-Reduktase zu ihrer reduzierten Form metabolisiert. Durch diesen Mechanismus wird der intrazelluläre DHAA-Level auf einem niedrigen, atoxischen Niveau gehalten. [SAID, 2004]

8.3 Charakterisierung der Vitamin C - Transporter SVCT1 und SVCT2

Das Verständnis der molekularen Mechanismen des Ascorbinsäure-Transportes in Säugerzellen, einschließlich derjenigen des Dünndarms, wird nach dem Klonen von zwei verschiedenen Isoformen der Na⁺-abhängigen Ascorbinsäure-Transporter aus menschlichem Geweben und dem der Ratte, erhöht. [SAID, 2004]

Es ist ein Transportsystem notwendig, um Ascorbinsäure zu den unterschiedlichen Gewebszellen zu liefern. [LUO et al., 2008]

Die Untersuchungen in hepatischen Epithelzellen sowie in anderen Zell- und Gewebsmodellen zeigten, dass der Ascorbinsäure-Transport Na⁺- und temperaturabhängig ist und über einen spezialisierten Mechanismus erfolgt. Die zwei Natrium-abhängigen humanen Vitamin C-Transporter-1 und -2 (hSVCT1 und hSVCT2), die Produkte der SLC23A1 und SLC23A2 Gene, sind zwei Isoformen, die Ascorbinsäure transportieren und einen hohen Grad an Homologie untereinander aufweisen. Jedes der Protein-Isoformen ist am Na⁺-abhängigen Transport von Ascorbinsäure in einer Vielzahl von Expressionssystemen beteiligt. [REIDLING und RUBIN, 2011]

Beide SVCT-Carrier haben ähnliche Funktionen und können den L-Ascorbinsäure-Transport vermitteln. SVCT1 wird hauptsächlich in Epithelzellen der Niere, Darm und Leber exprimiert, wohingegen SVCT2 allgemein in Gehirn, Auge und anderen Organen verteilt ist. [LUO et al., 2008]

Es wurde eine funktionelle Charakterisierung der beiden Isoformen durch Expression in *Xenopus* Oozyten, COS-7 Zellen und anderen zellulären Systemen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl SVCT1 als auch SVCT2 Ascorbinsäure transportieren (nicht aber die Dehydroascorbinsäure) und dass beide Transporter eine höhere Selektivität für L-Ascorbinsäure verglichen mit D-Isoascorbinsäure, aufweisen. Es wurde berichtet, dass SVCT2 eine höhere Affinität für Ascorbinsäure im Vergleich zu SVCT1 zeigt. Beide Transporter

transportieren L-Ascorbinsäure über einen elektrogenen Na^+ -abhängigen Prozess mit einem stöchiometrischen Verhältnis Na^+ zu Ascorbinsäure von 2:1. Zusätzlich haben sowohl SVCT1 als auch SVCT2 mehrere potentielle N-Glycosylierungs- und Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C. Ein Merkmal der beiden Ascorbat-Transporter ist ihre Fähigkeit, auch als Na^+ -Uniporter in Abwesenheit von Ascorbat zu wirken, wodurch es zu einem Na^+ -Verlust entlang der Zellmembran kommt. [SAID, 2004]

8.4 Substratspezifität von SVCT

Die Substratspezifität von SVCT wurde in mehreren Arbeiten sondiert. Die Ascorbat-Aufnahme durch Osteoblasten wurde untersucht und man gelangte zu der Feststellung, dass die Aufnahme von Ascorbat reversibel gehemmt wurde durch Antagonisten von Anionen-Transportern wie 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonsäure (DIDS), 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonsäure (SITS), Sulfinpyrazon und Furosemid, nicht aber durch organische Anionen wie Formiat, Lactat, Gluconat, Succinat, außer Salicylsäure. Es wurde herausgefunden, dass Ascorbat-Transporter relativ spezifisch für Ascorbat sind und dass anionische Inhibitoren direkt mit den Ascorbat-Transportern interagieren. Bei pH 7,4 liegt Ascorbinsäure in der deprotonierten Form als Anion vor. Daher ist es nicht überraschend, dass die Ascorbinsäure-Aufnahme durch anionische Inhibitoren gehemmt wird. Zum besseren Verständnis der Substratspezifität von SVCT, untersuchten Rumsey et al. die Hemmung der Ascorbinsäure-Analoga anhand der menschlichen Fibroblastenzellen der Haut und haben gezeigt, dass eine Reihe von 6-Halo-deoxy-L-Ascorbinsäure die wirksamsten Verbindungen waren, die die Ascorbinsäure-Aufnahme hemmen. Eine signifikante Absenkung der Ascorbinsäure-Aufnahme wurde durch 6-Halo-deoxy-Ascorbinsäure und Diclofenacsäure in verschiedenen Zellen vorgeschlagen, da die

Substratspezifität von SVCT relativ ist und Halogen substituiertes Benzol sich auf die Ascorbinsäure-Aufnahme auswirkt. [LUO et al., 2008]

Die Topologie der beiden Transporter umfasst 12 Transmembran-Regionen, zytoplasmatische COOH- und NH₂-terminale Domänen sowie eine ähnliche Funktionalität. Obwohl beide Transporter eine hohe Affinität für Ascorbinsäure anzeigen, weist hSVCT1 eine höhere V_{max} auf, was darauf hindeutet, dass hSVCT2 ein Transporter mit niedriger Kapazität aber hoher Affinität ist und im Gegensatz dazu, hSVCT1 als Carrier mit hoher Kapazität und niedriger Affinität fungiert. [REIDLING und RUBIN, 2011]

8.5 Molekularer Mechanismus des SVCT1 und SVCT2

Es wurde der molekulare Mechanismus untersucht, anhand der Hypothese, dass die Na⁺-Abhängigkeit und die Rheogenität (Transport in den renalen proximalen Tubulus) von SVCT1 aus dem gekoppelten Transport von zwei Na⁺ und einer L-Ascorbinsäure pro Transportakt herrührt und dass der Transport von L-Ascorbinsäure durch einen elektrochemischen Gradienten für Na⁺ getrieben wird. Der Ansatz bestand darin, Radiotracers (L-[¹⁴C]Ascorbinsäure, ²²Na)-Flüsse und Ströme die in *Xenopus*-Oozyten exprimiert sind, zu messen und den kinetischen Mechanismus SVCT1 mit Hilfe von Computersimulation zu modellieren. Es wurden die funktionellen Eigenschaften und kinetische Mechanismen des menschlichen L-Ascorbinsäure-Transporters SVCT1, der heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert ist, charakterisiert. Der Transport der L-Ascorbinsäure war gesättigt, temperaturabhängig und energetisiert durch den potentiellen elektrochemischen Na⁺-Gradienten. Das Ergebnis war ein Na⁺-L-Ascorbinsäure⁽¹⁻⁾ Kopplungsverhältnis von einer simultanen Messung der einzelnen Ströme und Flüsse im einzelnen Oozyten bei einem pH-Wert von 7,5.

Es ist unwahrscheinlich, dass sich innerhalb der Umgebung des sauren Mikroklimas des intestinalen Bürstensaumes (pH \approx 6) oder des renalen proximalen Tubulus (luminaler pH \approx 7) die Flussverhältnisse unterscheiden, da das Ascorbat unter diesen Bedingungen mit 1 μ M berechnet wird, jedoch wird ein bescheidener Tropfen in der L-Ascorbinsäure-Transportaktivität für SVCT1 bei niedrigem pH beobachtet. Der Hill-Koeffizient (n_H) für die Na⁺-Aktivierung von L-Ascorbinsäure-hervorgehobene Strömen, betrug \approx 2, was auf eine hohe Kooperativität zwischen den beiden Na⁺-Bindungsereignissen hinweist. L-Ascorbinsäure und die Na⁺-Sättigungskinetik als eine Funktion der Substratkonzentration, ergab einen gleichzeitigen Transport-Mechanismus in dem die Bindung wie folgt angeordnet ist: Na⁺, L-Ascorbinsäure, Na⁺. Die gleiche bindende Sequenz wurde für eine zweite SVCT Isoform im Menschen, SVCT2, vorgeschlagen. Aufgrund einer anderen Studie, kann geschlossen werden, dass für einen gleichzeitigen Transport-Mechanismus und V_{max} , Daten an anderer Stelle die Bindesequenz unterstützt: Na⁺, Na⁺, L-Ascorbinsäure für SVCT2. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass SVCT1 ein spannungsabhängiger und rheogener, zwei Na⁺-abhängiger L-Ascorbinsäure⁽¹⁻⁾ Cotransporter (Symporter) ist, mit einer hohen Affinität für L-Ascorbinsäure ($K_{0,5} \approx 70 \mu\text{M}$). SVCT1 zeigte eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit ($Q_{10} \approx 5$). Die Daten zeigten ein geordnetes simultanes Transportmodell mit der Bindungssequenz Na⁺, L-Ascorbinsäure, Na⁺. [MACKENZIE et al., 2008]

8.6 Transkriptionale Regulierung der Ascorbinsäure-Absorption

Die intestinale Ascorbinsäure-Aufnahme wird durch extrazelluläre Substratebenen und einem intrazellulären PKC-vermittelten Signalweg reguliert. Es wurde festgestellt, dass die Supplementierung mit Ascorbinsäure bei Meerschweinchen zu einer Down-Regulation der

intestinalen Ascorbat-Absorption führen kann. Zudem wurde bewiesen, dass sowohl SVCT1 als auch SVCT 2 durch einen intrazellulären PKC-vermittelten Signalweg reguliert werden. Diese Regulierung umfasst mehrere Mechanismen: Während PKC SVCT1 durch seine Verteilung in der Zellmembran zu beeinflussen scheint, wirkt die Proteinkinase C auf SVCT2 über die Verringerung der katalytischen Transporteffizienz des Carriers an der Zellmembran selbst. [SAID, 2004] Anhand von Untersuchungen anderer intrazellulärer Regulationsmechanismen der Ascorbinsäure-Aufnahme konnte festgestellt werden, dass die Regulierung auch potentiell bei PKA, PTK und Ca^{2+} /Calmodulin auftritt, nicht aber durch Salpetersäure-oxi-abhängigen Signalwegen. [REIDLING et al., 2008]

In einem Versuch, die Regulation der Expression der humanen Ascorbinsäure-Transporter hSVCT1 und hSVCT2 in der Leber zu verstehen, wurden ihre 5'-regulatorischen Regionen charakterisiert, indem die minimalen Promotor-Sequenzen für die basale Aktivität in kultivierten humanen Leber-Epithelzellen (HepG2) identifiziert wurden. Es wurde auch festgestellt, dass putative cis-Elemente bei der Regulierung der Promotoraktivität eine Rolle spielen. Zusätzlich wurde eine funktionelle Studie durchgeführt, die die adaptive Regulierung der Expression und Aktivität des Ascorbinsäure-Transportsystems in Reaktion auf das veränderte Substratniveau demonstriert. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass transkriptionale Mechanismen, die den hSVCT1 Promotor in den beobachteten regulatorischen Ereignissen involvieren, beteiligt sind. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die Aktivität des hSVCT1 und 2-Promotor-Luciferase-Konstruktes während eines Ascorbinsäure-Mangels und einer Supplementation, getestet. Ein Ascorbinsäure-Mangel wurde mit einer Erhöhung der Aktivität der hSVCT1 Promotors assoziiert, während sich die hSVCT2 Promotoraktivität nicht signifikant verändert hat. Basierend auf dem Erkenntnis, dass transkriptionale Mechanismen an der Ascorbinsäure-defizienten Reaktion beteiligt sind, wurde eine potentielle cis-regulatorische Stelle in der

reagierenden Ascorbinsäure-Region des hSVCT Promotors zugeordnet und bestimmt. Es wurde herausgefunden, dass eine Ascorbinsäure ansprechende Region in der minimalen 204 bp Promotorregion lokalisiert ist und dass eine Mutation einer bestimmten HNF-1-Stelle eine Abschwächung der Ascorbinsäure defizienten Reaktion verursacht. Allerdings hatte die Mutation einer anderen HNF-1-Stelle einen stärker limitierenden Effekt. Die Ergebnisse identifizierten die minimalen Regionen für die Basalaktivität, die für die hSVCT1 und hSVCT2 Promotoren erforderlich sind. Bezüglich der Bedeutung der gewebsspezifischen Regulation der Genexpression, wurden verschiedene hSVCT-Promotor-Aktivitäten mit den Aktivitäten der hSVCT-Promotoren mit kultivierten humanen glatten Muskelzellen (hVSMC), verglichen. Zunächst wird das hSVCT1-Gen in den HepG2 Zellen exprimiert, während sein Transkript in den nicht nachweisbaren hVSMC wahrscheinlich die Abwesenheit der Genexpression repräsentiert.

Auch in Bezug auf die hSVCT2 minimalen Promotoren (P1 und P2), über deren Aktivitäten in den HepG2 Zellen berichtet wurde, unterscheiden sich diese erheblich von den bisher veröffentlichten Erkenntnissen in hVSMC. In dieser Studie wurde eine signifikante relative Aktivität für den P1-Promotor in hVSMC demonstriert (etwa die Hälfte der Aktivität von P2), während die aktuellen Ergebnisse in HepG2-Zellen zeigen, dass der P1-Promotor weniger Aktivität besitzt (weniger als ein Zehntel der P2-Aktivität).

Darüber hinaus ist die minimale Promotorregion für die P2-Aktivität in HepG2-Zellen zwischen dem P2d6-7-Locus lokalisiert, während in hVSMC die wichtigere Sequenz im P2d7-8-Locus liegt. Diese Resultate verschieben den Fokus für die Begutachtung der cis-regulatorischen Elemente des hSVCT2-Gens in den beiden Zelllinien und unterstützen die Idee, dass die Prüfung der Promotoraktivität in verschiedenen Zelltypen ein besseres Bild der gewebsspezifischen Regulation der Genexpression liefern. [REIDLING und RUBIN, 2011]

9. Folsäure

9.1 Allgemeine Faktoren

Der Begriff „Folsäure“ umfasst die gesamte Gruppe von Folsäure-Formen, bestehend aus dem natürlichen vorkommenden Polyglutamat in Lebensmitteln und Folsäure (Pteroylglutaminsäure), der synthetischen Form des Vitamins, das als Nahrungsergänzungsmittel Anwendung findet. Folsäure ist damit eine allgemeine Bezeichnung für jede Form des Vitamins, unabhängig vom Zustand der Reduktion, der Art der Substitution oder dem Grad der Polyglutamation. [CABALLERO, 2005 zit. n. McPARTLIN, 2005]

„Folsäure besitzt eine heterozyklische Struktur, bestehend aus einem stickstoffhaltigen Pteridinring, der über seine Methylgruppen am C₆-Atom mit der Aminogruppe des para-Aminobenzoerings verbunden ist. Pterinsäure. Am Carboxylende der p-Aminobenzoensäure ist über eine Peptidbindung ein Glutaminsäuremolekül gebunden. Die chemische Bezeichnung der Folsäure lautet daher Pteroylmonoglutaminsäure beziehungsweise Pteroylmonoglutamat (PteGlu).“ [DGNP, 2012]

Folsäure ist die synthetisierte Form des Vitamins, dessen Stoffwechselaktivität eine Reduktion zu Tetrahydrofolsäure (THF)-Derivaten erfordert, unter Hinzufügung einer Kette von Glutamat-Resten in der -Peptidbindung sowie der Aufnahme von C₁-Einheiten. C₁-Einheiten werden auf verschiedenen Levels der Oxidation metabolisch erzeugt und sind reaktive Reste, die an die N₅ und/oder N₁₀ Positionen im Folat-Molekül angehängt werden. Der Bereich der Oxidationsstufen für Folat-C₁-Einheiten erstreckt sich von Methanol zu Formiat, ebenso wie Methyl-, Methylen-, Methenyl-, Formyl- oder Formimino-Resten. Während C₁-Reste in die Folat Derivate integriert sind, können sie aus einem Oxidationszustand zum anderen durch den Gewinn oder Verlust von Elektronen umgewandelt werden. [CABALLERO, 2005 zit. n. McPARTLIN, 2005]

Folate spielen eine wichtige Rolle als C₁-Spender in einer Vielzahl von Biosynthesen spielen, einschließlich RNA-Synthese und DNA-Replikation, mitochondrialer Proteinsynthese, Aminosäure-Stoffwechsel und Methylgruppen-Biogenese. [GONEN und ASSARAF, 2010]

9.2 Absorption von Folaten

Säugetieren fehlt die enzymatische Kapazität zur Folat-Biosynthese und diese müssen daher Folate aus ihrer Ernährung beziehen. [GONEN und ASSARAF, 2010] Folat in Lebensmitteln besteht hauptsächlich aus reduzierten Polyglutamaten, die im Darm vor der Absorption für die intestinale Schleimhaut zu Monoglutamaten hydrolysiert werden. Das Konjugase-Enzym (gamma-Glutamyl-Carboxypeptidase), welches das diätetische Folat hydrolysiert, wurde auf der luminalen Bürstensaummembran der Enterozyten des menschlichen Jejunums lokalisiert und wandelt Polyglutamylfolat in Monoglutamylfolat um. Es weist die gleiche Affinität für Polyglutamate verschiedener Kettenlängen auf. [CABALLERO, 2005 zit. n. McPARTLIN, 2005]

Monoglutamylfolat wird in die intestinalen Mukosazellen aufgenommen durch einen aktiven Natrium- und Glucose-abhängigen Carriermechanismus nach einer Sättigungskinetik. Unabhängig von der Folatdosis werden 20-30 % der Monoglutamylfolate über einen passiven Transportmechanismus absorbiert. In den Enterozyten wird durch zwei Reduktionsschritte das absorbierte Monoglutamylfolat über 7,8-Dihydrofolat (DHF) zum metabolisch aktiven 5,6,7,8-THF umgewandelt, das teilweise in methylierter (5-MTHF) und formylierter (10-Formyl-THF) Form, hauptsächlich jedoch ohne C₁-Substituenten als freies THF, über die Pfortader zur Leber gelangt. [DGNP, 2012]

9.3 Charakterisierung der Folat-Transportsysteme

Da Folate hydrophile Moleküle sind, die bei physiologischen pH-Wert anionisch vorliegen, überqueren sie die biologischen Membranen nur schlecht durch passive Diffusion. Obwohl die Aufnahme von Folsäure-Cofaktoren in die Zellen und Gewebe durch Folsäure-Rezeptoren (FR), der Familie der organischen Anionen-Transporter (OAT) und einem Protonen-gekoppelten Folat-Transporter (PCFR) vermittelt wird, ist der am besten charakterisierte Folat-Transporter der ubiquitär reduzierte Folat-Carrier (RFC; SLC19A1). Diätetische Folate werden meist im Duodenum und dem oberen Jejunum vor allem durch PCFT, absorbiert. Allerdings impliziert die Expression von RFC im gesamten Darm, dass die intestinale Folat-Aufnahme hauptsächlich im unteren Darm stattfindet. [PATTERSON et al., 2008]

Demnach sind drei Transport-Systeme für die Folsäure-Aufnahme derzeit bekannt:

- a. Der reduzierte Folat-Carrier (RFC) RFC/SLC19A1: RFC zeigt eine hohe Affinität für reduzierte Folate, jedoch schlechte Affinität für Folsäure, ein oxidiertes Folat ($K_m = 200-400 \mu\text{M}$)
- b. Folat-Rezeptoren (FR): FR und FR sind Folsäure-bindende Proteine mit hoher Affinität ($K_d = 0,1-10 \text{ nM}$)
- c. Der Protonen-gekoppelte Folat-Transporter (PCFT) PCFT/SLC46A1 wurde ursprünglich als ein Häm Trägerprotein-1 (HCP1) mit niedriger Affinität beschrieben (Einstrom $K_m = 125 \mu\text{M}$)

Obwohl die Rolle, die PCFT möglicherweise im Häm-Transport spielt weniger dominant ist, ist bekannt, dass PCFT ein Folat-Transporter mit hoher Affinität und einer optimalen Transport-Aktivität bei saurem pH-Wert ist. [GONEN und ASSARAF, 2010]

Da diese Transporter Affinitäten für Folsäure im mikromolaren Bereich aufweisen, würden sie durch normale Konzentrationen an Folsäure nicht gesättigt werden. Aus diesem Grund sollte die Folsäure-Aufnahme ins

Gewebe auf etwaige Erhöhungen der Serum-Folat-Levels infolge einer Folsäure-Supplementierung ansprechen. Eine wichtige Determinante der Folat-Aufnahme in die Zellen ist ihre mitotische Aktivität, die angesichts der Abhängigkeit der DNA-Biosynthese von der Folat-Coenzym-Funktion zu erwarten ist. [CABALLERO, 2005 zit. n. McPARTLIN, 2005]

9.4 Struktur des humanen reduzierten Folat Carriers (hRFC)

Die Struktur des menschlichen RFC (hRFC)-Gens wurde erstmals im Jahr 1998 beschrieben. Es wurden fünf kodierte Exons mit konservierten Grenzflächen und eine hohe Homologie zwischen Mensch und Nager identifiziert. hRFC wird durch die gewebsspezifische Ausnutzung von fünf großen abwechselnd gespleißten nicht kodierten Regionen (A1/A2, A, B, C, D) und mehreren Promotoren, die über 35 kb gespannt sind, reguliert. Die Expression von hRFC wird durch kombinatorische Wirkungen mehrerer diverser Familien von Transkriptionsfaktoren (d.h. Sp, bZip, basischer Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper, Ikaros, AP2 und C/EBP) reguliert, gekoppelt mit den Wirkungen auf die posttranskriptionale Translationseffizienz, der Transkriptionsstabilität und der Synthese von modifizierten hRFC-Proteinen, die von AUGs initiiert werden. Bei der Maus wurden für RFC (mRFC), 4 einzigartige 5'-nichtkodierte Regionen identifiziert (mRFC-a, -b, -c und . d), sowie angrenzende Promotoren. Es scheint zumindest die teilweise Erhaltung der putativen cis-Elemente in den mRFC-Promotoren, verglichen mit denen in den hRFC-A1/A2, -B und . C minimalen Promotoren, identifiziert zu sein. Das mRFC-Gen wurde aus dem Chromosom 10 und das hRFC-Gen auf 21q22,3 durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), lokalisiert. Angesichts der Herausforderungen des Studiums dieser Bedingungen bei Menschen, wurde begründet, dass Mäuse, denen das mRFC Gen durch das hRFC Gen ersetzt wurde, erhebliche Vorteile für das Verständnis der wichtigen

Rolle, die RFC an der Folsäure Homöostase in Krankheit und Gesundheit spielt, aufzeigen. [PATTERSON et al., 2008]

9.5 Regulierung des humanen reduzierten Folat-Carriers (hRFC)

Angesichts der zentralen Rolle des hRFC bezugnehmend der in vivo Folsäure-Homöostase, ist es nicht verwunderlich, dass dieses Gen unter einer komplexen Kontrolle ist. Ein wesentliches Merkmal dieser Regulierung ist die Verwendung von mindestens fünf großen 5'-nicht-kodierten Regionen und den dazugehörigen Promotoren. Die Verwendung der hRFC Promotor/5'-nicht-kodierte Region ist hoch gewebsspezifisch und wird von beiden ubiquitären und gewebsspezifischen Transkriptionsfaktoren gesteuert. Darüber hinaus unterliegen die hRFC Protein-Levels zusätzlich posttranskriptionalen Kontrollen, einschließlich alternativem Spleißen, Translationseffizienz, Transkriptstabilität und der Synthese von N-terminal modifizierten hRFC's. Gemeinsam können diese Mechanismen das Gewebe und den Plasmaspiegel der Folsäure Cofaktoren wesentlich beeinflussen. Eine wichtige unerforschte Voraussetzung betrifft die Möglichkeit, Beiträge von Modifikatoren in der hRFC Genstruktur, Expression oder Funktion, mit Promotor, 5'-nicht-kodierenden Regionen oder veränderter Kodierungssequenz (einschließlich vorkommender Polymorphismen) zu einer normalen Homöostase und Folat-Pathophysiologien mit Folat-Mangel zuzuordnen. [PATTERSON et al., 2008]

9.6 Der Protonen-gekoppelte Folat-Transporter (PCFT) PCFT/SLC46A1

Es wurde die Grundlage für den niedrigen-pH Transportweg mit der Klonierung des Protonen-gekoppelten Folat-Transporter (PCFT, SLC46A1) identifiziert, der alle Eigenschaften der niedrigen-pH-Folat-Transportaktivität in Säugerzellen wiedergibt. Aus physiologischer Perspektive spielt PCFT eine kritische Rolle bei dem Transport von Folaten durch die apikale Bürstensaummembran im proximalen Jejunum, wo ein saures Mikroklima vorliegt und am Transport von Folaten in das zentrale Nervensystem. Dies wurde mit der Demonstration etabliert, dass es Mutationen mit einem Funktionsverlust in diesem Protein während der autosomal rezessiven Erkrankung, hereditäre Folat-Malabsorption gibt, in der beide Prozesse deutlich beeinträchtigt sind. Daher ist PCFT für die Folat-Homöostase und die Folsäure-Suffizienz des Menschen erforderlich. Aus epidemiologischer Perspektive und aus Studien mit Mausmodellen ist Folsäuremangel ein Risikofaktor für die Entwicklung von Darmkrebs sowie möglicherweise anderen Krebsarten. Umgekehrt gibt es Hinweise, dass ein Folat-Überschuss das Tumorwachstum und das Fortschreiten erhöht, sobald sich eine Malignität eingestellt hat. Hingegen wird ein deutlicher Anstieg der PCFT, RFC und Folat-Rezeptor-mRNA-Expression im Dünndarm bei Mäusen beobachtet, im Vergleich einer Folat-defizienten mit einer Folat-angereicherten Diät. Es wird ein möglicher Mechanismus vorgeschlagen, durch den die Folat-Bioverfügbarkeit die Expression von PCFT verändern könnte: durch seine Effekte auf die DNA-Methylierung. [DIOP-BOVE et al., 2009]

9.7 Funktionen des Protonen-gekoppelten Folat-Transporters und die erbliche Folsäure-Malabsorption

Die Funktionen des PCFT als Folat-Protonen-Co-Transporter spiegeln sich im sauren Mikroklima des oberen Dünndarms wieder. Die dominierende Rolle die PCFT in der intestinalen Folsäure-Absorption spielt, wurde anhand der Demonstration mit Patienten mit erblicher Folsäure-Malabsorption (HFM), festgestellt, die funktionsverlierende Mutationen im PCFT Gen aufweisen. HFM ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die durch gestörte intestinale Folsäure-Absorption verursacht wird. HFM Patienten weisen eine sehr niedrigen Folat-Spiegel im Blut und der Zerebrospinalflüssigkeit auf. HFM manifestiert sich in den ersten Monaten nach der Geburt durch Anämie, eine Immunschwäche mit Hypogammaglobulinämie, woraus schwere Infektionen, wiederkehrende und chronische Diarrhoe und folgend Gedeihstörungen resultieren. Es wurde der Promotor des menschlichen PCFT Gens identifiziert und gezeigt, dass es eine 1085-bp Insel (Nukleotide -600 bis +485), die eine zentrale Rolle bei der Modulation der PCFT Genexpression in sich birgt, gibt. Diese CpG-Insel war in der humanen Leukämie-Zelllinie dicht methyliert und das PCFT Gen wurde infolgedessen stillgelegt. Durch Verwendung einer sequentiellen Deletionsanalyse des PCFT-Promotors fand man heraus, dass ein 271-bp Fragment stromaufwärts bis zum ersten ATG durch die gleiche Promotoraktivität angetrieben wird, wie das gesamten 3,1-kb Fragment. Ferner ergab sich, dass der minimale PCFT-Promotor nur bei 157-bp lokalisiert ist. Folgend wurde festgestellt, dass der basale Promotor reich an funktionellen GC-Box-Stellen ist, die eine wichtige Rolle bei der Regulierung der PCFT-Gen-Expression spielen. [GONEN und ASSARAF, 2010]

9.8 Regulierung des PCFT (SLC46A1) durch den nuklearen respiratorischen Faktor (NRF-1)

Der Nukleare respiratorische Faktor (NRF-1) ist ein zentraler Transkriptionsfaktor, der die Expression von nuklear-kodierten, respiratorischen Genen fördert. Es wurde herausgefunden, dass NRF-1 die Expression reguliert und ein Spektrum von Genen für die mitochondrialen Funktionen benötigt werden, einschließlich der meisten nukleären Gene, die die fünf Untereinheiten des respiratorischen enzymatischen Komplexes kodieren, Komponenten der mitochondrialen DNA (mtDNA)-Replikation und -Transkription, mitochondriale und cytosolische Enzyme des Häm-Biosyntheseweges und Komponenten des Protein-Imports. Obwohl NRF-1 eine wichtige Rolle bei der Regulation und Koordination der gut getimten Expression der nuklearen als auch mitochondrialen Gen-Antwort auf den wachsenden Bedarf in der mitochondrialen Biosynthese spielt, ist es klar, dass NRF-1 auch eine wichtige Schlüsselrolle beim Zellwachstum hat. Die Analyse der mRNA-Spiegel aller bekannten Folat-Transporter ergab, dass NRF-1 in hohem Maße PCFT reguliert und in geringerem Maße die RFC und FR -Gene. [GONEN und ASSARAF, 2010]

9.9 Folsäure-Absorption im Kolon

Funktionelle, molekulare und immunologische Studien haben gezeigt, dass Darmepithelzellen nicht ausdrücklich den alternativen Folsäureaufnahmemechanismus über den Folat-Rezeptor nutzen. Der Darm ist eine zweite Quelle von Folat, d.h. die Folsäure, die durch die normale Mikroflora des Dickdarms synthetisiert wird, ausgesetzt. Bedeutende Mengen dieser Folat-Quelle haben gezeigt, dass sie in einer resorbierbaren Monoglutamatform existieren. Studien haben auch gezeigt, dass der Dickdarm in der Lage ist, einen Teil dieses Folats zu

absorbieren. Unter Verwendung von gereinigten apikalen Dickdarmmembranvesikeln, die aus dem Darm eines menschlichen Organspenders isoliert wurden und den aus dem Menschen stammenden, nicht transformierten Colon-Epithelzellen NCM460, haben Untersuchungen gezeigt, dass die Folsäureaufnahme im Dickdarm effizient ist und über einen bestimmten Carrier-vermittelten, pH-abhängigen, DIDS-sensitiven sowie elektroneutralen Mechanismus erfolgt, der ähnlich dem ist, der im Dünndarm identifiziert wurde. Die Untersuchungen mit Dickdarmepithelzellen NCM460 haben auch gezeigt, dass die Folsäureaufnahme im Dickdarm ähnlich der im Dünndarm verläuft, welche durch eine intrazelluläre Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) geregelt wird sowie auch cAMP-vermittelten Signalwege. [SAID, 2004]

9.10 Einflussfaktoren auf die Folsäure-Absorption

Wie bereits unter 5.5 Thiamin-Absorption: Einfluss von Ethylalkohol und Chronischer Nierenerkrankung sowie deren Auswirkungen beschrieben, ergibt sich die Chronische Nierenerkrankung (CKD) aus der gekennzeichneten Down-Regulation der Expression von Folsäure- und Thiamin-Transporter im Darm, Herz, Leber und Gehirn. Diese Ereignisse können zu einer reduzierten intestinalen Absorption und beeinträchtigter zellulärer Homöostase dieser essentiellen Mikronährstoffe, trotz ihres normalen Plasmaspiegels, führen. [BUKHARI et al., 2011]

Angesichts der wichtigen Rolle der Folat-Homöostase in Geweben, können Transportdefekte, die hRFC involvieren ins Auge gefasst werden. Pathologische Bedingungen mit Folat-Mangel, einschließlich Herzkreislauferkrankungen, fetalen Anomalien, neurologischen Erkrankungen und Krebs, werden damit assoziiert. Diese können sich durch Veränderungen in katalytischen Aktivitäten von Folat-abhängigen, interkonvertierenden und biosynthetischen Enzymen

(z.B. 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase) zusammensetzen, die Einfluss auf die zelluläre Verteilung der einzelnen Tetrahydrofolat-Formen und funktionell wichtigen Polymorphismen im hRFC-Locus, haben. Die kumulativen Effekte dieser Veränderungen können zelluläre oder gewebsspezifische Folsäure-Mängel sein, das in einer beeinträchtigenden Nukleotid-Biosynthese und der Reparatur von DNA-Schäden und/oder DNA-Hypermethylierung aufgrund des verringerten S-Adenosylmethionin resultiert. [PATTERSON et al., 2008]

Eine Folsäure-Depletion spielt eine Rolle bei der allgemeinen Hypomethylierung, die zu einer erhöhten intestinalen Folat-Absorption und gesteigerten Folsäure-Sättigung führt. Ebenso könnte ein Überschuss an Folsäure in einer PCFT Hypermethylierung und Unterdrückung der transkriptionalen Aktivität dieses Gens resultieren. Ein solcher regulatorischer Feedback-Mechanismus könnte ein wichtiger Faktor bei der Aufrechterhaltung der Folsäure-Homöostase sein. Während der Folat-Status und Auswirkungen auf eine Methylierung und Expression anderer Folat-Transporter hat, ist PCFT alleine zur Veränderung des Levels der Folat-Absorption im proximalen Dünndarm und damit auch zur Modulation des Folsäurespiegels fähig. [DIOP-BOVE et al., 2009]

Ein Mangel an dem Vitamin führt zu einer Beeinträchtigung der Replikation der Zellen und anderen metabolischen Veränderungen, insbesondere die mit der Methionin-Synthese zusammenhängen. Die ähnlichen klinischen Manifestationen des Cobalamin- und Folsäuremangels unterstreichen die metabolische Wechselbeziehung zwischen den beiden Vitaminen. Folsäuremangel manifestiert sich klinisch als megaloblastäre Anämie und ist der häufigste Vitaminmangel in den entwickelten Ländern. [CABALLERO, 2005 zit. n. McPARTLIN, 2005]

10. Zusammenfassung

Die intestinale Absorption der wasserlöslichen Vitamine, Biotin, Pantothersäure, Niacin, Thiamin, Pyridoxin, Riboflavin, Ascorbinsäure und Folsäure wird von substratspezifischen Transportmechanismen vermittelt. Es kann gesagt werden, dass hohe Dosen des jeweiligen Vitamins durch passive oder erleichterte Diffusion aufgenommen werden, niedrige Dosen allerdings ein hochaffines Transportsystem für die Absorption benötigen.

Die Aufnahme von freiem Biotin durch menschliche Dünndarmepithelzellen erfolgt über ein effizientes, Na^+ -abhängiges, Carrier-vermitteltes Biotin-Aufnahme System, das als hSMVT - humaner Natrium-abhängiger Multivitamintransporter . bezeichnet wird. In humanen Lymphozyten wurde festgestellt, dass ein Monocarboxylattransporter (MCT) die hochaffine Biotin-Aufnahme vermittelt.

Dieses intestinale Biotin-Aufnahmesystem . hSMVT - wird auch von zwei anderen, unabhängigen Mikronährstoffen, nämlich dem wasserlöslichen Vitamin Pantothersäure und dem Substrat Lipoat genutzt.

Für die intestinale Absorption von Niacin, sind zwei Transporter zuständig. Der Monocarboxylattransporter-1 (MCT1) und der Natrium-gekoppelte Monocarboxylat-Transporter (SMCT1). Auch wenn es keine strukturelle Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Transportern gibt, zeigen beide eine ähnliche Substratspezifität.

Verantwortlich für die Aufnahme von Thiamin sind zwei Proteine aus der Carrier-Genfamilie SLC19A, die als humane Thiamin-Transporter-1 (hTHTR1; SLC19A2) und humaner Thiamin-Transporter-2 (hTHTR2, SLC19A3) identifiziert wurden. Die Thiamin-Aufnahme erfolgt pH-abhängig, Na^+ -unabhängig, abhängig von Temperatur und Stoffwechselenergie und gesättigt als Funktion der Konzentration.

Die phosphorylierten Vitamere von Pyridoxin werden durch Carrier-vermittelte Diffusion absorbiert.

Die drei Riboflavin-Transporter-1, -2 und -3 (hRFT-1, -2 und -3) sind alle im menschlichen Darm exprimiert. Die Expression des hRFT-2 ist höher als die der anderen Transporter und aus diesem Grund wird der Riboflavin-Aufnahmeprozess durch diesen vermittelt.

Die beiden Vitamin C-Transporter-1 und -2 (hSVCT-1 und hSVCT-2), die Produkte der SLC23A1 und SLC23A2 Gene, sind zuständig für den Transport von Ascorbinsäure in die Mukosazellen des oberen Dünndarms. Für die intestinale Folsäure-Absorption sind derzeit drei Transportsysteme bekannt: Der reduzierte Folat-Carrier RFC/SLC19A1, Folat-Rezeptoren (FR's) und der Protonen-gekoppelte Folat-Transporter PCFT/SLC46A1.

Die transkriptionale Regulierung dieser Transportsysteme und auch die genetischen bedingten Einflussfaktoren, die auf die molekularen Mechanismen zur Absorption wirken, sind teilweise noch nicht ausreichend erforscht. Jedoch werden durch laufende Studien immer wieder neue Erkenntnisse gewonnen.

11. Abstract

The intestinal absorption of the water-soluble vitamins, biotin, pantothenic acid, niacin, thiamin, pyridoxine, riboflavin, ascorbic acid and folic acid is mediated by specific transport mechanisms. It can be said that high doses of the respective vitamins are absorbed by passive or facilitated diffusion. Low doses, however, require a high-affinity transport system for absorption.

The uptake of free biotin by human brush border epithelial cells occurs via an efficient, Na^+ -dependent and carrier-mediated biotin uptake system, called hSMVT, human sodium-dependent multivitamin transporter. It has been determined in human lymphocytes that a monocarboxylate transporter (MCT) interferes with high-affinity biotin uptake. The same intestinal biotin absorption system, hSMVT, is also used by two other independent micronutrients, namely the water-soluble vitamin pantothenic acid and the substrate lipoate. For the intestinal absorption of niacin, two transporters are responsible: the monocarboxylate transporter-1 (MCT1) and the sodium-coupled monocarboxylate transporter-1 (SMCT1). Even when there is no structural similarity between these two transporters, both show a similar substrate specificity. Responsible for the uptake of thiamine are two proteins from the carrier gene family SLC19A, which were identified as the human thiamine transporter-1 (hTHTR1, SLC19A2) and human thiamine transporter-2 (hTHTR2, SLC19A3). The thiamine uptake is pH-dependent, Na^+ -dependent, depending on temperature and metabolic energy, and saturated as a function of concentration. The phosphorylated vitamers of pyridoxine are absorbed by carrier-mediated diffusion. In the human intestine all of the three riboflavin transporter-1, -2 and 3 (hRFT-1, -2 and -3) are expressed. The expression of the hRFT-2 is higher than the other transporters and for this reason, the riboflavin uptake process is mediated by this one. Both, vitamin C transporter-1 and -2 (hSVCT-1 and hSVCT-2), the products of the SLC19A1 and SLC19A3 genes are responsible for the transport of ascorbic acid in the mucosa

cells of the upper small intestine. For the intestinal absorption of folic acid three transport systems are currently known: the reduced folate carrier RFC/SLC19A1, folate receptors (FRs) and the proton-coupled folate transporter PCFT/SLC46A1. The transcriptional regulation of these transport systems and the related genetic factors that contribute to the molecular mechanisms of absorption, are, in part, not yet sufficiently researched. However, through ongoing studies always new insights are gained.

12. Literaturverzeichnis

BALL GFM. Vitamins in foods: analysis, bioavailability and stability, Verlag: Taylor & Francis Group, United States of America

BALAMURUGAN K, VAZIRI ND, SAID HM. Biotin uptake by human proximal tubular epithelial cells: cellular and molecular aspects. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 288:F823-F831

BUKHARI FJ, MORADI H, GOLLAPUDI P, KIM HJ, VAZIRI ND, SAID H. Effect of chronic kidney disease on the expression of thiamine and folic acid transporters. Nephrol Dial Transplant 2011, 26: 2137 - 2144

BURKHOLDER P, McVEIGH I. Syntheses of vitamins by intestinal bacteria 1942, Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A., 28: 285

CABALLERO B, ALLEN L, PRENTICE A. Encyclopedia of Human Nutrition, Second Edition 2005, Oxford, UK

CHATTERJEE N, KUMAR C, ORTIZ A, RUBIN A, SAID H. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport. Am J Physiol Cell Physiol 1999, 277:C605-C613

CUI D, MORRIS ME. The Drug of Abuse γ -Hydroxybutyrate Is a Substrate for Sodium-Coupled Monocarboxylate Transporter (SMCT) 1 (SLC5A8): Characterization of SMCT-Mediated Uptake and Inhibition. Drug Metabolism and Disposition 2009, Vol 37, No. 7: 1404-1410

DIOP-BOVE NK, WU J, ZHAO R, LOCKER J, GOLDMAN ID. Hypermethylation of the human proton-coupled folate transporter (PCFT, SLC46A1) minimal transcriptional regulatory region in an antifolate-resistant HeLa cell line. Mol Cancer Ther. 2009, 8(8):2424-2431

DOC MEDICUS Gesundheitsportal der Deutschen Gesellschaft für Nährstoffmedizin und Prävention (DGNP) e.V. (<http://www.vitalstofflexikon.de/>) Letzter Zugriff: 08/2012

ELMADFA I, LEITZMANN C. Ernährung des Menschen. 4. Auflage, Ulmer Verlag, 2004; 357-359

GENERAL IJ, DRAGOMIROVA R, MEIROVITCH H. A New Method for Calculating the Absolute Free energy of Binding: the Effect of a Mobile Loop on the Avidin/Biotin Complex. J Phys Chem, 2011, 13, 115 (1): 168-175

GONEN N and ASSARAF Y. The obligatory intestinal folate transporter PCFT (SLC46A1) is regulated by nuclear respiratory factor 1. J Biol Chem, 2010, 285(44):33602-33613

GOPAL E, FEI Y-J., ZHUANG L., PRASAD PD, GANAPATHY V. Sodium-coupled and electrogenic transport of B-complex vitamin nicotinic acid by slc5a8, a member of the Na/glucose co-transporter gene family. Biochem J., 2005, 388:309-316

GRAFE F. Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Transportsystemen für pharmakologisch aktive Substanzen an humanen Keratozyten, Halle (Saale), 2004; 10-25

KELLY GD. Pantothenic Acid. Alternativ Medicine Review., 2011, Vol 16, Number 3, 263 . 274

KOOLMAN J, RÖHM K-H. Chromatin. In: Taschenatlas der Biochemie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2009; 242

LUO S, WANG Z, KANSARA V, PAL D, MITRA A. Activity of a sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT) in MDCK-MDR1 cells and mechanism of ascorbate uptake. Int J Pharm. 2008, 358(1-2):168-176

MACKENZIE B, ILLING AC, HEDINGER MA. Transport model of the human Na⁺-coupled L-ascorbic acid (vitamin C) transporter SVCT1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008, 294:C451-C459

MARDACH R, ZEMPLENI J, WOLF B, CANNON M, JENNINGS M, CRESS S, BOYLAN J, ROTH S, CEDERBAUM S, MOCK D. Biotin dependency due to a defect in biotin transport. *J. Clin. Invest*. 2002, 109: 1617-1623

NABOKINA S.M., REIDLING J.C., SAID H.M. Differentiation-dependent Up-regulation of Intestinal Thiamin Uptake. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, Vol 280, No 38: 32676 . 32682

PATTERSON D, GRAHAM C, CHERIAN C, MATHERLY LH. A humanized mouse model for the reduced folate carrier. *Mol Genet Metab*. 2008, 93(2):95-103

PIETRZIK K, GOLLY I, LOEW D. *Handbuch der Vitamine*. Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München, 2008

RAMASWAMY K. Intestinal absorption of water-soluble vitamins Focus on Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1999, Vol 277. No 4: C603-C604

REIDLING JC, SAID HM. In vitro and in vivo characterization of the minimal promoter region of the human thiamin transporter SLC19A2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003, 285: C633 . C641

REIDLING J, SUBRAMANIAN V, DAHHAN T, SADAT M, SAID H. Mechanisms and regulation of vitamin C uptake: studies of the hSVCT systems in human liver epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008, 295(6): G1217-G1227

REIDLING J, RUBIN S. Promotor Analysis of the Human Ascorbic Acid Transporters SVCT1 & 2: Mechanisms of Adaptive Regulation in Liver Epithelial Cells. *J Nutr Biochem*. 2011, 22(4):244-350

SAID H, ORTIZ A, McCLOUD E, DYER D, MOYER M, RUBIN S. Biotin uptake by human colonic epithelial NCM460 cells: a carrier-mediated process shared with pantothenic acid. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998, 275:C1365-C1371

SAID HM, ORTIZ A, MA TY. A carrier-mediated mechanism for pyridoxine uptake by human intestinal Caco-2 cells: by a PKA-mediated pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, 285:C1219-C1225

SAID H. Recent Advances in Carrier-Mediated Intestinal Absorption of Water Soluble Vitamins 2004, *Annu.Rev.Physiol*, 664:419-446

SAID HM, BALAMURUGAN K, SUBRAMANIAN VS, MARCHANT JS. Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamine absorption in human intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004, 286: G491 . G498

SAID HM, NABOKINA SM, BALAMURUGAN K, MOHAMMED ZM, URBINA C, KASHYAP ML. Mechanism of nicotinic acid transport in human liver cells: experiments with HepG2 cells and primary hepatocytes. *Am Journal of Physiol Cell Physiol* 2007, 293:C1773-C1778

SAID H. Cell and Molecular Aspects of Human Intestinal Biotin Absorption. *JN The Journal of Nutrition* 2008, 158-162

SAID H. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem. J*. 2011,(437): 357. 372

SAID Z, SUBRAMANIAN VS, VAZIRI ND, SAID H. Pyridoxine uptake by colonocytes: a specific and regulated carrier-mediated process. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, 294:C1192-C1197

STOLZ J. Biotin, Das Vitamin für Haut, Haar und Hefe. 2009, *BioSpektrum*, 132-135

STOLZ J., Vitamine . Präsentation, 2011, www.nutrition.tum.de/fileadmin/bachelor/.../vitamine6_2011.pdf (Letzter Zugriff: 13.07.2012)

SUBRAMANIAN VS, MARCHANT JS, SAID HM. Targeting and Trafficking of the Human Thiamine Transporter-2 in Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, Vol 281, No 8: 5233 - 5245

SUBRAMANIAN VA, RAPP L, MARCHANT JS, SAID HM. Role of cysteine in cell surface expression of the human riboflavin transporter-2 (hRFT2) in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 301(1):G100-G109

VILLASEÑOR T, BROM S, DÁVALOS A, LOZANO L, ROMERO D, GARCÍA-DE LOS SANTOS A. Housekeeping genes essential for pantothenate biosynthesis are plasmid-encoded in *Rhizobium etli* and *Rhizobium leguminosarum* 2011, Villaseñor et al. *BMC Microbiology*, 11:66, 1471-2180

YAMAMOTO T, JAROENPORN S, PAN L, AZUMANO I, ONDA M, NAKAMURA K, WATANABE G, TAYA K. Effects of Pantothenic Acid on Testicular Function in Male Rats. *J. Vet. Med. Sci.*, 2009, (11): 1427-1432

YONEZAWA A, MASUDA S, KATSURA T, INUI K. Identification and functional characterization of a novel human and rat riboflavin transporter RFT1. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2008, 295:C632-C641

13. Curriculum Vitae

Zur Person

Name	Daniela Stieger
Geburtsdatum	12.08.1981
Nationalität	Österreich
Geburtsort	Klagenfurt
Kontakt	daniela.stieger@gmail.com

Schulische und universitäre Ausbildung

2000 - 2012	Diplomstudium der Ernährungswissenschaften
1995 - 2000	BAKIP Klagenfurt (Bundesbildungsanstalt für Kindergartenpädagogik und Horterziehung)
1991 - 1995	PHS Ursulinen in Klagenfurt
1987 - 1991	Volksschule St.Thomas am Zeiselberg

Berufliche Erfahrungen und Praktika

04/10 bis dato	Funk International Austria GmbH, 1010 Wien
09/09-03/10	Assistentin in der Ordination Fr. Dr. Valerie Schwenninger-Dörfler
01/07-03/10	Assistentin auf der Fachbereichsbibliothek für Pharmazie und Ernährungswissenschaften
07/09-08/09	Praktikum bei Berglandmilch, Werk Klagenfurt Bereich Mikrobiologisches Labor
09/08	Praktikum bei Staud´s Wien, Bereich Produktion und Qualitätskontrolle
07/08-08/08	Praktikum bei Berglandmilch, Werk Klagenfurt Mikrobiologisches Labor

- 07/07-09/07 Praktikum bei Berglandmilch; Werk Klagenfurt,
Bereich Mikrobiologisches Labor und
Chemisches Labor
- 07/06-09/06 Praktikum bei Berglandmilch; Werk klagenfurt
Bereich Mikrobiologisches Labor
- 07/05-09/05: Praktikum bei Berglandmilch; Bereich
Mikrobiologisches Labor
- 04/05-08/05: Mitarbeit bei der sGesünder Leben Tour%
Veranstalter: Gesundheitsforum NÖ, Bereich
Ernährungsaufklärung
- 1999-2004: Praktika bei Raiffeisenlandesbank Kärnten,
Bereich Marketing/Werbung/Club (jeweils 1-2
Monate)