

**ISOLIERUNG EINES
PRODRUG-REDUZIERENDEN
ENZYMSYSTEMS AUS DER SCHWEINENIERE**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

DIRK HOLTkamp

Kiel 2007

Referent:

Korreferent:

Tage der mündlichen Prüfungen:

zum Druck genehmigt:

Prof. Dr. B. Clement

HD Dr. T. Kunze

26. April; 03. Mai und

07. Mai 2007

Kiel, den 10. Mai 2007

Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer
(Dekan)

Für meine Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ε	spezifischer Absorptionskoeffizient
A	Absorption
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA3	Moco Sulfurase (<i>A. thaliana</i>)
ABA3-CT	C-Terminus der Moco Sulfurase (<i>A. thaliana</i>)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
Bfarm	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSA	Bovines Serum Albumin
CM	Carboxymethyl
CMC	kritische Mizellbildungskonstante
CoA	Coenzym A
CT	C-Terminus
CYP	Cytochrom P450
DEAE	Dimethylaminoethyl
d. h.	das heißt
DLPC	L- α -Dilaurylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxybis(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
EM	Emission
ESI	Elektrospray Ionisierung
etc.	und so weiter
EX	Extinktion
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase

<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HCl	Hydrochlorid
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IC ₅₀	für eine halbmaximale Hemmung nötige Konzentration
IgG	Immunglobulin G
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten Konstante
LC	Flüssigchromatographie
Lys	Lysin
MAO	Monoaminoxidase
mg	Milligramm
min	Minute
Moco	Molybdäncofaktor
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MPT	Molybdopterin
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
nHPLC	nano HPLC
nmol	nanomol
pH	Wasserstoffionenkonzentration
<i>p</i> -HMB	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat
pmol	pikomol
ox	oxidiert
Q-TOF	Quadrupol-Flugzeit
red	reduziert
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde

Tab.	Tabelle
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TIM	Translokase der inneren mitochondrialen Membran
TOM	Translokase der äußeren mitochondrialen Membran
Tris	Tris(hydroxymethyl)ethyldiamin
U	Unit
u. a.	unter anderem
UDP	Uridin 5'-Diphosphat
UV	ultraviolett
V_{\max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
z. B.	zum Beispiel

1	EINFÜHRUNG	1
1.1	BIOTRANSFORMATION	1
1.1.1	Definition und Bedeutung	1
1.1.2	Biotransformationsstudien	2
1.1.3	Enzyme der Biotransformation	4
1.2	METABOLISMUS IN DER NIERE	5
1.2.1	Einführung	5
1.2.2	Renale Biotransformationswege	8
1.2.2.1	Phase I	8
1.2.2.1.1	Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen	8
1.2.2.1.2	Flavinhaltige Monooxygenasen	10
1.2.2.1.3	Alkoholorxidation	11
1.2.2.1.4	Aldehydoxidation	11
1.2.2.1.5	Monoaminoxidase	12
1.2.2.1.6	Aldehyd- und Ketonreduktion	12
1.2.2.1.7	Hydrolytische Mechanismen	13
1.2.2.2	Phase II	13
1.2.2.2.1	Glucuronidierung	13
1.2.2.2.2	Sulfatierung	14
1.2.2.2.3	Methylierung	15
1.2.2.2.4	Acetylierung	17
1.2.2.2.5	Glutathion-Konjugation	18
1.2.2.2.6	Mercaptursäure-Synthese	19
1.2.2.2.7	Aminosäure-Konjugation	19
1.2.3	Lokalisation arzneistoffmetabolisierender Enzyme in der Niere	21
1.2.4	Ergebnisse des renalen Metabolismus	22
1.3	PRODRUGPRINZIP <i>N</i>-HYDROXYLIERTER BASISCHER VERBINDUNGEN	24
1.4	REDUKTION <i>N</i>-HYDROXYLIERTER BASISCHER VERBINDUNGEN	29
1.5	THEMA UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	33
2	GEWINNUNG UND BEARBEITUNG VON SCHWEINENIERENMIKROSOMEN	35
2.1	EINLEITUNG	35
2.1.1	Das Cytochrom P450-Enzymsystem	35
2.1.1.1	Grundlagen und Vorkommen	35
2.1.1.2	Der katalytische Zyklus	38
2.1.2	Gewinnung membranständiger Enzyme	39
2.1.3	Bisherige Untersuchungen	41
2.1.4	Zielsetzung	43
2.2	METHODEN	44
2.2.1	Gewinnung der Enzympräparation	44
2.2.1.1	Materialien und Geräte	44

2.2.1.2	Gewinnung von Schweinenierenmikrosomen	44
2.2.1.3	Isolierung des zur Reduktion <i>N</i> -hydroxylierter Verbindungen verantwortlichen Cytochrom P450 Isoenzym	45
2.2.1.3.1	Solubilisation	45
2.2.1.3.1.1	Polyethylenglykol 6000 Fällung	45
2.2.1.3.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B [®]	46
2.2.1.3.2.1	Variation des Detergenzes	46
2.2.1.3.2.2	Variation der Salzkonzentration	47
2.2.1.3.3	Präparative HPLC an Fractogel [®] EMD TMAE 650 (S)	47
2.2.1.3.4	Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	49
2.2.1.3.4.1	Solubilisation	49
2.2.1.3.4.2	Protein-Verlaufskontrolle	50
2.2.1.3.4.3	Cytochrom b ₅ -Verlaufskontrolle	50
2.2.1.3.4.4	NADH Cytochrom b ₅ Reduktase-Verlaufskontrolle	50
2.2.1.3.4.5	Cytochrom P450-Verlaufskontrolle	50
2.2.1.3.4.6	Monoaminoxidase-Verlaufskontrolle	50
2.2.1.3.4.7	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle ohne zusätzliche Enzyme	51
2.2.1.3.4.8	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	51
2.2.1.3.4.9	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b ₅	51
2.2.1.3.4.10	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b ₅ Reduktase und zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b ₅	51
2.2.1.3.4.11	Dextromethorphan- <i>O</i> -Demethylierung	52
2.2.1.3.4.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	52
2.2.1.3.4.13	Massenspektrometrische Analyse	52
2.2.1.3.4.14	<i>nit-1</i> Rekonstitutions-Assay	52
2.2.1.3.4.15	FormA Analyse	52
2.2.1.3.4.16	Immunoblot-Analyse	53
2.2.1.3.5	Kationenaustauschchromatographie an CM-Cellulose	53
2.2.1.3.6	Detergenzentfernung	53
2.2.1.3.6.1	Calbiosorb [®]	54
2.2.1.3.6.2	Hydroxylapatit	54
2.2.1.3.6.3	Detergent Out [™]	54
2.2.1.3.7	Stabilität	55
2.2.1.3.8	Lagerung	55
2.2.2	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparationen	55
2.2.2.1	Proteinbestimmung	55
2.2.2.2	NADPH Cytochrom P450 Reduktase-Aktivitätsbestimmung	56
2.2.2.3	Cytochrom b ₅ -Gehaltsbestimmung	56
2.2.2.4	NADH Cytochrom b ₅ Reduktase-Aktivitätsbestimmung	57
2.2.2.5	Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung	57
2.2.2.6	Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung	58
2.2.2.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	58

2.2.2.8	Massenspektrometrische Analyse	61
2.2.2.9	<i>nit-1</i> Rekonstitutions-Analyse	61
2.2.2.10	FormA Analyse	62
2.2.2.11	Immunoblot-Analyse	62
2.2.3	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktase	64
2.2.3.1	Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin	64
2.2.3.1.1	Synthese von Benzamidoxim	64
2.2.3.1.2	Inkubationsbedingungen	64
2.2.3.1.3	HPLC-Analytik	65
2.2.3.1.4	Anaerobe Inkubationsbedingungen	66
2.2.3.1.5	Hemmstudien	66
2.2.3.1.5.1	Kaliumcyanid	67
2.2.3.1.5.2	Hydroxylamin-HCl	67
2.2.3.1.5.3	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	67
2.2.3.1.5.4	Cytochrom c	67
2.2.3.1.5.5	Kohlenmonoxid	68
2.2.3.1.5.6	Natriumvanadat	68
2.2.3.1.6	Rekonstitution des P450-Isoenzyms zur Reduktion von Benzamidin	68
2.2.3.2	<i>O</i> -Demethylierung von Dextromethorphan	69
2.2.3.2.1	Inkubationsbedingungen	69
2.2.3.2.2	HPLC-Analytik	69
2.2.3.2.3	Rekonstitution der DEAE-Fraktionen zur <i>O</i> -Demethylierung von Dextromethorphan	71
2.3	ERGEBNISSE	72
2.3.1	Solubilisationsstudien	72
2.3.1.1	Polyethylenglykol 6000 Fällung	75
2.3.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B [®]	75
2.3.3	Präparative HPLC an Fractogel [®] EMD TMAE 650 (S)	77
2.3.4	Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	78
2.3.4.1	Solubilisation der Schweinenierenmikrosomen für die Anionen-austauschchromatographie an DEAE-Cellulose	78
2.3.4.2	Protein-Verlaufskontrolle	79
2.3.4.3	Cytochrom b ₅ -Verlaufskontrolle	80
2.3.4.4	NADH Cytochrom b ₅ Reduktase-Verlaufskontrolle	81
2.3.4.5	Cytochrom P450-Verlaufskontrolle	81
2.3.4.6	Monoaminoxidase-Verlaufskontrolle	82
2.3.4.7	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle ohne zusätzliche Enzyme	82
2.3.4.8	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	83
2.3.4.9	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b ₅	84
2.3.4.10	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b ₅ Reduktase und zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b ₅	85
2.3.4.11	Dextromethorphan- <i>O</i> -Demethylierung	86

2.3.4.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	87
2.3.4.13	Massenspektrometrische Analyse	87
2.3.4.14	<i>nit-1</i> Rekonstitutions-Assay	89
2.3.4.15	FormA Analyse	89
2.3.4.16	Immunoblot-Analyse	90
2.3.5	Kationenaustauschchromatographie an CM-Cellulose	91
2.3.6	Stabilität	91
2.3.7	Charakterisierung der Schweinenierenmikrosomen	92
2.3.7.1	Aktivitäten ausgewählter Enzyme in Schweinenierenmikrosomen	92
2.3.7.1.1	NADPH Cytochrom P450 Reduktase	92
2.3.7.1.2	Cytochrom b ₅	92
2.3.7.1.3	NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	93
2.3.7.1.4	Cytochrom P450	93
2.3.7.1.5	Monoaminoxidase	94
2.3.7.2	Charakterisierung und Inkubationsoptimierung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität von Benzamidoxim der Schweinenieren-mikrosomen	94
2.3.7.2.1	pH-Wert	95
2.3.7.2.2	Substratabhängigkeit	96
2.3.7.2.3	Cosubstratabhängigkeit und –art	97
2.3.7.3	Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim mittels Schweinenierenmikrosomen	98
2.3.7.4	Hemmstudien	98
2.3.7.4.1	Kaliumcyanid	98
2.3.7.4.2	Hydroxylamin-HCl	100
2.3.7.4.3	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	101
2.3.7.4.4	Cytochrom c	102
2.3.7.4.5	Kohlenmonoxid	103
2.3.7.4.6	Natriumvanadat	104
2.3.7.4.7	Zwittergent® 3-14	104
2.3.7.5	Vergleichsinkubation von Schweineleber- und Schweinenierenmikrosomen bezüglich der Reduktion von Benzamidoxim und <i>O</i> -Demethylierung von Dextromethorphan	105
2.4	DISKUSSION	107
2.5	ZUSAMMENFASSUNG	119
3	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON SCHWEINENIERENMITOCHONDRIEN	122
3.1	EINLEITUNG	122
3.1.1	Bisherige Untersuchungen	122
3.1.2	Zielsetzung	123
3.2	METHODEN	124
3.2.1	Gewinnung der Enzympräparation	124
3.2.1.1	Materialien und Geräte	124
3.2.1.2	Gewinnung von Schweinenierenmitochondrien	124

3.2.2	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparation	125
3.2.2.1	Proteinbestimmung	125
3.2.2.2	NADPH Cytochrom P450 Reduktase-Aktivitätsbestimmung	126
3.2.2.3	Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung	127
3.2.3	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktase	127
3.2.3.1	Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin	127
3.2.3.1.1	Synthese von Benzamidoxim	128
3.2.3.1.2	Inkubationsbedingungen	128
3.2.3.1.3	HPLC-Analytik	128
3.2.3.1.4	Anaerobe Inkubationsbedingungen	129
3.2.3.1.5	Hemmstudien	130
3.2.3.1.5.1	Kaliumcyanid	130
3.2.3.1.5.2	Hydroxylamin-HCl	130
3.2.3.1.5.3	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	131
3.2.3.1.5.4	Cytochrom c	131
3.2.3.1.5.5	Kohlenmonoxid	131
3.2.3.1.5.6	Natriumvanadat	132
3.3	ERGEBNISSE	133
3.3.1	Charakterisierung der Schweinenierenmitochondrien	133
3.3.1.1	Mikrosomale Kontamination	133
3.3.1.2	Anreicherung der Mitochondrien	133
3.3.1.3	Proteinausbeute der Schweinenierenmitochondrien-Gewinnung	134
3.3.1.4	Charakterisierung und Inkubationsoptimierung der Reduktion von Benzamidoxim durch Schweinenierenmitochondrien	134
3.3.1.4.1	Proteinabhängigkeit	135
3.3.1.4.2	Inkubationszeit	136
3.3.1.4.3	pH-Wert	137
3.3.1.4.4	Substratabhängigkeit	138
3.3.1.4.5	Cosubstratabhängigkeit und -art	139
3.3.1.5	Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim mittels Schweinenierenmitochondrien	140
3.3.1.6	Hemmstudien	140
3.3.1.6.1	Kaliumcyanid	141
3.3.1.6.2	Hydroxylamin-HCl	142
3.3.1.6.3	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	143
3.3.1.6.4	Cytochrom c	144
3.3.1.6.5	Kohlenmonoxid	145
3.3.1.6.6	Natriumvanadat	146
3.4	DISKUSSION	147
3.5	ZUSAMMENFASSUNG	152
4	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER ÄUßEREN MEMBRAN VESIKEL	153
4.1	EINLEITUNG	153

4.1.1	Aufbau und Funktion der Mitochondrien	153
4.1.2	Methoden zur Gewinnung der Äußeren Membran Vesikel	156
4.1.3	Bisherige Untersuchungen	158
4.1.4	Zielsetzung	158
4.2	METHODEN	159
4.2.1	Gewinnung der Enzympräparation	159
4.2.1.1	Materialien und Geräte	159
4.2.1.2	Gewinnung von Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien	159
4.2.2	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparation	160
4.2.2.1	Proteinbestimmung	160
4.2.2.2	Succinat Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung	160
4.2.2.3	Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung	161
4.2.2.4	Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung	161
4.2.2.5	Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung	161
4.2.3	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktase	162
4.2.3.1	Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin	162
4.2.3.1.1	Synthese von Benzamidoxim	162
4.2.3.1.2	Inkubationsbedingungen	162
4.2.3.1.3	HPLC-Analytik	162
4.2.3.1.4	Anaerobe Inkubationsbedingungen	164
4.2.3.1.5	Hemmstudien	164
4.2.3.1.5.1	Kaliumcyanid	165
4.2.3.1.5.2	Hydroxylamin-HCl	165
4.2.3.1.5.3	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	165
4.2.3.1.5.4	Cytochrom c	165
4.2.3.1.5.5	Kohlenmonoxid	166
4.2.3.1.5.6	Natriumvanadat	166
4.3	ERGEBNISSE	167
4.3.1	Charakterisierung der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien	167
4.3.1.1	Proteinausbeute der Äußeren Membran Vesikel-Gewinnung	167
4.3.1.2	Enzymatische Charakterisierung der Äußeren Membran Vesikel	167
4.3.1.2.1	Succinat Cytochrom c Reduktase	167
4.3.1.2.2	Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivität	168
4.3.1.2.3	Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung	169
4.3.1.2.4	Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung	169
4.3.1.2.5	<i>N</i> -reduktive Aktivität	169
4.3.1.2.6	Gesamtergebnis der Enzymcharakterisierung	170
4.3.1.3	Charakterisierung und Inkubationsoptimierung der Reduktion von Benzamidoxim durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien	171
4.3.1.3.1	Proteinabhängigkeit	171
4.3.1.3.2	Inkubationszeit	173
4.3.1.3.3	pH-Wert	174
4.3.1.3.4	Substratabhängigkeit	175
4.3.1.3.5	Cosubstratabhängigkeit und -art	176

4.3.1.4	Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim mittels Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien	177
4.3.1.5	Hemmstudien	177
4.3.1.5.1	Kaliumcyanid	177
4.3.1.5.2	Hydroxylamin-HCl	179
4.3.1.5.3	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	180
4.3.1.5.4	Cytochrom c	181
4.3.1.5.5	Kohlenmonoxid	182
4.3.1.5.6	Natriumvanadat	183
4.4	DISKUSSION	184
4.5	ZUSAMMENFASSUNG	189
5	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER DRITTEN KOMPONENTE AUS ÄUßEREN MEMBRAN VESIKELN	190
5.1	EINLEITUNG	190
5.1.1	Gewinnung membranständiger Enzyme	190
5.1.2	Bisherige Untersuchungen	190
5.1.3	Zielsetzung	190
5.2	METHODEN	191
5.2.1	Gewinnung der Enzympräparation	191
5.2.1.1	Materialien und Geräte	191
5.2.1.2	Gewinnung der Schweinenierenmitochondrien	191
5.2.1.3	Gewinnung der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien	191
5.2.1.4	Gewinnung der dritten Komponente aus Äußeren Membran Vesikeln von Schweinenierenmitochondrien	191
5.2.1.4.1	Solubilisation	191
5.2.1.4.2	Anionenaustauschchromatographie an DEAE Cellulose	192
5.2.1.4.2.1	Protein-Verlaufskontrolle	192
5.2.1.4.2.2	Cytochrom b_5 -Verlaufskontrolle	193
5.2.1.4.2.3	NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Verlaufskontrolle	193
5.2.1.4.2.4	Monoaminoxidase-Verlaufskontrolle	193
5.2.1.4.2.5	Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Verlaufskontrolle	193
5.2.1.4.2.6	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle ohne zusätzliche Enzyme	193
5.2.1.4.2.7	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase	194
5.2.1.4.2.8	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetztem humanem, rekombinatem Cytochrom b_5	194
5.2.1.4.2.9	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase und zugesetztem humanem, rekombinatem Cytochrom b_5	194
5.2.1.4.2.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	194
5.2.1.4.2.11	<i>nit-1</i> Rekonstitutions-Assay	195
5.2.1.4.2.12	Sulfitoxidase-Verlaufskontrolle	195
5.2.1.4.2.13	FormA Analyse	195

5.2.1.4.2.14	Immunoblot-Analyse	195
5.2.1.5	Cytochrom b ₅	195
5.2.1.6	Gewinnung von NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	196
5.2.2	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparation	196
5.2.2.1	Proteinbestimmung	196
5.2.2.2	Cytochrom b ₅ -Gehaltsbestimmung	196
5.2.2.3	NADH Cytochrom b ₅ Reduktase-Aktivitätsbestimmung	196
5.2.2.4	Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung	197
5.2.2.5	Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung	197
5.2.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	197
5.2.2.7	Massenspektrometrische Analyse	197
5.2.2.8	<i>nit-1</i> Rekonstitutions-Analyse	197
5.2.2.9	Sulfitoxidase-Verlaufskontrolle	197
5.2.2.10	FormA Analyse	198
5.2.2.11	Immunoblot-Analyse	198
5.2.3	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktase	198
5.2.3.1	Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin	198
5.2.3.1.1	Synthese von Benzamidoxim	198
5.2.3.1.2	Inkubationsbedingungen	198
5.2.3.1.3	HPLC-Analytik	199
5.3	ERGEBNISSE	201
5.3.1	Gewinnung der Enzymfraktion	201
5.3.1.1	Solubilisation der Äußeren Membran Vesikel	201
5.3.1.2	Anionenaustauschchromatographie an DEAE Cellulose	201
5.3.1.2.1	Protein-Verlaufskontrolle	201
5.3.1.2.2	Cytochrom b ₅ -Verlaufskontrolle	203
5.3.1.2.3	NADH Cytochrom b ₅ Reduktase-Verlaufskontrolle	204
5.3.1.2.4	Monoaminoxidase-Verlaufskontrolle	205
5.3.1.2.5	Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Verlaufskontrolle	206
5.3.1.2.6	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle ohne zusätzliche Enzyme	206
5.3.1.2.7	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	207
5.3.1.2.8	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetztem humanem, rekombinalem Cytochrom b ₅	208
5.3.1.2.9	Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b ₅ Reduktase und zugesetztem humanem, rekombinalem Cytochrom b ₅	209
5.3.1.2.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	210
5.3.1.2.11	<i>nit-1</i> Rekonstitutions-Assay	211
5.3.1.2.12	Sulfitoxidase-Verlaufskontrolle	213
5.3.1.2.13	FormA Analyse	213
5.3.1.2.14	Immunoblot-Analyse	214
5.3.1.3	Charakterisierung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität der Benzamidoxim-reduzierenden Proteinfraktion	215
5.3.1.4	Massenspektrometrische Analyse	217

5.4	DISKUSSION	220
5.5	ZUSAMMENFASSUNG	228
6	REDUKTION VON BENZAMIDOXIM MIT DEM ZWEI- UND DREIKOMPONENTENSYSTEM	229
6.1	EINLEITUNG	229
6.1.1	Cytochrom b ₅	229
6.1.2	NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	230
6.1.3	Zusammenspiel zwischen Cytochrom b ₅ und NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	232
6.1.4	Molybdänhaltige Enzyme	234
6.1.5	Reduktion <i>N</i> -hydroxylierter Verbindungen mit molybdänhaltigen Enzymen	237
6.1.6	Bisherige Untersuchungen	238
6.1.7	Zielsetzung	239
6.2	METHODEN	240
6.2.1	Gewinnung der Enzympräparationen	240
6.2.1.1	Materialien und Geräte	240
6.2.1.2	Gewinnung von Schweinelebermikrosomen	240
6.2.1.3	Isolierung von Cytochrom b ₅ und NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	241
6.2.1.3.1	Solubilisation	241
6.2.1.3.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie	241
6.2.1.3.3	Gewinnung von Cytochrom b ₅	242
6.2.1.3.4	Gewinnung von NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	242
6.2.1.3.4.1	Präparative HPLC an Fractogel [®] EMD TMAE 650 (S)	242
6.2.1.3.4.2	Bioaffinitätschromatographie an 5'-AMP-Sepharose [®]	242
6.2.1.4	Umpufferung und Detergenzentfernung	243
6.2.2	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparationen	243
6.2.2.1	Proteinbestimmung	243
6.2.2.2	NADH Cytochrom b ₅ -Aktivitätsbestimmung	243
6.2.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	243
6.2.3	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktion durch Cytochrom b ₅ und NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	244
6.2.3.1	Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin	244
6.2.3.1.1	Synthese von Benzamidoxim	244
6.2.3.1.2	Inkubationsbedingungen	244
6.2.3.1.3	HPLC-Analytik	245
6.3	ERGEBNISSE	248
6.3.1	Charakterisierung und Inkubationsoptimierung des Zweikomponentensystems	248
6.3.1.1	Inkubationszeit	248
6.3.1.2	Verhältnisabhängigkeit der zwei Proteine bei konstantem Proteingehalt	249
6.3.1.3	Substratabhängigkeit	250
6.3.2	Charakterisierung und Inkubationsoptimierung des Dreikomponentensystems	251
6.3.2.1	Inkubationszeit	251

6.3.2.2	Verhältnisabhängigkeit der zwei Elektronentransportproteine bei konstantem Proteingehalt sowie konstanter Zugabe des gereinigten Moco-bindenden Enzyms	252
6.3.2.3	pH-Wert	253
6.3.2.4	Substratabhängigkeit	254
6.3.2.5	Cosubstratabhängigkeit	255
6.3.2.6	Verhältnisabhängigkeit des gereinigten Moco-bindenden Enzyms zum konstanten 1:1 Verhältnis der zwei Elektronentransportproteine	256
6.4	DISKUSSION	257
6.5	ZUSAMMENFASSUNG	261
7	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	262
8	MATERIALIEN UND GERÄTE	266
8.1	SUBSTANZEN UND SONSTIGE MATERIALIEN	266
8.2	GERÄTE	268
9	LITERATURVERZEICHNIS	270

1 EINFÜHRUNG

1.1 Biotransformation

1.1.1 Definition und Bedeutung

Die Biotransformation ist ein Vorgang im Stoffwechsel von Lebewesen, bei welchem nicht ausscheidbare Stoffe durch chemische Prozesse in eliminierbare Stoffe umgewandelt werden [Testai, 2001].

Während des Ablaufs des physiologischen Stoffwechsels des Körpers fallen immer wieder Substanzen an, die nicht direkt über den Harn oder die Faeces ausgeschieden werden können. Meist sind diese Stoffe lipophil, d. h. kaum bis gar nicht wasserlöslich.

Darüber hinaus nimmt der Organismus Fremdstoffe (Xenobiotika) mit der Nahrung auf. Diese können Naturstoffe oder vom Menschen synthetisierte Substanzen (hauptsächlich Medikamente, Drogen, Konservierungsmittel, Pestizide, etc.) sein [Mutschler *et al.*, 2001].

Eine Ansammlung dieser Substanzen im Körper kann fatal und letztendlich tödlich sein. Um diese Substanzen in eine eliminierbare Form zu überführen sind viele Gewebe, vor allem die Leber, aber auch Niere, Lunge, Darm, Haut und Milz zur Biotransformation fähig [Mutschler *et al.*, 2001].

Die Biotransformationsreaktionen können in zwei Phasen (Phase I und Phase II) eingeteilt werden. Phase I Reaktionen (Umwandlungsreaktionen) fügen funktionelle Gruppen (z. B. -OH) in unpolare Moleküle ein. In Phase II Reaktionen (Konjugationsreaktionen) werden die Moleküle mit wasserlöslichen Molekülen, wie z. B. Glucuronsäure, Schwefelsäure, Aminosäuren oder Glutathion verbunden und können dann entweder über die Nieren oder über die Galle ausgeschieden werden [Testa, 1995]. Oftmals wird erst durch die Phase I Reaktion die Voraussetzung für eine Phase II Konjugation geschaffen. Sind entsprechende hydrophile Gruppen in der Substanz schon vorhanden, so können Konjugationen auch direkt ablaufen. Durch diese Reaktionen wird in der Regel die Lipophilie der Stoffe deutlich herabgesetzt, so dass sie leichter eliminierbar werden.

Neben solchen Entgiftungsreaktionen (Bioinaktivierung) können aber auch Aktivierungen stattfinden. Man bezeichnet sie als Bioaktivierung, bei Bildung von karzinogenen, zytotoxischen, mutagenen oder teratogenen Metaboliten als Biotoxifizierung oder Giftung [Park *et al.*, 1995].

Die Bioaktivierung kann aber auch als gewünschtes Prinzip genutzt werden. Pharmakologisch zunächst unwirksame Arzneistoffe (Prodrugs) werden durch enzymatische oder nichtenzymatische Reaktionen im Organismus zu therapeutisch wirksamen Metaboliten (Drugs) umgesetzt. 1935 wurde das Prinzip erstmals beschrieben [Tréfouel *et al.*, 1935]. Heute wird diese Form der Bioaktivierung (Prodrug-Prinzip) in der Arzneistoffentwicklung und -therapie häufig ausgenutzt. Hiermit bietet sich die Möglichkeit, die pharmakodynamischen, pharmakokinetischen und toxikologischen Eigenschaften eines Arzneistoffes zu beeinflussen.

An der Biotransformation beteiligte Enzyme zeichnen sich in der Regel durch geringe Substratspezifität aus [Smith und Jones, 1992]. Außerdem können die Enzyme durch Substrate induziert, das heißt vermehrt gebildet werden. Damit bietet der Körper die Möglichkeit, der Kumulation eines Xenobiotikums entgegenzuwirken [Donato *et al.*, 1995]. Für eine Arzneistofftherapie kann sich dieses negativ auswirken. Wird ein Arzneistoff durch ein induzierbares Enzym abgebaut, so kann eine erhöhte Menge an Enzym zu einem beschleunigten Abbau des Arzneistoffes führen. Dieser kann dadurch eventuell seine therapeutische Konzentration nicht vollständig oder gar nicht erreichen.

Zu beachten ist auch die mögliche Interaktion zweier Arzneistoffe. Bei unterschiedlichen Affinitäten der Stoffe zu einem Enzym kann es zur Konkurrenzreaktion kommen, wodurch ein Stoff langsamer abgebaut wird als der andere. Der langsamer abgebaute Stoff kann dadurch im Körper akkumulieren und eventuell zu einem lebensbedrohlichen Zustand führen. Bei gleichzeitiger Gabe des CYP3A4 Inhibitors Ketokonazol und dem Antihistaminikum Terfenadin sind z. B. lebensbedrohliche ventrikuläre Tachyarrhythmien durch den erhöhten Terfenadin-Plasmaspiegel beschrieben worden [Paakkeri, 2002]. Grapefruitsaft ist als Hemmstoff für CYP450 Isoenzyme bekannt geworden, während Bohnen und Broccoli als Induktoren wirken [Guengerich *et al.*, 1994]. Zuletzt sei noch auf genetische Polymorphismen der an Biotransformationen beteiligten Enzyme hingewiesen, die dadurch Einfluss auf pharmakologische und toxikologische Eigenschaften der Arzneistoffe nehmen [Furuta *et al.*, 2005].

1.1.2 Biotransformationsstudien

Pharmaka werden in metabolischen Studien näher untersucht. Die Charakterisierung ihrer Biotransformation gibt Aufschluss über Pharmakokinetik, unerwünschte Wirkungen sowie Toxizität. Hiermit wird man den Forderungen des Gesetzgebers [Arzneimittelgesetz] gerecht, der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines

Arzneimittels durch Studien an Mensch und Tier vorschreibt. Die Entwicklung neuer Arzneistoffe ist sehr teuer. Aus diesem Grunde sind Erkenntnisse über den Metabolismus potentieller Arzneistoffe von großer Wichtigkeit, um frühzeitig Konsequenzen ziehen zu können. Außerdem sind *in vitro* Untersuchungen notwendig, um für *in vivo* Untersuchungen die Voraussetzungen zu schaffen.

Pharmakokinetisches Wissen wird vor allem durch *in vivo* Versuche gewonnen. Allerdings werden in diesem Zuge die Erkenntnisse der gewonnenen Daten unter Umständen sehr komplex. Primär gebildete Metabolite können auch allen pharmakokinetischen Einflüssen wie Verteilung, Speicherung, Proteinbindung und Metabolismus unterliegen [Forth *et al.*, 2002]. Hiermit können sich aber reaktive oder instabile Metabolite sowie nur in geringer Konzentration auftretende oder hohe Eiweißbindung aufweisende Metabolite teilweise oder vollkommen dem Nachweis entziehen. Hinzu kommt noch die ethische Problematik der Tierversuche. Zu bedenken ist weiterhin die Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf den Menschen. Eine Reaktion im Versuchstier muss nicht zwangsläufig auch im Menschen stattfinden oder eine nachgewiesene Unbedenklichkeit im Versuchstier muss nicht unbedingt auf den Menschen übertragbar sein.

In vitro Verfahren können *in vivo* Systemen überlegen sein, wenn gezielt bestimmte metabolische Schritte nachgewiesen werden sollen. Dadurch haben sich in den letzten Jahren *in vitro* Modelle etabliert, die gerade solche metabolische Schritte nachweisen können. Diese Modelle sind darauf ausgelegt, leicht durchzuführen zu sein. Außerdem sind sie in der Regel einfach zu validieren. Einzelne Parameter können gezielt verändert werden, während die Ergebnisse wenig streuen.

Diese *in vitro* Testsysteme können unterschiedlich aufgebaut sein. Perfundierte Organe gehören sicherlich zu den ältesten Testsystemen, werden aber nur noch wenig eingesetzt. Es können komplexe Abläufe in einem Organ untersucht werden, wobei der Einfluss des restlichen Körpers oder anderer Organe dabei nicht betrachtet wird [Lohr *et al.*, 1998]. Organschnitte können gerade bei unterschiedlichen Regionen innerhalb eines Organs Erkenntnisse über die Verteilung von Enzymen bringen. Außerdem stehen subzelluläre Fraktionen wie Mikrosomen, Mitochondrien oder Cytosol ebenso zur Verfügung wie die daraus isolierten Enzyme [Constantino *et al.*, 1999]. Diese subzellulären Fraktionen können nur Auskünfte über die enzymatischen Grundlagen geben. Zuletzt sei noch auf Zelllinien hingewiesen, die eine dauerhaft gleiche Voraussetzung zur Untersuchung bestimmter Parameter mit sich bringen. Je nach Anforderung der zu bestimmenden Untersuchung steht somit eine Vielzahl an *in vitro* Testsystemen zur Verfügung [Testai, 2001].

1.1.3 Enzyme der Biotransformation

In vielen Organen sind fremdstoffmetabolisierende Enzyme zu finden. Hierzu zählen Leber, Niere, Lunge, Gehirn, Haut und Darm [Kuschinsky *et al.*, 1993]. Oral aufgenommene Xenobiotika gelangen über den Magen-Darm-Trakt in den Organismus. Resorbierte Substanzen werden mit dem Pfortaderblut direkt zur Leber geleitet. Hier findet ein erheblicher Teil des Metabolismus statt bevor die Substanzen in den peripheren Kreislauf gelangen. Somit lässt sich leicht verstehen, warum der Leber die größte Bedeutung bezüglich der Biotransformation zugesprochen wird. Am Fremdstoffmetabolismus beteiligte Enzyme zeichnen sich in der Regel durch eine geringe Substratspezifität aus [Testa, 1995]. Im Gegensatz dazu führen die Enzyme des Intermediärstoffwechsels oft nur sehr spezifische Reaktionen durch [Forth *et al.*, 2002].

Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben, wird die Biotransformation in zwei Phasen eingeteilt. Phase I Enzyme lassen sich in lösliche und strukturgebundene Enzyme unterteilen. Bei den strukturgebundenen Enzymen haben die Cytochrom P450 Monooxygenasen die größte Bedeutung [Guengerich, 2001]. Cytochrom P450 Isoenzyme vermitteln vielfältige Reaktionen. Daneben sind flavinhaltige Monooxygenasen [Ziegler, 1988] sowie die NADPH Cytochrom P450 Reduktase [Nebert und Gonzales, 1987] zu nennen. Zu den löslichen Enzymen zählen Alkohol- und Aldehyddehydrogenase, Xanthinoxidase sowie verschiedene Esterasen und Monoaminoxidasen [Beedham, 1997; Testai, 2001].

Als wichtige Reaktionen finden in der Phase I Hydroxylierungsreaktionen [Salva *et al.*, 2003] sowie oxidative Desalkylierungen an Stickstoff-, Schwefel- und Sauerstoffatomen statt [Guengerich, 2001; Obach *et al.*, 2005]. Ferner erfolgen Oxygenierungen an den Heteroatomen Stickstoff und Schwefel [Hlavica, 2002; Furnes und Schlenk, 2004]. Ebenso finden oxidative Desaminierungen statt [Yamada *et al.*, 1997; Obach *et al.*, 2005]. Diese genannten oxidativen Reaktionen spielen im Fremdstoffmetabolismus am Kohlenstoff die Hauptrolle. Im Falle von Stickstoffreaktionen sind Reduktionen *N*-oxygenierter Metabolite, welche durch Cytochrom P450 Isoenzyme [Guengerich, 2001] oder Aldehydoxidasen [Kitamura *et al.*, 1994] vermittelt werden, von großer Bedeutung. Nitroverbindungen werden ebenfalls durch Cytochrom P450 Isoenzyme [Guengerich, 2001] sowie durch Xanthin- und Aldehydoxidase reduziert [Ueda *et al.*, 2005; Dick *et al.*, 2006].

Als Phase II Enzyme sind Methyltransferasen, *N*-Acetyltransferasen, Sulfotransferasen, Glutathion-*S*-Transferasen und Uridindiphosphat-Glucuronyltransferasen zu nennen. Daneben finden Reaktionen mit Aminosäuren (Glycin, L-Glutamin) und *S*-Adenosylmethionin statt [Testai, 2001].

1.2 Metabolismus in der Niere

1.2.1 Einführung

Die physiologische Rolle der Nieren beinhaltet unter anderem Erhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie Synthese, Metabolismus und Exkretion von Hormonen. Außerdem spielt die Niere eine entscheidende Rolle in der Exkretion von Arzneistoffen und anderen Xenobiotika [Lohr *et al.*, 1998].

Mechanismen zum Transport von Arzneistoffen im proximalen Tubulus zum Sekretionsort sind untersucht und bekannt [Bessighir und Roch-Ramel, 1987; Pritchard und Miller, 1993]. Ebenso sind Resorptionsmechanismen für organische Substanzen, insbesondere für Aminosäuren [Silbernagl, 1992] und Cholin [Acara und Rennick, 1973], untersucht worden. Außerdem gibt es pH-abhängige Konzepte über nichtionische passive Rückdiffusion von Arzneistoffen [Roch-Ramel *et al.*, 1992].

Auch wenn die meisten Erkenntnisse über Arzneistoffmetabolismus aus den Studien mit der Leber stammen, so ist doch bekannt, dass die Niere Arzneistoffe, Hormone und weitere Xenobiotika aktiv metabolisiert [Anders, 1980; Bock *et al.*, 1990]. In einigen Fällen sind in der Niere höhere Biotransformationsraten beschrieben als in der Leber, wie zum Beispiel die Glycinbindung der Benzoesäure [Poon und Pang, 1995]. Die höchste Konzentration an Histamin *N*-Methyltransferase [Bowsher *et al.*, 1983] sowie an γ -Glutamyltransferase [Goldbarg *et al.*, 1960] wurde in renalem Gewebe gefunden.

Da es sich bei der Niere um ein in unterschiedliche Zonen aufgeteiltes Organ handelt, ist die Kenntnis vom Aufbau wichtig. Beim Menschen zeigen die Nieren - ähnlich der Form einer Bohne - zwei Pole nach oben und unten, zwei Flächen nach vorne und hinten (ventral und dorsal) und zwei Ränder nach medial und lateral. Ein Querschnitt der Niere ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

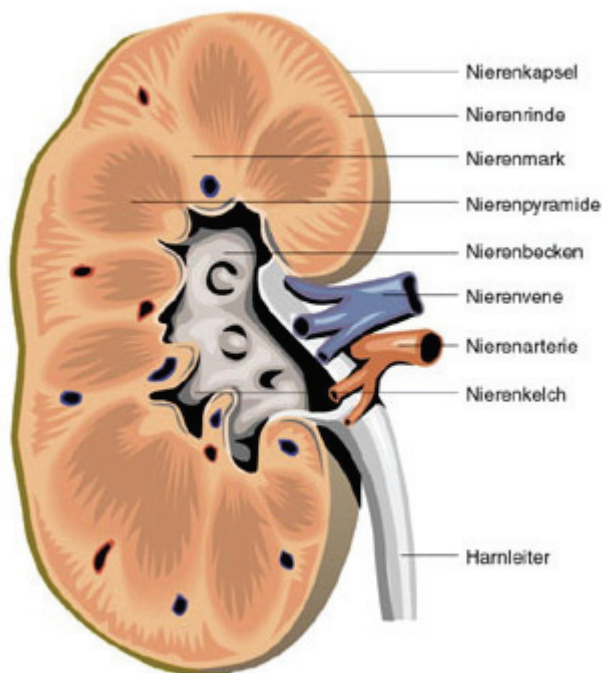


Abb. 1.1: Niere (Querschnitt) (Quelle: <http://www.planet-wissen.de>)

Das Nierenparenchym, die eigentliche Organmasse der Niere, wird in die außen liegende Nierenrinde (*Cortex renalis*) und das nach innen zum *Hilum* (Eintrittsstelle von Blutgefäßen und Nerven) gerichtete Nierenmark (*Medulla renalis*) unterteilt. Das Mark besitzt dabei die Form von Pyramiden (10 bis 12 Markpyramiden pro Niere), die mit ihrer Basis nach außen und mit ihrer Spitze nach innen zum Hilum zeigen. Diese Spitzen, die Papillen, reichen frei in den Hohlraum der Nierenkelche (*Calix renalis*), die sich in variabler Form zum Nierenbecken (*Pelvis renalis*) zusammenschließen, aus dem der Ureter hervorgeht. In dieser Anordnung fließt der Urin aus den Papillen in Richtung Ureter.

Die Nierenrinde liegt wie eine Kappe zwischen den Basen der Markpyramiden und der Organkapsel (subkapsulärer Anteil), erreicht aber zwischen den Pyramiden in säulenförmigen Abschnitten (*Columnae renales*) den *Sinus renalis* (Nierenbecken und Fettgewebe). Der subkapsuläre Anteil der Rinde wird von gut sichtbaren, feinen Strichen, den Markstrahlen (*Radii medullares*) durchzogen, die radiär aus den Markpyramiden in Richtung der Organkapsel ausstrahlen und Teil des Marks sind. Im Mark selbst lassen sich durch ihre leicht unterschiedliche Farbe ein äußeres Mark, bestehend aus einem Außen- und einem Innenstreifen, und ein zum Nierenbecken gelegenes inneres Mark unterscheiden.

Bei den einzelnen Säugetieren ist die Niere unterschiedlich aufgebaut. In der einfachsten Form besteht die Niere aus einzelnen, kegelförmigen Nierenlappen (*Lobi renales*). Diese mehrlappige Niere ist typisch für Meeressäugetiere und Bären. Jeder Nierenlappen besteht aus einer Rindenkappe und einer Markpyramide, die in einer Nierenpapille (*Papilla renalis*, das spitze Ende des Kegels) endet. Bei den meisten Säugetieren verschmelzen diese Nierenlappen (beim Menschen 6 Lappen) in unterschiedlichem Ausmaß. Die verschmelzenden Rindenkappen bilden die Nierenrinde, die Pyramiden das Nierenmark. Bei Rindern verschmelzen nur die Mittelteile der einzelnen Nierenlappen, wodurch an der Oberfläche Furchen entstehen und die Nierenpapillen ebenfalls erhalten bleiben. Diese Bauform nennt man mehrwarziggefurchte Niere. Diese Form tritt zwischenzeitlich auch in der fetalen Entwicklung der Niere bei den Säugetieren auf, die durch weitere Verschmelzungsvorgänge gekennzeichnet ist. Auch das menschliche Neugeborene besitzt noch eine mehrwarziggefurchte Niere. Bei Primaten (einschl. Mensch) und Schweinen verschmelzen die Rindenanteile nach der Geburt vollständig, so dass die Organoberfläche glatt erscheint. Die einzelnen Papillen bleiben jedoch erhalten. Man spricht von einer mehrwarzigglatten Niere. Bei den meisten Säugetieren verschmelzen nun auch die einzelnen Nierenpapillen zu einer Nierenleiste (*Crista renalis*), so dass man von einer einwarzigglatten Niere spricht [Netter, 1983].

Zur Untersuchung des Metabolismus in der Niere gibt es viele unterschiedliche Möglichkeiten. Es gibt *in vivo* Techniken wie die renale Clearance sowie *in vitro* Studien mit Zellorganellen wie Mitochondrien und Mikrosomen. Außerdem identifiziert die Molekularbiologie spezifische, für den Metabolismus verantwortliche, Enzyme durch Genkodierung. Jede Technik steuert unterschiedliche Informationen bei.

Historisch gesehen ist die Messung der renalen Clearance die älteste Untersuchungsmethode [Moller *et al.*, 1928]. Die Clearance wird dabei als das Plasmavolumen definiert, welches pro Minute komplett von einer Substanz befreit wird. Diese Definition ist allerdings nicht als eindeutig anzusehen, denn es wird weder geklärt, wo die Substanz verbleibt, noch auf welchem Wege dies geschieht. Metabolismus und Resorption sind in dieser Definition nicht berücksichtigt [Acara, 1992]. Die ersten *in vivo* Untersuchungen zur Quantifizierung der renalen Clearance fanden Ende der Siebziger Jahre statt und waren damit gleichzeitig die ersten Metabolismusstudien [Toretti und Weiner, 1976; Tucker, 1981]. Metabolismus wurde dabei insofern untersucht, als zunächst eine radioaktivmarkierte Substanz per Infusion gegeben wurden. Anschließend wurde im Urin die Ausscheidung der Ausgangssubstanz detektiert. Dabei wurden auch andere radioaktivmarkierte

Metabolite gefunden, welche aber nicht näher untersucht wurden. [Quebbemann und Rennick, 1969; Acara und Rennick, 1972].

Neben der Messung der Clearance werden sehr häufig Gewebepräparationen zur Untersuchung des Metabolismus angewandt. Seit Jahrzehnten werden dafür Nierenschnitte verwendet. Dazu werden Nieren direkt nach der Entnahme gekühlt gehalten und in kleine Stücke geschnitten. Die Stücke müssen sehr dünn sein, so dass Luftsauerstoff alle Zellen während einer Inkubation erreichen kann. Sie können bis zu zwei Stunden inkubiert werden. Hinterher werden die gebildeten Metabolite aus den Stücken gewonnen. Dadurch konnten sehr spezifische Aktivitäten von Enzymen im Rindengewebe sowie im äußeren und inneren Mark untersucht werden. Damit konnte Cholindehydrogenase-Aktivitätszunahme während einer Hypernatriämie in der Nierenrinde festgestellt werden, während die Aktivität im Nierenmark unverändert blieb [Grossman und Hebert, 1989].

Außer den Nierenstückchen finden isolierte Tubuli [Schlondorff, 1986] und Zellkulturen ihre Anwendung [Fry *et al.*, 1978].

Subzelluläre Fraktionen wie Mikrosomen und Mitochondrien werden durch Homogenisierung des Gewebes und anschließender Zentrifugation erhalten [Kapitel 2.2.1.2 und 3.2.1.2]. Durch Zugabe von Substraten zu den Organellen kann in Inkubationen die Bildung von Metaboliten studiert werden.

1.2.2 Renale Biotransformationswege

1.2.2.1 Phase I

1.2.2.1.1 Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen

Eine genaue Beschreibung des Cytochrom P450-Enzymsystems ist in Kapitel 2.1.1 dargestellt. An dieser Stelle soll die Bedeutung der Niere für die Biotransformation sowie bisherige Studien dargelegt werden.

Das Cytochrom P450 Enzymsystem ist, ähnlich wie in der Leber, wohl das am meisten untersuchte System in der Niere [Lohr *et al.*, 1998]. Seit Beginn der Sechziger Jahre finden Untersuchungen zum Cytochrom P450 Enzymsystem in der Niere statt [Anders, 1980]. Dabei ist der renale Beitrag der Monooxygenasen zum Metabolismus bis auf die Hydroxylierung von Fettsäuren deutlich niedriger als in der Leber [Oliw, 1994]. Es wurden Isoenzyme unterschiedlicher Familien gefunden: CYP1A1, CYP1A2 [Ioannides und Parke, 1990], Isoenzyme der Familien CYP2 und CYP4 [Gonzalez, 1988]. In 80 % der untersuchten humanen Nieren ist auch das Enzym CYP3A4 gefunden worden [Parkinson, 1996].

Lokalisiert sind die Cytochrom P450 Isoenzyme hauptsächlich in der Nierenrinde, im äußeren Mark dagegen kaum. Ein erhöhtes Vorkommen weisen sie dagegen im inneren Mark auf [Zenser *et al.*, 1978]. Im isolierten Tubulussystem konnten die höchsten Cytochrom P450 Konzentrationen im proximalen Tubulus gefunden werden [Cojocel *et al.*, 1983]. Mikrosomale NADPH Cytochrom c Reduktase-Aktivität wurde von der Rinde zum inneren Nierenmark in abnehmender Konzentration gefunden [Endou, 1983].

Es sind sehr viele Untersuchungen zur Induktion von Cytochrom P450 Isoenzymen in der Niere durchgeführt worden. Das Analgetikum Paracetamol führt zu einer Erhöhung von CYP2E1 [Hoivik *et al.*, 1995]. Phenobarbital induziert gleich mehrere Isoenzyme: CYP1A1 und CYP1A2 [Ioannides und Parke, 1990], mehrere Enzyme der CYP2B Familie sowie CYP4B1 [Ryan *et al.*, 1993]. Das in der Chemotherapie eingesetzte Cisplatin induziert im Speziellen das renale CYP2C23 [Ohishi *et al.*, 1994]. Ethanol induziert sehr selektiv CYP2E1 [Ueng *et al.*, 1987]. Das immunsuppressiv wirksame Cyclosporin A führt im Gegensatz zur Leber in der Niere zu einer Erhöhung des Cytochrom P450 Gehaltes [Mayer *et al.*, 1989].

In der Niere sind die typischen Cytochrom P450 Reaktionen gefunden worden. Aromatische Oxidierung wurde durch die Hydroxylierung von Phenobarbital nachgewiesen [Smith *et al.*, 1986; Mayer *et al.*, 1989]. Mit Aminopyrin wurde die *N*-Desalkylierung gezeigt [Litterst *et al.*, 1975; Orrenius *et al.*, 1973]. *O*-Desalkylierung wurde mit 7-Ethoxycoumarin nachgewiesen. Hierbei konnte in einem rekonstituierten System die Reaktion mit dem CYP2C23 durchgeführt werden [Imaoka *et al.*, 1990]. In geringem Maße wird auch eine oxidative Deshalogenierung beobachtet. Renale Mikrosomen metabolisieren Dichlormethan, im Vergleich zur Leber allerdings nur mit einer Rate von etwa fünf Prozent [Kubic und Anders, 1975]. Ergänzend ist in der Niere ein Cytochrom P450 induzierter Metabolismus festgestellt worden, der nicht auf Arzneistoffe zurückzuführen ist, sondern endogenen Substraten, Hormonen, Toxinen und metabolischen Krankheiten zuzusprechen ist. Monooxygenasen spielen eine Rolle im Fettsäure- und Steroidmetabolismus der Leber. Doch auch die Niere scheint hierfür entsprechende Gene zu exprimieren. So konnte die CYP3A Unterfamilie, welche für die 6-Hydroxylierung von endogenen Steroiden verantwortlich ist, nachgewiesen werden [Schuetz *et al.*, 1992]. Schon frühzeitig wurden zwei Pfade für den Arachidonsäuremetabolismus in der Niere gefunden. Der eine beschreitet den Prostaglandin Cyclooxygenase Weg, der andere hingegen ist in das NADPH abhängige P450 System involviert [Zenser *et al.*, 1979]. Eine erhöhte Expression der CYP4A Unterfamilie, welche in der Arachidonsäure Oxygenase-Aktivität eine Rolle spielt, korreliert mit Hypertonie [Makita *et al.*, 1996]. Ebenso konnte die CYP2A Unterfamilie, die für die Arachidonsäure Epoxygenase

zuständig ist, mit einem krankhaften Zustand der Niere in Verbindung gebracht werden [Makita *et al.*, 1996]. Neben den endogenen Substraten führen auch Toxine zu erhöhter Expression verschiedener Cytochrom P450 Isoenzyme. Xylen führt zu einer Erhöhung von Cytochrom P450 Isoenzymen [Toftgard und Nilsen, 1982], während das polychlorierte Biphenylderivat Aroclor 1254 selektiv CYP1A2 [Beebe *et al.*, 1995] und das Pestizid Fenarimol CYP1A1 induziert [Paolini *et al.*, 1996]. Auch konnte in der Niere eine erhöhte Expression von Cytochrom P450 Enzymen, welche am Sexualhormonmetabolismus beteiligt sind, festgestellt werden [Hu *et al.*, 1993]. Dieses gilt sowohl für männliche Rattennieren, welche z. B. nach Behandlung mit dem Lipidsenker Clofibrat vermehrt CYP4A2 bilden [Sundseth und Waxman, 1992], als auch für weibliche Rattennieren, welche durch Phenobarbital deutlich mehr CYP2A exprimieren [Pelkonen *et al.*, 1994]. Schließlich können Krankheiten zu einer Veränderung des Cytochrom P450 Spiegels in der Niere führen. In einer überfetteten Niere wurden pro Gramm Gewebe etwa 50 % mehr an Cytochrom P450 Gehalt gefunden als im Normalzustand [Corcoran und Salzar, 1988]. Hingegen führt Hungern ebenfalls zu einer Erhöhung des Cytochrom P450 Spiegels [Hasumura *et al.*, 1983]. Streptozotizin führt zu Zellschäden an den insulinproduzierenden Inselzellen der Bauchspeicheldrüse. Mit Streptozotizin vorbehandelte Versuchstiere haben einen um 50 % reduzierten Cytochrom P450 Gehalt als entsprechende Vergleichstiere [Del Villar *et al.*, 1995].

1.2.2.1.2 Flavinhaltige Monooxygenasen

Flavinhaltige Monooxygenasen oxidieren nucleophile stickstoff-, schwefel- und phosphorhaltige funktionelle Gruppen. Hierfür benötigen sie NADPH und Sauerstoff und katalysieren dabei zum Teil gleiche Reaktionen wie die Cytochrom P450 Enzyme. Fünf verschiedene flavinhaltige Monooxygenasen wurden bisher geklont und sequenziert. Jedes dieser Gene wird in einer art- und gewebespezifischen Menge exprimiert. Vor allem die flavinhaltigen Monooxygenasen 1 und 3 sind in der Niere zu finden [Dolphin *et al.*, 1991].

N-Oxide sind die häufigsten Metabolite basischer Arzneistoffe, die durch die flavinhaltigen Monooxygenasen gebildet werden. So werden die *N*-Oxide von Trimethylamin [Acara *et al.*, 1973], dem Opiat Meperidin (Pethidin) [Acara *et al.*, 1981], dem Serotonin Antagonisten Tropicsetron [Vickers *et al.*, 1996] sowie dem trizyklischen Antidepressivum Imipramin [Lemoine *et al.*, 1990] durch Enzymquellen aus der Niere gebildet.

1.2.2.1.3 Alkoholoxidation

Alkohol wird normalerweise für die Elimination zum Aldehyd und anschließend zur Carbonsäure oxidiert. Alternativ können Alkohole direkt an Glucuronsäure konjugiert werden. Auch wenn etwa 90 % des Ethanolmetabolismus in der Leber stattfinden, so sind die Enzyme ubiquitär vorhanden und der renale Metabolismus spielt hierbei eine Rolle.

Die Alkoholdehydrogenase ist ein cytoplasmatisches, NAD^+ abhängiges Zink Metalloenzym, welches die Oxidation von Alkohol zum Aldehyd katalysiert. Die Alkoholdehydrogenase Isoenzyme werden in fünf verschiedene Klassen geteilt. Diese unterscheiden sich in ihrer Sensitivität für eine Hemmung durch Pyrazole sowie ihrer Michaelis-Menten-Kinetik für Ethanol [Yasunami *et al.*, 1991]. Vor allem die Alkoholdehydrogenasen 1 und 2 wurden in der Niere gefunden [Holmes *et al.*, 1986], wobei die Aktivität etwa einem Drittel der Aktivität der Leber entspricht.

Alkoholdehydrogenasen wurden in Nierenrinde und -mark gefunden [Qulali *et al.*, 1991]. Estradiol wurde als selektiver Induktor für die Alkoholdehydrogenasen in der Niere entdeckt, während der Enzymspiegel in der Leber konstant blieb [Qulali *et al.*, 1993].

1.2.2.1.4 Aldehydoxidation

Aldehyde treten normalerweise als Intermediate in vielen Reaktionen auf. Der mit Abstand am häufigsten auftretende Aldehyd ist Acetaldehyd im Metabolismus des Ethanols. Außerdem entstehen Aldehyde im biogenen Aminstoffwechsel, Aminosäuremetabolismus sowie bei der Peroxidation von vielfach ungesättigten Fettsäuren [Ambroziak und Pietruszko, 1993].

Aldehyde werden durch unterschiedliche Enzyme zu ihren korrespondierenden Carbonsäuren oxidiert. Verantwortlich hierfür sind meistens Aldehyddehydrogenase, Aldehydoxidase und Xanthinoxidase. Aldehydoxidase-Aktivität wurde in der Niere erstmals 1966 beschrieben [Deitrich, 1966]. Die Aktivität liegt in der Niere bei etwa 20-80 % im Vergleich zur Leber [Deitrich, 1966; Dipple und Crabb, 1993].

Aldehyddehydrogenasen werden in drei Klassen geteilt. Hierbei tritt nur die Klasse II in der Niere auf [Agarwal *et al.*, 1989; Dipple und Crabb, 1993]. Es handelt sich bei dieser Klasse um mitochondriale Enzyme. Sie zeigen einen niedrigen K_m -Wert für Acetaldehyd und haben ihren Schwerpunkt im aliphatischen sowie biogenen Aminmetabolismus.

1.2.2.1.5 Monoaminoxidase

Monoaminoxidasen katalysieren den oxidativen Metabolismus von Aminen. Die Monoaminoxidasen sind auf der äußeren Membran von Mitochondrien lokalisiert. In der katalysierten Reaktion wird das Substrat oxidiert und gleichzeitig das zugehörige Flavinadeninucleotid reduziert. In einer zweiten Reaktion findet eine Rückoxidation mit Sauerstoff statt, wobei Aldehyd und Wasserstoffperoxid gebildet wird [Weyler *et al.*, 1990].

Es sind die zwei Isoformen A und B der Monoaminoxidase bekannt. Sie sind nicht ausschließlich auf endogene Amine fixiert, sondern oxidieren auch aliphatische, aromatische, primäre, sekundäre und tertiäre exogene Amine. Die beiden Isoformen konnten durch selektive Hemmung erkannt werden [Johnston, 1968; Knoll und Magyar, 1972]. Die beiden Formen können immunologisch [Denney *et al.*, 1983] sowie durch die Sequenzierung der DNA [Bach *et al.*, 1988] unterschieden werden. Beide Isoformen sind in der Niere in sehr hohen Konzentrationen vorhanden, was für den Metabolismus filtrierter Amine sehr wichtig ist [Fernandes und Soares-da-Silva, 1990].

1.2.2.1.6 Aldehyd- und Ketonreduktion

Aldehyde und Ketone sind weit verbreitet und haben verschiedene biologische Funktionen. Neben den Aldehyddehydrogenasen finden sich mehrere Enzyme, die unter dem Begriff Aldo-Ketoreduktasen zusammengefasst werden und am Metabolismus von Aldehyden und Ketonen in der Niere teilhaben. Aldosereduktase, Aldehydreduktase und Carbonylreduktase gehören zu den Aldo-Ketoreduktasen, kommen in sehr hohen Konzentrationen in der Niere vor und reduzieren Aldehyde und Ketone zu ihren korrespondierenden Alkoholen.

Die Aldosereduktase metabolisiert nur endogene Stoffe, so dass sie für den Fremdstoffmetabolismus nicht von Interesse ist.

Die Aldehydreduktasen gehören zu den NADPH-abhängigen Reduktasen, welche am Metabolismus verschiedener Carbonylfunktionen beteiligt sind [Bohren *et al.*, 1989]. Die Enzyme reduzieren viele Xenobiotika und haben in der Niere die höchste Aktivität [Bosron und Prairie, 1973].

Die Ketonreduktase reduziert viele aromatische, azyklische und ungesättigte Ketone zu freien oder konjugierten Alkoholen. Die besten Substrate stellen dabei Chinone dar [Wermuth *et al.*, 1986].

1.2.2.1.7 Hydrolytische Mechanismen

Carboxylesterasen und -amidasen katalysieren die Hydrolyse von Carbonsäureestern, -amiden und -thioestern [Heymann, 1980]. Das Spektrum der zu detoxifizierenden Substanzen reicht von Organophosphaten und Carbamaten über Herbizide (Ester von Phenoxysäuren) bis zu den Arzneistoffen Procain, Lidocain oder Acetylsalicylsäure, um nur einige zu nennen. Fast ausschließlich fanden bisher hierzu Untersuchungen in der Leber statt.

Die Aktivität der Esterasen in der Niere beträgt etwa 10 % im Vergleich zur Leber [Ecobichon, 1972]. Esterasen sind sowohl in Mikrosomen [Yan *et al.*, 1994] als auch in Mitochondrien [Nicot *et al.*, 1984] gefunden worden.

1.2.2.2 Phase II

1.2.2.2.1 Glucuronidierung

Einer der Hauptwege zur Inaktivierung und Elimination von Xenobiotika, aber auch von endogenen Stoffen, ist die Konjugation mit Uridindiphosphat-Glucuronsäure. Die Reaktion wird durch die Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase katalysiert. In der Regel entstehen dabei polare und biologisch weniger aktive Substanzen. Durch die erhöhte Polarität wird die Exkretion in Galle und Urin erleichtert [Siest *et al.*, 1987]. Viele funktionelle Gruppen wie Alkohole, Carbonsäuren, Thioalkohole oder Phenole können glucuronidiert werden, auch *N*-Glucuronide wurden gefunden. Auch wenn die Annahme, dass viele Phase II Metabolite schnell ausgeschieden werden, richtig ist, stimmt sie für reaktive Acyl-Glucuronide nicht [Spahn-Langguth und Benet, 1992]. Viele nichtsteroidale, antiinflammatorische Arzneimittel der Aryl-Alkyl-Klasse sind aufgrund von Nephritis und akutem renalen Versagen vom Markt genommen worden. Die Bildung der Acyl-Glucuronide wird dabei als ein wesentlicher Grund für die hohe Toxizität angesehen. Die gebildeten Acyl-Glucuronide agieren dabei als Elektrophile und können mit Sulfhydryl- und Hydroxylgruppen anderer Zellmoleküle interagieren [Spahn-Langguth und Benet, 1992].

Die Konzentration von Uridindiphosphat-Glucuronsäure ist in der Niere wesentlich geringer als in der Leber [Wong, 1977; Cappiello *et al.*, 1991]. Die renale Clearance von Glucuroniden ist in vielen Spezies untersucht worden. Dabei wurde festgestellt, dass die Glucuronid-Konjugate aktiv tubulär ausgeschieden werden [Quebbemann und Rennick, 1969]. Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase-Aktivität konnte in Mikrosomen gezeigt werden [Sutherland *et al.*, 1993]. Es wurde festgestellt, dass die

Verteilung der Isoenzyme speziesabhängig ist [Koster *et al.*, 1986; el Mouelhi *et al.*, 1993].

Es sind mittlerweile unzählig viele Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen entdeckt worden, so dass man sie als Superfamilie bezeichnet. Eine Einteilung wurde von einem Nomenklatur Komitee entwickelt [Mackenzie *et al.*, 1997].

Für eine Vielzahl von Arzneistoffen konnte die Glucuronidierung in der Niere nachgewiesen werden. Die Glucuronidierungsraten der Substrate sind im Vergleich zur Leber teilweise ähnlich, zum Teil aber auch sehr viel niedriger. Eine Vergleichbarkeit ist somit kaum gegeben [Rush und Hook, 1984]. Zudem ist die Rekonstitution der Mikrosomen anders, da zugesetzte Phospholipide unterschiedlichen Einfluss auf die Glucuronidierung in Leber oder Niere haben [Yokota *et al.*, 1991].

Lokalisiert sind die Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen vor allem in der Nierenrinde [Rush und Hook, 1984] und dort im Lumen des endoplasmatischen Retikulums [Mulder, 1992] und haben ihre höchste Aktivität in Zellen des proximalen Tubulus [Hjelle *et al.*, 1986]. Sie gehören zu den membrangebundenen Enzymen.

1.2.2.2.2 Sulfatierung

Xenobiotische Alkohole, Phenole, Amine und Thiole können durch Biotransformation mit Sulfat konjugiert werden. Weiterhin spielt diese Konjugation im Metabolismus von endogenen Komponenten wie Neurotransmittern und Steroidhormonen eine Rolle. Das Resultat ist in der Regel eine weniger aktive, polarere Verbindung, die vor allem renal eliminiert wird [Lohr *et al.*, 1998].

Anorganisches Sulfat ist zu reaktionsträge und muss zunächst in Adenosin-5'-phosphosulfat konvertiert werden, welches dann in die aktivierte Form 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat umgewandelt wird. Für den ersten Schritt ist die Adenosintriphosphat-Sulfurase zuständig, für den zweiten die Adenosin-5'-phosphosulfat-Phosphokinase. Beide Enzyme kommen cytosolisch vor. Die Aktivierung ist in allen bisher untersuchten Säugetieren nachgewiesen worden. Wenn auch die höchste Konzentration der Enzyme bisher in der Leber beschrieben ist [Hazelton *et al.*, 1985], so findet man doch auch relativ hohe Konzentrationen in Nierenzellen, wobei der Gehalt in der Nierenrinde den des Nierenmarks überwiegt [Hjelle *et al.*, 1986].

Nach der Aktivierung überträgt dann eine Sulfotransferase das Sulfat auf das Akzeptormolekül.

Sulfotransferasen bilden eine Familie löslicher Enzyme mit unterschiedlicher Substratspezifikaion, wie Phenol-Sulfotransferase, Alkohol-Sulfotransferase oder Arylsulfat-Sulfotransferase. Sie wurden schon aus verschiedenen Geweben isoliert [Mulder und Jakoby, 1990]. Ihre Aminosäuresequenzen wurden dabei allerdings nicht identifiziert.

Die Sulfatkonjugation wird durch die vorhandene Sulfatkonzentration, die Verfügbarkeit von anorganischem Sulfat und die Synthese von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat reguliert. Ein Studie zur Sulfat-Konjugation an 7-Hydroxycoumarin mit isolierten Nierenzellen hat ergeben, dass anorganisches Sulfat das effektivste Substrat zur Bildung von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat ist. In geringerem Maße sind auch Cystein, *N*-Acetylcystein und Glutathion einsetzbar [Dawson *et al.*, 1983].

Es lassen sich bisher nur wenige Untersuchungen zur renalen Sulfatkonjugation finden. Die Bindung an Sulfat spielt in der Niere, und genauso auch in der Leber, im Gegensatz zur Glucuronidierung offenbar nur eine untergeordnete Rolle.

1.2.2.2.3 Methylierung

Methylierungsreaktionen sind primär im Metabolismus kleiner endogener Stoffe wie Dopamin, Histamin oder Epinephrin involviert; sie spielen aber auch eine Rolle bei der Biotransformation von Aminosäuren sowie verschiedener Arzneistoffe. Im Gegensatz zu den meisten anderen Konjugationsreaktionen entstehen bei der Methylierung weniger polare Substanzen, welche damit meist weniger schnell aus dem Körper ausgeschieden werden. *N*-, *O*- und *S*-Methyltransferasen sind in der Niere vorhanden. Der Cofaktor *S*-Adenosylmethionin wird als Methyl-Donor bei den Reaktionen benötigt und aus Adenosintriphosphat und L-Methionin gebildet. Er ist in vielen Geweben vorhanden [Eloranta, 1977]. Die Umsatzrate der Niere ist etwa ein Drittel geringer als in der Leber.

Im Arzneistoffmetabolismus der Niere spielen drei *N*-Methyltransferasen eine Rolle. Die Histamin *N*-Methyltransferase ist ein cytoplasmatisches Enzym und benötigt *S*-Adenosylmethionin als Methyl-Donor sowie Histamin bzw. Analoga, die an den Positionen 1, 2 und 3 unsubstituiert sind, als Methyl-Akzeptor. Eine große Anzahl von Inhibitoren, wie die H1- und H2-Rezeptor-Antagonisten, Diuretika und lokale Anästhetika sind bekannt [Tachibana *et al.*, 1988]. Die *N*-Methyltransferase-Konzentration hat in der Niere die höchste Konzentration [Bowsher *et al.*, 1983]. Auch in der Nierenarterie wurde eine hohe Konzentration dieses Enzyms gefunden,

so dass schon frühzeitig daraus geschlossen wurde, dass die Niere die Exkretion von Histamin regelt [Lindell und Schayer, 1958; Snyder und Axelrod, 1965].

Als weiteres Enzym wurde die Phenylethanolamin *N*-Methyltransferase gefunden. Sie ist in den Glomeruli, in den Endothelzellen und im distalen Tubulus lokalisiert [Kennedy *et al.*, 1995]. Dieses Enzym arbeitet sehr spezifisch, da es als Methyl-Akzeptoren nur Phenylethanolamine akzeptiert.

Die dritte gefundene *N*-Methyltransferase katalysiert den Transfer einer Methylgruppe von *S*-Adenosylmethionin auf die Aminogruppe von Indolaminen [Axelrod, 1962; Kennedy *et al.*, 1995].

Die *O*-Methylierung von phenolischen Gruppen ist wichtig im Metabolismus von Neurotransmittern. Da hauptsächlich Catecholamine die Akzeptormoleküle bilden, wird das Enzym Catecholamin *O*-Methyltransferase genannt. Es gibt sie sowohl cytosolisch als auch membrangebunden. Die Eigenschaften sind ähnlich, da beide *S*-Adenosylmethionin als Methyl-Donor und zur Aktivität Magnesium-Ionen benötigen. Die beiden Formen unterscheiden sich lediglich im N-Terminus der Struktur [Tenhunen und Ulmanen, 1993]. Als Substrate sind bisher Catecholamine, Aminosäuren wie L-Dopa sowie diverse Alkaloide und Steroide gefunden worden [Thakker und Creveling, 1990]. Die Aktivität ist im Vergleich zur Leber etwas geringer [Weinshilboum, 1978; Weinshilboum *et al.* 1979].

Die *S*-Methylierung ist für den Metabolismus vieler sulfhydrylhaltiger Arzneistoffe wie Captopril, Azathioprin oder 6-Mercaptopurin wichtig. Für die Detoxifizierung von giftigen Thiolen sind Thiolumethyltransferasen entscheidend. Die Thiole werden generell als Sulfoxide oder Sulfone ausgeschieden. Ein weiterer wichtiger Stoffwechselweg ist der Thiomethylkreislauf. Der Kreislauf startet mit der Addition von Glutathion und anschließender Umformung zum Cystein-Konjugat. Dieses Konjugat wird durch die Cystein-Konjugat β -Lyase zu Pyruvat, Ammoniak und Thiol gespalten. Dieses Thiol wird dann methyliert. Die Cystein-Konjugate werden während der Mercaptursäure-Synthese (Kap. 1.2.2.2.6) ebenfalls gebildet. Hier werden sie aber eher *N*-acetyliert als methyliert [Stevens und Bakke, 1990].

Es gibt drei Enzyme mit unterschiedlichen Charakteristika, die in die *S*-Methylierung involviert sind: Die mikrosomale Thiol-Methyl-Transferase, die cytosolische Thioether-*S*-Methyltransferase und die lösliche Thiopurin-Methyltransferase. Alle drei Enzyme wurden in der Niere gefunden und benötigen *S*-Adenosylmethionin als Cofaktor.

Für die Thioether-*S*-Methyltransferase wurde die Methylierung von Selen, Tellur und Thioethern beschrieben, um sie in wasserlöslichere Ionen umzuwandeln. Hierdurch wird die renale Exkretion möglich [Mozier und Hoffmann, 1990]. Die Aktivität liegt im

Vergleich zur Leber bei einem Drittel [Mozier und Hoffmann, 1990; Pacifici *et al.*, 1991].

Die Thiopurin-Methyltransferase ist ein cytoplasmatisches Enzym, welches die *S*-Methylierung von aromatischen und heterocyclischen Sulfhydrylverbindungen katalysiert. Die Aktivität ist höher als in der Leber [Remy, 1963]. Zwei Isoenzyme dieser Transferase sind gereinigt worden [Van Loon und Weinshilboum, 1990; Van Loon *et al.*, 1992].

1.2.2.2.4 Acetylierung

Xenobiotika, die acetyliert werden, sind entweder Arylamine oder Hydrazide. Die Acetylierung tritt z. B. auf bei Isoniazid, *p*-Aminobenzoesäure, Hydralazin, Procainamid, Aminofluoren und Benzidin [Weber und Glowinski, 1980]. *N*-Acetylierung von Cystein-*S*-Konjugaten ist der finale Schritt in der Mercaptursäure-Synthese. Sie wird in Kapitel 1.2.2.2.6 näher erläutert. Die Übertragung des Acetylrestes auf die Hydroxylgruppe des Cholins und der Sulfhydrylgruppe des Coenzym A sind Beispiele endogener Acetylierungen. Bei Xenobiotika ist die Acetylierung der genannten Gruppen sehr selten. Die Übertragung des Acetylrestes wird durch die *N*-Acetyltransferase katalysiert. Im ersten Schritt findet eine Übertragung der Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A zu einem Acetyl-Enzym-Komplex statt. Im zweiten Schritt folgt dann die Acetylierung des Arylamins unter Regeneration des Substrates. Stoffe wie Iodacetat oder *p*-Chlormercuribenzoat sind irreversible Inhibitoren, wohingegen strukturähnliche Stoffe wie das Salicylamid reversible Inhibitoren darstellen.

Es sind zwei Isoformen der *N*-Acetyltransferase gefunden worden [Blum *et al.*, 1990], die unabhängig voneinander exprimiert werden.

Vor etwa 50 Jahren wurde eine Variabilität der Acetylierung im menschlichen Arzneistoffmetabolismus entdeckt. Die Menschen wurden fortan als Schnell- oder Langsamacetylierer definiert. Gemessen wurde die Acetylierung im Blut nach Gabe von Isoniazid. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen genetischen Polymorphismus handelt [Hein *et al.*, 1987a, b]. Die *N*-Acetyltransferase 2 ist hierfür verantwortlich. Doch auch die *N*-Acetyltransferase 1 scheint einen Polymorphismus aufzuweisen, der aber nicht so bedeutend ist. Dieser äußert sich in der Acetylierung von *p*-Aminobenzoat und *p*-Aminosalicylat [Vatsis und Weber, 1994].

Die Aktivität der *N*-Acetyltransferase in der Niere beträgt etwa ein Drittel im Vergleich zur Leber. Hierbei konnte zwischen der Nierenrinde und dem -mark kein Unterschied in der Aktivität der *N*-Acetyltransferase festgestellt werden [Pacifici *et al.*, 1986].

1.2.2.2.5 Glutathion-Konjugation

Glutathion wird aus den Aminosäuren Glycin, L-Cystein und L-Glutaminsäure synthetisiert. Der Gehalt in der Niere ist niedriger als in der Leber. Konzentrationsunterschiede können innerhalb der Niere festgestellt werden. Der Gehalt in der Nierenrinde ist höher als der im Mark [Mohandas *et al.*, 1984]. Gefunden wurde Glutathion im Cytosol, in den Mitochondrien sowie in den Zellkernen.

Im Blut korreliert die vorhandene Glutathionkonzentration mit der der Leber [Anderson und Meister, 1980]. Fast das gesamte gefilterte Glutathion wird vom Lumen des proximalen Tubulus rückresorbiert.

Glutathion-Konjugation findet zwischen der Thiolgruppe des Glutathions und einer elektrophilen Komponente statt. Normalerweise bedeutet dieser Prozess Detoxifizierung und Exkretion. Er kann aber auch bei der Biosynthese endogener Substanzen eine Rolle spielen wie zum Beispiel bei der Bildung von Leukotrien C₄.

Die Übertragung von Glutathion auf die elektrophile Komponente, welche Epoxide, Halogenalkane, Nitroalkane, Alkene und aromatische Halogen- und Nitrogruppen mit einschließt, findet durch die Glutathion *S*-Transferase Familie statt. Es wurden *in vivo* viele verschiedene Typen von Reaktionen mit Glutathion festgestellt, aber nicht alle konnten bisher in der Niere nachgewiesen werden [Ketterer und Mulder, 1990].

Die Bindung zwischen einem Substrat und Glutathion findet über die freie Thiolgruppe des Cysteins statt. Im Weiteren erfolgt dann die Metabolisierung zu einem höher polaren und wasserlöslichen Metaboliten. Dieser hat in der Regel eine geringere biologische Aktivität als die Ausgangsverbindung [Shaw und Blagbrough, 1989]. In Säugetieren führen die wichtigsten Konjugate zur Mercaptursäure-Bildung, welche dann über Urin und Galle ausgeschieden werden können [Williams, 1967]. Konjugation potenziell toxischer elektrophiler Komponenten mit Glutathion ist ein wichtiger Detoxifizierungsweg.

Da viele Glutathion *S*-Transferase Isoenzyme entdeckt worden sind, haben auch verschiedene Autoren unterschiedliche Nomenklaturen verwendet. Derzeitig wird die Nomenklatur benutzt, in welcher jede genetisch verschiedene Untereinheit ihre eigene Bezeichnung hat [Mannervik *et al.*, 1992]. Isoenzyme der Klassen α , μ und π wurden im Nierengewebe gefunden [Singh *et al.*, 1987; Beckett *et al.*, 1990].

Zwischen den renalen und hepatischen Enzymen sind Unterschiede zu erkennen. Glutathion *S*-Transferasen-Genexpression in der Leber kann durch Xenobiotika reguliert werden. Zudem wurde eine Genüberexpression in Zellen, die resistent gegen Zytostatika sind, gezeigt [Picket und Lu, 1989]. Eine Regulation der Genüberexpression in der Niere durch Arzneistoffe wurde bisher nicht beobachtet.

Es wurde aber auch eine Glutathion-abhängige Bioaktivierung nephrotoxischer Halogenalkene gefunden [Dekant *et al.*, 1988; Anders *et al.*, 1988]. Gründe hierfür werden zum Einen in der Aktivierung gesehen, die zu höherer molekularer Reaktivität führen kann, zum Anderen in der Bindung des Konjugates an makromolekulare Rezeptoren, wodurch die Toxizität ausgelöst wird. Das hierfür verantwortliche Enzym zur Generierung reaktiver Thiole von Glutathion-Konjugaten vieler Halogenalkane soll die renale C-S Lyase sein [Blagbrough *et al.*, 1988].

1.2.2.2.6 Mercaptursäure-Synthese

Viele Glutathion-Konjugate unterliegen weiteren enzymatischen Veränderungen durch Hydrolyse an der γ -Glutamybindung. Diese Reaktion wird durch die γ -Glutamyltransferase katalysiert. Neben der Hydrolyse kann die γ -Glutamyltransferase auch Transpeptidation und Autotranspeptidation katalysieren. Die γ -Glutamyltransferase ist in Tubuluszellen der Niere lokalisiert. Der Gehalt dieses Enzyms ist in den bisher untersuchten Säugetieren in der Niere am höchsten [Goldberg *et al.*, 1960; Hinchman und Ballatori, 1990].

Die Biosynthese von Mercaptursäure erfolgt im ersten Schritt durch die Konjugation eines elektrophilen Xenobiotikums mit Glutathion. Im nächsten Schritt findet dann am Konjugat die Hydrolyse an der γ -Glutamybindung durch die γ -Glutamyltransferase statt. Mercaptursäure wird schließlich nach Abspaltung von Glycin und Addition von Acetat mittels *N*-Acetyltransferase gebildet. Die Mercapturate werden dann im Urin durch Filtration und Sekretion ausgeschieden. Alle verantwortlichen Enzyme zur Bildung der Mercapturate sind in der Niere vorhanden [Davison *et al.*, 1990].

1.2.2.2.7 Aminosäure-Konjugation

Aminosäure-Konjugation findet in der Regel im Menschen mit den Aminosäuren Glycin oder seltener L-Glutamin statt [Smith und Williams, 1974]. Die Reaktion kann mit Substraten stattfinden, die eine Carboxylgruppe tragen. Bevorzugt werden dabei aromatische Carbonsäuren. Die Bindung findet zwischen der Aminogruppe der Aminosäure und der Carboxylgruppe des Substrates statt.

Ein Beispiel stellt die Konjugation von Benzoesäure mit Glycin unter Bildung der Hippursäure dar. Letztere ist polarer als die Benzoesäure, was zu einer höheren Exkretionsrate führt. Die verantwortlichen Enzyme zur Aminosäure-Konjugation sind Acyl-CoA Synthetase und *N*-Acyltransferase. Vertreten sind die Enzyme in Leber und

Niere, wobei in manchen Spezies die Aktivität in der Niere höher ist als in der Leber [Krishna und Klotz, 1994].

In der Niere finden die Reaktionen in den Mitochondrien der Nierenrindenzellen statt. Die Konjugation kann durch die vorhandene Menge an Glycin oder den entsprechenden an der Reaktion beteiligten Enzymen im Körper limitiert sein. Die vorhandene L-Glutaminmenge scheint keinen Einfluss auf die L-Glutamin-Konjugation zu haben. Kleine organische Verbindungen wie Benzoe- und Salicylsäure werden in der Niere durch Konjugation mit Glycin in Hippur- und Salicylursäure umgewandelt und ausgeschieden. Ist dieser Biosyntheseweg an seinem Limit angelangt, so werden die Substrate glucuronidiert [Vree *et al.*, 1992].

Glycin-Konjugation ist der Hauptmetabolismusweg für Salicylsäure. Aber schon bei einer Verlängerung der Seitenkette um ein Kohlenstoffatom zur Phenyllessigsäure findet keine Konjugation mehr mit Glycin statt. Stattdessen findet eine Konjugation mit L-Glutamin statt [Wan und Riegelman, 1972].

Man hat in der Vergangenheit angenommen, dass beim Erreichen der maximalen Umsatzrate von Benzoesäure mit Glycin automatisch ein anderer Konjugationsweg mit Glucuronsäure eingeschlagen wird. Später wurde festgestellt, dass Glucuronidierung auch bei sehr niedrigen Benzoesäure-Konzentrationen stattfindet. Die Glucuronidierung von Benzoesäure steigt proportional mit der vorhandenen Benzoesäure-Konzentration, ist aber unabhängig von der vorhandenen Glycin-Menge oder der Bildungsrate von Hippursäure. Somit ist die Glucuronidierung der Benzoesäure keine Reserve, sondern ein komplett eigenständiger Metabolismusweg [Schachter und Manis, 1958].

Salicylsäure wird auf dem gleichen Weg wie die Benzoesäure als Konjugat an Glycin eliminiert. Die Konjugation ist in der Niere deutlich höher als in der Leber. Aber im Gegensatz zur Benzoesäure findet eine Sättigung der Bildung von Salicylursäure nicht durch Mangel an Glycin statt, sondern durch Sättigung der an der Reaktion beteiligten Enzyme [Wan und Riegelman, 1972].

L-Glutamin-Konjugationen spielen im Körper nur eine untergeordnete Rolle. Sie treten vor allem bei Arylessigsäure-Derivaten auf. Ein solches Substrat ist die Phenyllessigsäure, welche in der Niere zu Indolacetylglutamin konvertiert wird [Smith und Williams, 1974].

1.2.3 Lokalisation arzneistoffmetabolisierender Enzyme in der Niere

Die beschriebenen Enzyme sollen hier noch einmal zusammengefasst werden (Tab. 1.1, Abb. 1.2). Tabelle 1.1 gibt die Verteilung arzneistoffmetabolisierender Enzyme in der Niere gemäß Abbildung 1.2A wieder. Es hat den Anschein, dass vor allem das Rindengewebe reich an metabolisierenden Enzymen ist. Hingegen wurden bisher nur wenige Enzyme in den unterschiedlichen Zonen des Nierenmarks gefunden.

Tab. 1.1: Verteilung arzneistoffmetabolisierender Enzyme in Nierenbereichen nach Lohr et al., 1998

Enzym	Rinde	Mark	außen	innen
<i>N</i> -Acetyltransferase	+	+	—	—
Alkoholdehydrogenase	+	+	—	—
Aldosereduktase	—	—	+	+
Aldehydreduktase	+	—	—	—
Aminosäure-Konjugation	+	—	—	—
Cytochrom P450	+++	—	+	—
Carboxylesterase	+	—	—	—
Glutathion <i>S</i> -Transferase	+	+	—	—
Monoaminoxidase	+++	+	—	—
NADPH Cytochrom C Reduktase	+++	—	—	+
Sulfotransferase	+	—	+	—

Die Abbildung 1.2 zeigt die regional, tubulär und zellulär vorherrschende Verteilung arzneistoffmetabolisierender Enzyme in der Niere. Man kann sehen, dass der proximale Tubulus reich an metabolisierenden Enzymen ist, wenn auch in allen Bereichen des Nephrons Enzyme gefunden wurden (Abb 1.2B). Viele dieser Enzyme wurden entweder im Cytoplasma oder in Mikrosomen oder sogar in beiden Kompartimenten gefunden (Abb. 1.2C). Es handelt sich aber hierbei um eine Momentaufnahme, da die Niere noch nicht systematisch nach Enzymen untersucht wurde.

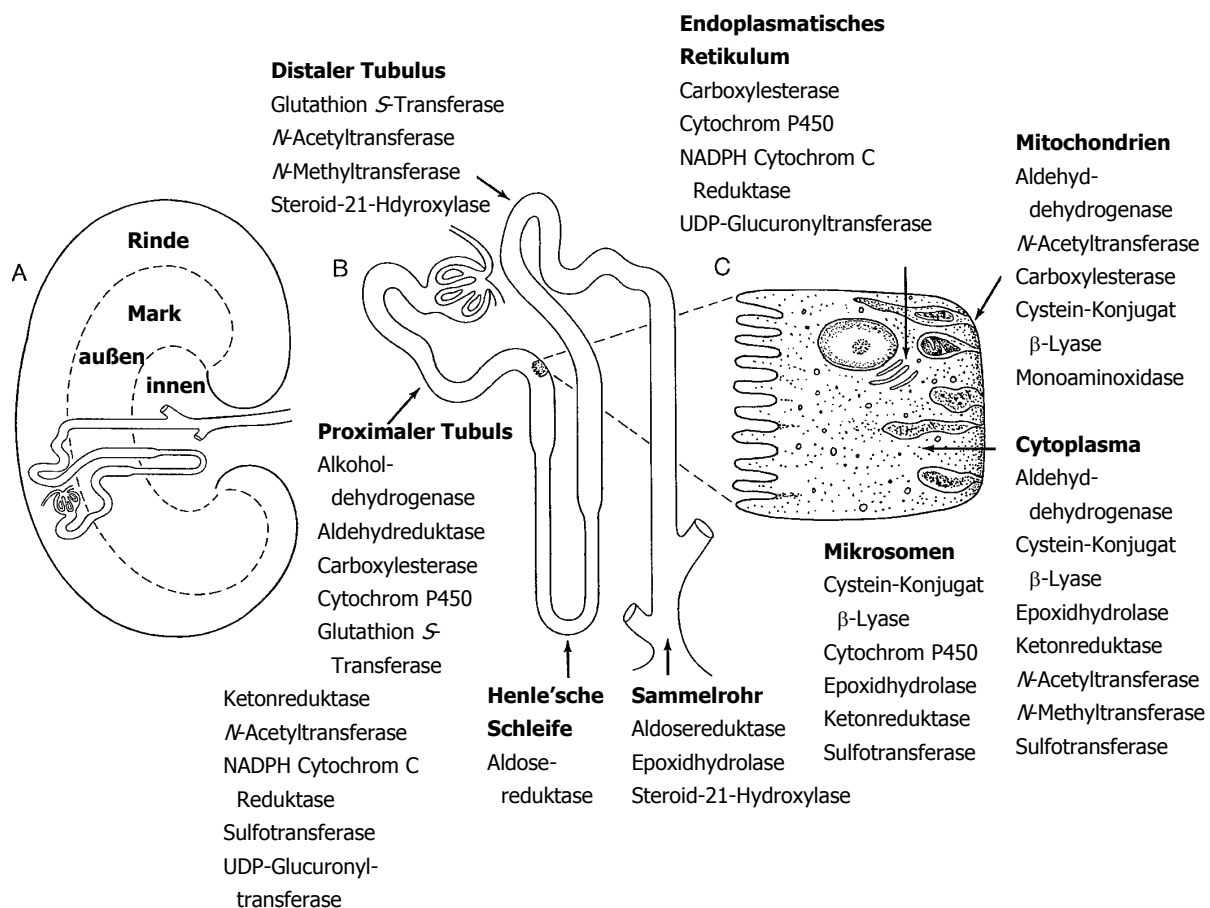


Abb. 1.2: Regionale (A), tubuläre (B) und subzelluläre (C) Lokalisation von arzneistoffmetabolisierenden Enzymsystemen in der Niere nach Lohr et al., 1998

1.2.4 Ergebnisse des renalen Metabolismus

Die Niere metabolisiert endogene und exogene Substanzen normalerweise zu biologisch weniger aktiven Substanzen. Jedoch wird auch berichtet, dass in der Niere toxische Zwischenprodukte entstehen, die zu Mutagenität oder Zellnekrose führen [Spahn-Langguth und Benet, 1992; Anders und Dekant, 1994].

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass durch metabolische Aktivierung positive Effekte erzielt werden können. Als Beispiel sei der Angiotensin Converting Enzym Inhibitor Enalapril zu nennen. Sein aktiver Metabolit Enalaprilat ist eine polare Dicarbonsäure. Der intrarenal erzeugte Metabolit wird entweder wieder in den Körper rückresorbiert oder ins Lumen ausgeschieden [de Lannoy et al., 1990].

Die Erforschung des renalen Metabolismus von Arzneistoffen hat dazu geführt, dass zielgenaue Systeme entwickelt worden sind, die unerwünschte Wirkungen vermeiden. So wurde eine hohe β -Lyase Aktivität in der Niere entdeckt. Dieses

Enzym ist in der Lage, *S*-(6-PurinyI)-L-cystein in das antitumorale und immunsuppressive Medikament 6-Mercaptopurin zu verwandeln. Hiermit wird eine gewünschte Akkumulation erreicht, die zu einer hohen Konzentration direkt am anzugreifenden Target in der Niere führt. Gleichzeitig wird hiermit die systemische Toxizität deutlich verringert [Elfarra und Hwang, 1993].

Der Metabolismus von Arzneistoffen und endogenen Substanzen kann zu Veränderungen führen, die entweder zur Ausscheidung oder zur Resorption führen, je nachdem, welcher Weg eingeschlagen wird. Aminosäure-Konjugation führt zum Verlust pharmakologischer Aktivität, und der gebildete Metabolit wird tubulär im Urin ausgeschieden [Gregus *et al.*, 1993]. Ähnliches wurde beim Arzneistoff Meperidin festgestellt, dessen *N*-Oxid zu einer schnelleren Ausscheidung führt [Acara *et al.*, 1981]. Die Aktivität der metabolisierenden Enzyme ist ebenso von Bedeutung. Cholin wird zu Betain metabolisiert, welches resorbiert wird. Sollte aber das Cholin-Oxidase Enzym gesättigt sein, so wird Cholin direkt renal ausgeschieden [Acara *et al.*, 1979]. Der am häufigsten genutzte Weg zur erhöhten Ausscheidung einer Substanz erfolgt durch eine Bindung an Ausscheidungstransporter und/oder über eine erhöhte Wasserlöslichkeit. Viele Prozesse sind hieran beteiligt [Ullrich *et al.*, 1990]. Die Hydroxylierung des Benzolrings führt neben einer zusätzlichen elektronenziehenden Gruppe im Molekül zu einer deutlich besseren Akzeptanz für den *p*-Aminohippursäure-Rezeptor. Darüber hinaus wird durch Glucuronidierung die Wasserlöslichkeit weiter erhöht. Veresterung einer freien Säure führt wiederum zu einer Erniedrigung der Akzeptanz am genannten Rezeptor. Hingegen werden Aminosäuren und Oligopeptide wie Glutathion Substrate für den organischen Kationentransporter, wenn sie verestert sind. Glycin-Konjugation führt bei Salicylsäure zu einer erhöhten Affinität zum *p*-Aminohippursäure-Rezeptor [Ullrich *et al.*, 1987].

Insgesamt gesehen ist die Leber der Hauptmetabolismusort. Jedoch kann durch die dargestellten Angaben die Niere ebenfalls als ein aktives Organ bei dem Metabolismus von Arzneistoffen angesehen werden. In manchen Fällen kann in der Niere eine höhere Aktivität gezeigt werden als in der Leber nachgewiesen wurde. In der Regel wird ein Produkt gebildet, welches leichter über den Urin ausgeschieden werden kann. In manchen Fällen aber wird der Metabolit resorbiert und kann dabei aktiver oder toxischer sein als die Ausgangsverbindung.

1.3 Prodrugprinzip *N*-hydroxylierter basischer Verbindungen

Stark basische Verbindungen mit Amidin- und Guanidinstruktur liegen unter physiologischen Bedingungen überwiegend protoniert vor. Das macht sie zu sehr schlecht resorbierbaren Substanzen im Gastrointestinaltrakt. Die Herabsetzung dieser starken Basizität ist durch die *N*-Hydroxylierung des Amidins oder Guanidins möglich, woraus eine Erniedrigung des pK_s -Wertes um ca. 6 Einheiten resultiert [Albert *et al.*, 1948]. Hierdurch wird die orale Gabe einer stark basischen Verbindung möglich, da sie nun als freie Base vorliegt [Clement, 1998; Ettmayer *et al.*, 2004].

Durch eine solche Veränderung am Arzneistoff wird dieser aber unter physiologischen Bedingungen inaktiv. Man benutzt eine Vorstufe des Arzneistoffes, ein so genanntes Prodrug. Durch Biotransformation kann dieser Stoff im Körper wieder aktiviert werden, indem die Hydroxylgruppe reduktiv abgespalten wird. Es findet eine Bioaktivierung statt und aus dem Prodrug wird das Drug (Arzneistoff) gebildet. Dieses Prodrug-Konzept trägt zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit bei [Ettmayer *et al.*, 2004] (Abb. 1.3).

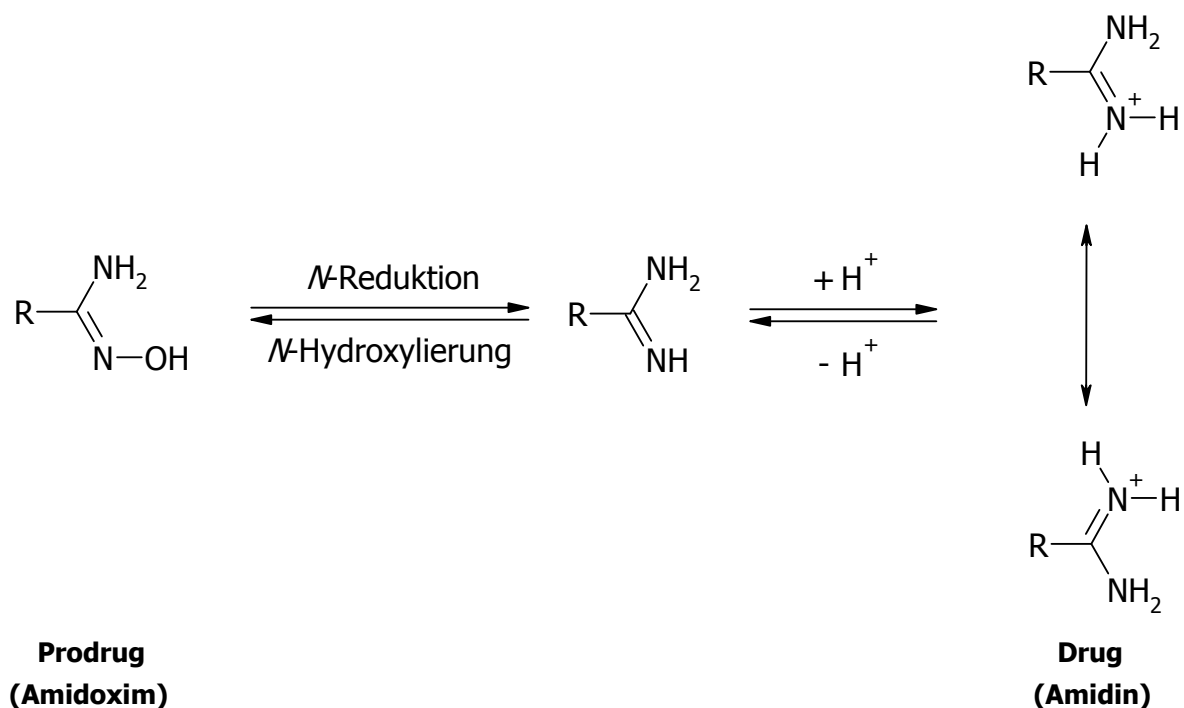
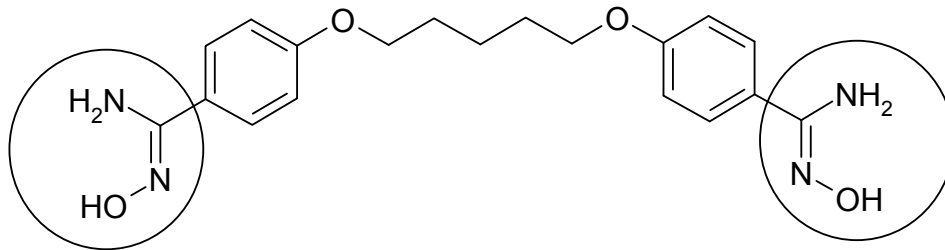
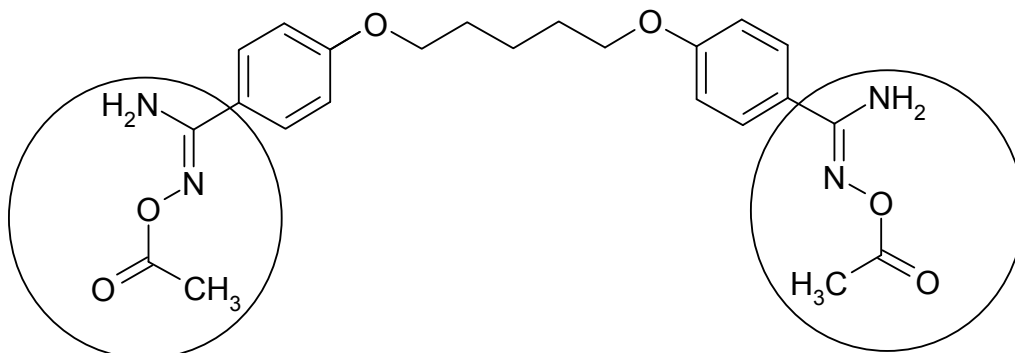


Abb. 1.3: Prodrug-Prinzip am Beispiel eines Amidoxims

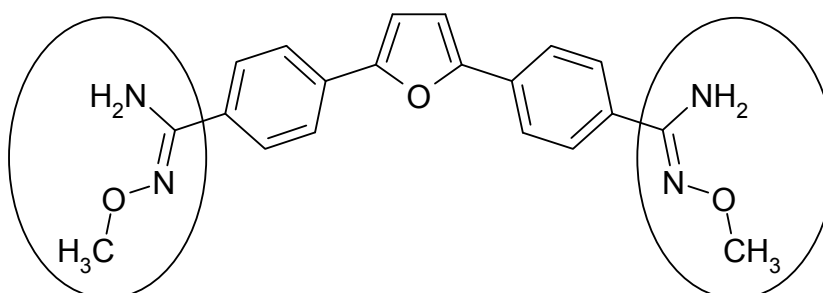
Amidin- und Guanidinstrukturen sind in vielen Wirkstoffklassen vertreten. Die unter physiologischen Bedingungen protonierten Kationen gehen häufig Interaktionen mit deprotonierten Carboxylfunktionen der Targetmoleküle ein. Außerdem ähnelt die Amidinfunktion einer Teilstruktur des Arginins. Dieses macht sie zu einer bevorzugten Struktur in peptidomimetischen Hemmstoffen. Daneben treten Amidin-Funktionen in Arzneistoffen gegen *Pneumocystis Pneumonie* [Clement, 2002], Trypanosomiasis und Leishmaniose sowie in Antikoagulantien [Peterlin-Masic *et al.*, 2006] auf.



Pentamidin-Prodrug (*N,N'*-Dihydroxypentamidin)



Pentamidin-Prodrug (1,5-Bis(4'-acetoamidinophenoxy)pentan)



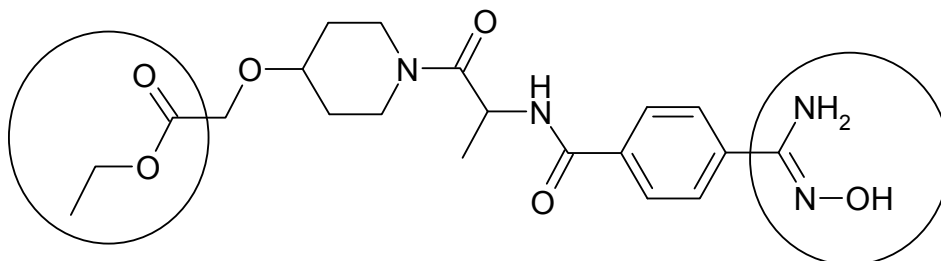
Furamidin-Prodrug (DB289)

Abb. 1.4: Anitparasitär wirksame Prodrugs

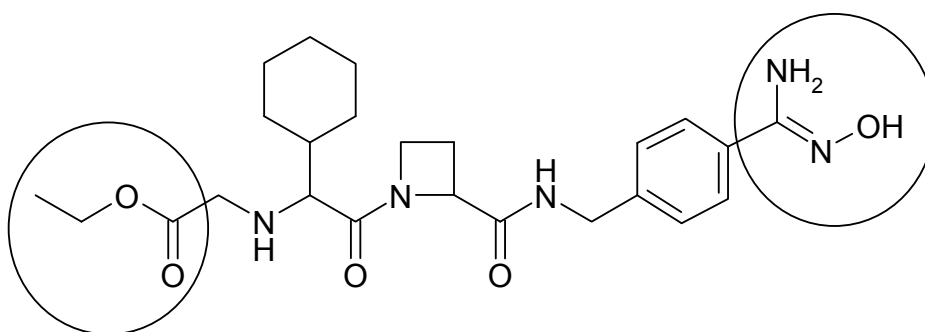
Ein Patent dieses Prodrug-Konzeptes wurde von Clement [Patent, 1993] für Pentamidin (Abb. 1.4) entwickelt. Pentamidin wird bei trypanoziden und leishmaniziden Krankheiten eingesetzt. Durch eine *N*-Hydroxylierung wird es zum korrespondierenden Amidoxim-Prodrug umgewandelt.

Neben dem dihydroxylierten Prodrug des Pentamidins (*N,N'*-Dihydroxypentamidin) wurde zur weiteren Lipophilieerhöhung auch das diacetylierte Prodrug (1,5-Bis(4'-acetoamidinophenoxy)pentan) (Abb. 1.4) entwickelt, welches die gleiche Indikation besitzt. Hierzu zählt ebenso das Furamidin-Prodrug DB289 [Saulter *et al.*, 2005] (Abb. 1.4), bei dem die OH-Gruppe methyliert worden ist.

In der Gruppe der Antikoagulantien sind unter den Glycoprotein IIb/IIIa Rezeptor-Antagonisten Sibrafiban (Hoffmann-La Roche) [Wittke *et al.*, 1999] (Abb. 1.5) sowie unter den indirekten Thrombininhibitoren Ximelagatran (Exanta[®], AstraZeneca) [Gustafsson *et al.*, 2001] (Abb. 1.5) besonders hervorzuheben. Hierbei sind nicht nur die Amidinfunktion durch Hydroxylierung sondern auch die Carbonsäuren verestert worden, so dass bifunktionelle Prodrugs vorliegen (Abb. 1.5).



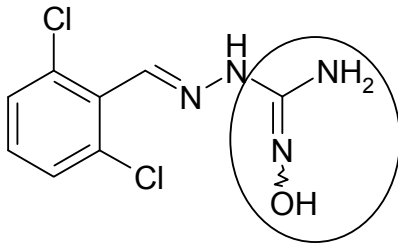
Sibrafiban



Ximelagatran (Exanta[®])

Abb. 1.5: Antikoagulativ wirksame Prodrugs

Als blutdrucksenkenden Arzneistoff mit *N*-hydroxyliertem Strukturmerkmal fand Guanoxabenz (ehemals Benzérial[®], Frankreich) Anwendung (Abb. 1.6).



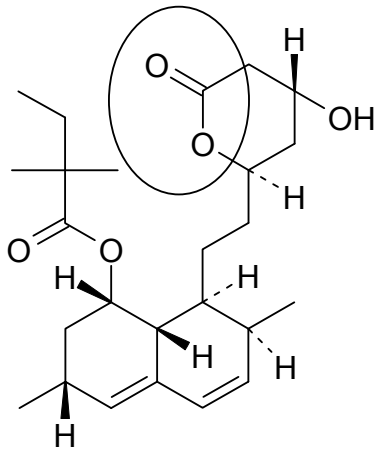
Guanoxabenz (Benzérial®)

Abb. 1.6: Antihypertensiv wirksames Prodrug

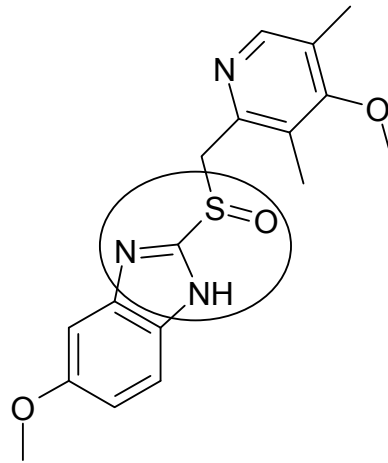
Die Breite möglicher Ansätze für Prodrugs ist riesig und erstreckt sich über weit mehr als *N*-hydroxylierte oder veresterte Verbindungen. In der praktischen Anwendung befinden sich u. a. folgende Blockbuster: Simvastatin, Omeprazol, Aciclovir, Lovastatin und Enalapril [Ettmayer *et al.*, 2004] (Abb. 1.7).

Die weitere Entwicklung von Sibrafiban wurde aufgrund mangelnder Wirksamkeit der Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptorantagonisten gestoppt [Second Symphony Investigators, 2001].

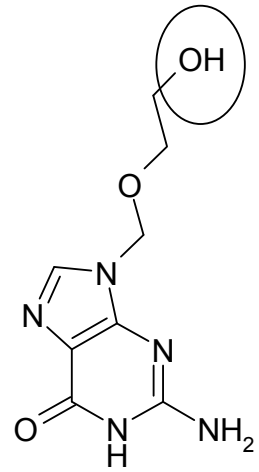
Exanta® (Ximelagatran) wurde im Februar 2006 inklusive seines wirksamen Metaboliten Melagatran weltweit vom Markt genommen [BfArm, Pressemitteilung vom 14.02.2006]. Grund hierfür war eine bei etwa 7 % der Patienten auftretende Transaminase-Erhöhung [Mitteilung AstraZeneca]. Diese unerwünschte Wirkung konnte allerdings bisher nicht mit dem Prodrug-Prinzip in Verbindung gebracht werden. Die Entwicklung vieler anderer Amidoximprodrugs [Peterlin-Masic *et al.*, 2006] wird somit fortgesetzt.



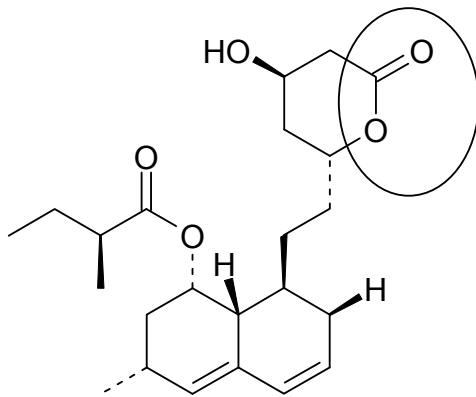
Simvastatin



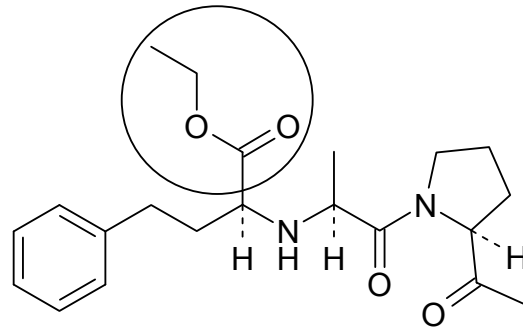
Omeprazol



Aciclovir



Lovastatin



Enalapril

Abb. 1.7: Blockbuster Prodrugs [Ettmayer et al., 2004]

1.4 Reduktion *N*-hydroxylierter basischer Verbindungen

Die Pharmakokinetik ist der Zweig der Pharmakologie, der sich mit den zeitlichen Änderungen der Pharmakon-Konzentration in den verschiedenen Kompartimenten des Organismus befasst [Kuschinsky *et al.*, 1993].

Ein Arzneimittel wird nach den heute gültigen Standards beurteilt. Diese beinhalten u. a. die Pharmakokinetik, Interaktionen mit anderen Arzneistoffen sowie das Wissen über genetische Variabilitäten bei Bioaktivierung bzw. Biotransformation.

Dieses Wissen bedingt die Kenntnis der enzymatischen Grundlagen. Die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen stellt in der Regel eine Entgiftungsreaktion für den Körper dar. Einigen *N*-hydroxylierten Substanzen wird ein genotoxisches Potential zugesprochen, während die reduzierten Metabolite davon nicht betroffen sind [Clement *et al.*, 1988a; 1996].

Wird im Speziellen die Bioaktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs betrachtet, so sind Kenntnisse über die enzymatischen Grundlagen der Reduktion zur Aktivierung des Pharmakons entscheidend. Im Folgenden werden die bisherigen enzymatischen Untersuchungen und Erkenntnisse zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen stark basischer funktioneller Gruppen dargestellt.

Die Reduktion von Hydroxylamin und seinen *N*-methylierten Derivaten mit Mitochondrien wurde 1968 erstmals beschrieben [Bernheim und Hochstein, 1968]. Das reduktive System wurde als mitochondriale Hydroxylaminreduktase bezeichnet und konnte als ein membranständiges Enzymsystem identifiziert werden (Abb. 1.8). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren eine Cosubstratabhängigkeit, wobei NADH überlegen war, Sauerstoffinsensitivität und ein neutrales pH-Optimum [Bernheim und Hochstein, 1968; Bernheim, 1969]. Neben den Hydroxylaminen konnte auch bei aromatischen Hydroxamsäuren eine mitochondriale Reduktion festgestellt werden [Bernheim, 1969; 1972]. Es wurde eine Vielzahl von Hemmstoffen getestet. Während Hemmstoffe der Atmungskette wie Amytal und Antimycin sowie Kohlenmonoxid keinen Einfluss auf die *N*-reduktive Aktivität aufwiesen, zeigte sich mit Quecksilberverbindungen, Phosphat, Cyanid, und Arsenat eine deutliche Hemmung der Reduktion [Bernheim und Hochstein 1968; Bernheim 1969].

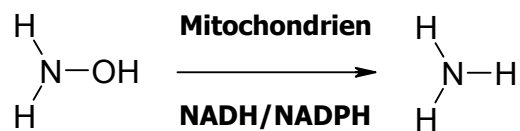


Abb. 1.8: Reduktion von Hydroxylamin [Bernheim, 1969]

Etwa zur gleichen Zeit konnte aus Schweinelebermikrosomen eine NADH-Hydroxylaminreduktase isoliert werden [Kadlubar *et al.*, 1973]. Sie wies Gemeinsamkeiten mit dem mitochondrialen System auf. Sauerstoff und Kohlenmonoxid zeigten keine Hemmung des reduktiven Systems. Im Unterschied zum mitochondrialen System fand die Reaktion im leicht sauren pH-Bereich ihr Optimum und war unempfindlich gegenüber Cyanid. Durch Enzymreinigung konnten Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase als verantwortliche Enzyme für diese Reduktion ermittelt werden. Außerdem wurde noch eine weitere Komponente gefunden, welche in der Kombination mit den anderen Enzymen für die Reduktion des Hydroxylamins verantwortlich war [Kadlubar und Ziegler, 1974]. Die dritte Komponente konnte allerdings nicht identifiziert werden (Abb. 1.9). Bei der Isolierung der Enzyme wurde ein physiologisches Verhältnis von acht Mol Cytochrom b_5 und einem Mol NADH Cytochrom b_5 Reduktase gefunden. Eine Optimierung der Komponenten zur Reduktion im *in vitro* Ansatz wurde ebenfalls durchgeführt. Hierbei ergab sich ein Verhältnis, welches aus neun Mol Cytochrom b_5 und einem Mol NADH Cytochrom b_5 Reduktase bestand [Kadlubar und Ziegler, 1974].

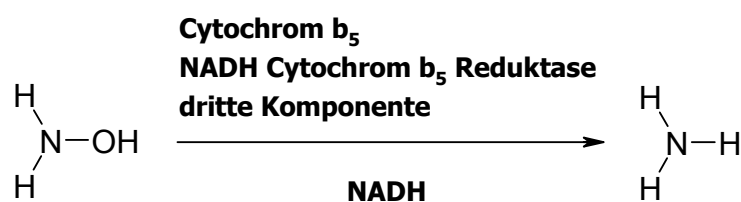
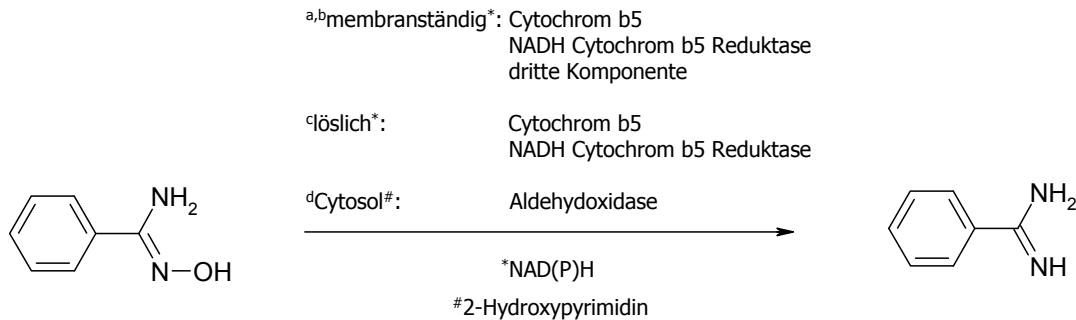


Abb. 1.9: Reduktion von Hydroxylamin [Kadlubar *et al.*, 1973]

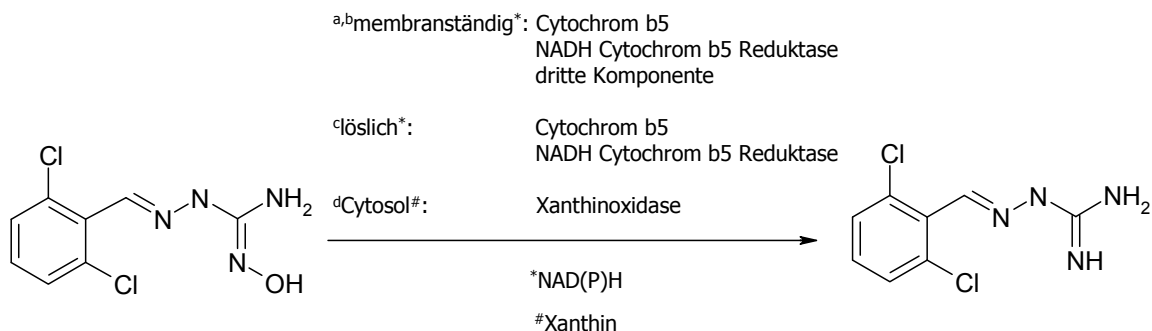
Zunächst wurde die Reduktion von Hydroxylaminen untersucht [Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2000; Clement *et al.*, 2005a]. Neben der mikrosomalen Hydroxylaminreduktase konnte auch an *N*-hydroxylierten Amidinen [Clement *et al.*, 1988b; Hauptmann *et al.*, 1988; Clement *et al.*, 1993b; Clement und Jung, 1994], Guanidinen [Clement *et al.*, 1993a], Amidinohydrazonen [Clement *et al.*, 1996; Clement und Demesmaeker, 1997, Clement *et al.*, 2005b] und Oximen [Heberling *et al.*, 2006] eine mikrosomale Reduktion gezeigt werden (Abb. 1.10). Bei der

Isolierung des verantwortlichen Enzymsystems wurde ein der Hydroxylaminreduktase ähnliches System mit vergleichbaren Charakteristika gefunden. Dieses besteht aus Cytochrom b₅, NADH Cytochrom b₅ Reduktase und einer dritten Proteinfraction. Diese dritte Fraktion wurde als Cytochrom P450 Enzym der Familie 2D identifiziert [Clement *et al.*, 1997].



[^aDeters, 2002; ^bClement *et al.*, 1997; ^cKurian *et al.*; 2004; ^dTatsumi und Ishigai, 1987]

Reduktion von Benzamidoxim



[^aDeters, 2002; ^bClement *et al.*, 1997; ^cKurian *et al.*; 2004; ^dTatsumi und Ishigai, 1987]

Reduktion von Guanoxabenz

Abb. 1.10: Reduktionsbeispiele N-hydroxylierter Verbindungen

In den beschriebenen Untersuchungen wurde membrangebundene Enzyme gearbeitet. Die rekombinant gewonnenen löslichen Enzyme Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase reduzieren auch ohne Zugabe einer weiteren Komponente Hydroxylamine sowie Amidoxime [Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005]. Das optimale Verhältnis der eingesetzten Enzyme im *in vitro* Ansatz wurde mit acht zu eins bis zehn zu eins zu Gunsten des Cytochrom b₅ beschrieben [Kurian *et al.*, 2004] (Abb. 1.10).

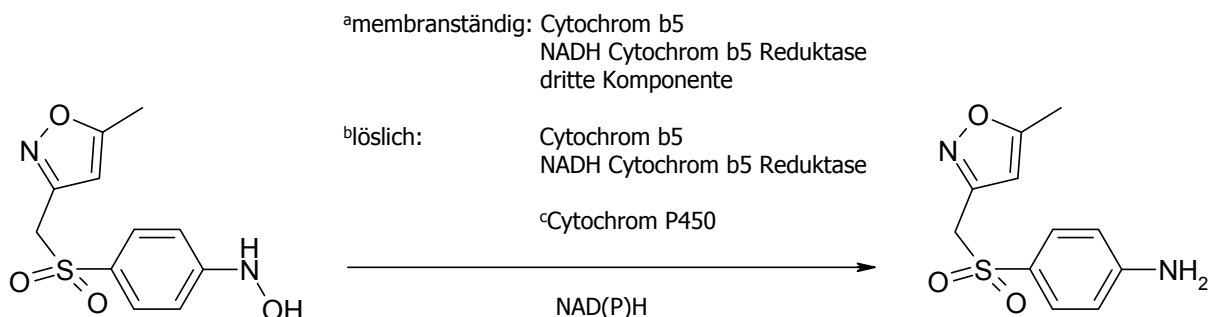
Membrangebundene Enzyme zeigen keine [Kadlubar und Ziegler, 1974] oder nur eine geringe Reduktionsrate [Clement *et al.*, 1997]. Erst die Zugabe der dritten

Komponente führt zu einem deutlichen Anstieg der Reduktionsrate [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005a] (Abb. 1.10).

Neben der mikrosomalen Reduktion konnte auch eine mitochondriale Präparation die Reduktion von Benzamidoxim und *N*-Hydroxymelagatran katalysieren [Clement *et al.*, 2005b; Andersson *et al.*, 2005]. Die Umsetzungsraten in Mitochondrien sind in der Regel höher als in Mikrosomen [Deters, 2002]. Außerdem wurde in vielen unterschiedlichen Geweben eine Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen nachgewiesen. Die Niere zeigte in diesen Untersuchungen stets die höchsten Umsetzungsraten [Mau, 2002].

Weiterhin konnte die cytosolische Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen gezeigt werden. Die verantwortlichen Enzyme sind Aldehyd- sowie Xanthinoxidase (Abb. 1.10). Beide Oxidasen gehören den molybdäncofaktorabhängigen Enzymen an. Die Reduktionen finden nur anaerob statt [Tatsumi und Ishigai, 1987; Clement und Kunze, 1992; Dambrova *et al.*, 1998].

Die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin wurde in verschiedenen Systemen beschrieben. Es wurden Lebermikrosomen von Ratten, die unbehandelt oder mit Induktoren vorbehandelt worden waren, für die Reduktion verwendet. Hierbei wurden nach Induktion höhere Reduktionsraten beobachtet. Als Induktionsmittel wurden Dexamethason und Phenobarbital verwendet. Diese induzieren vor allem Cytochrom P450 Isoenzyme der Familien CYP2B und CYP3A. Es wurde damit auf die Beteiligung von Cytochrom P450 Isoenzymen an der Reduktion geschlossen (Abb. 1.11). Die Reduktion fand bevorzugt unter anaeroben Bedingungen statt [Cribb *et al.*, 1995]. Später konnte die Reduktion durch das Dreikomponentensystem bestätigt werden [Clement *et al.*, 2005a] (Abb. 1.11). Die gleiche Reduktion konnte mit den löslichen Enzymen Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase durchgeführt werden [Kurian *et al.*, 2004] (Abb. 1.11).



[^aClement *et al.*, 2005a; ^bKurian *et al.*, 2004; ^cDambrova *et al.*, 1998]

Abb. 1.11: Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin

1.5 Thema und Zielsetzung der Arbeit

Der Metabolismus *N*-hydroxylierter Verbindungen wurde in der Vergangenheit ausführlich untersucht. Es wurden *in vivo* und *in vitro* Studien mit Geweben aus Kaninchen, Ratte, Schwein und Mensch durchgeführt. In den unterschiedlichen Organen Leber, Niere, Darm und Gehirn konnte dabei die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen gezeigt werden [Hauptmann *et al.*, 1988; Clement *et al.*, 1988a; Clement *et al.*, 2000; Clement 2002; Clement *et al.*, 2005b; Heberling *et al.*, 2006]. Innerhalb der Organe konnte die Reduktion von Hydroxylamin in Mikrosomen und Mitochondrien festgestellt werden [Bernheim und Hochstein, 1968; Kadlubar *et al.*, 1973]. Im Laufe der Zeit wurde das Spektrum der enzymatisch reduzierbaren, *N*-hydroxylierten Verbindungen immer größer. Durch Teilreinigung und Rekonstitution von Proteinfractionen konnte die Beteiligung der zwei Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase an der *N*-Reduktivität bewiesen werden. In den Untersuchungen wurde mit membranständigen Enzymen gearbeitet. Durch weitere Teilreinigung konnte in Lebermikrosomen eine zusätzliche Proteinfraction gewonnen werden, die zu einer verstärkten Aktivität im *N*-hydroxylierenden System führte. In Sequenzanalysen dieser Fraction wurde ein Cytochrom P450 Isoenzym gefunden [Lomb, 1995]. Daneben wurde in Lebermitochondrien ebenfalls eine Proteinfraction gefunden, die zu einer Verstärkung der *N*-reduktiven Aktivität des Zweikomponentensystems bestehend aus Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase führte. Die Sequenzanalyse dieser Fraction ergab den C-Terminus der molybdäncofaktorabhängigen Sulfurase [Havemeyer, 2006]. Mit den löslichen Enzymen Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase konnte die *N*-Reduktivität auch allein dargestellt werden [Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005]. In weiteren Arbeiten wurde die Beteiligung einer dritten Komponente bestätigt [Andersson *et al.*, 2005]. Hier wird allerdings die Beteiligung eines Cytochrom P450 Isoenzym ausgeschlossen. Es wurden cytosolisch vermittelte *N*-reduktive Aktivitäten gefunden, die nicht auf das Elektronentransportproteinsystem Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase zurückgeführt werden konnten. Auch die Ergebnisse von Cribb *et al.* [1995] führen zu der Annahme, dass es mehrere Enzymsysteme innerhalb einer Zelle geben muss, die für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen verantwortlich sind.

Die bisherigen Ergebnisse leiten zu der Fragestellung, welche Enzymsysteme in der Niere für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen verantwortlich sind. In der

vorliegenden Arbeit waren die enzymatischen Grundlagen in der Niere anhand des Modellssubstrates Benzamidoxim aufzuklären.

Die Untersuchungen sollten sich auf Mikrosomen und Mitochondrien aus Schweinenieren konzentrieren. Hierzu war die Gewinnung der jeweiligen Präparationen und ihre Charakterisierung notwendig. Eine Beteiligung der Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase war sowohl in den Nierenmikrosomen als auch in den Nierenmitochondrien zu klären, um die bisherigen Untersuchungen zu bekräftigen [Lomb, 1995; Mau, 2002; Deters, 2002].

Im Fall der Nierenmikrosomen sollte gezielt nach Cytochrom P450 Isoenzymen gesucht werden, da in Lebermikrosomen bisher nur Cytochrom P450 Isoenzyme als verantwortliche dritte Komponente für das Reduktionssystem *N*-hydroxylierter Verbindungen gefunden wurden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung der äußeren mitochondrialen Membran inklusive ihrer Charakterisierung. Dieses sollte die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Lebermitochondrien bestätigen [Deters, 2002; Havemeyer, 2006]. Der weitere Schritt bestand darin, die äußere Membran zu solubilisieren und chromatographisch aufzutrennen, um die an der Reaktion beteiligten Enzyme identifizieren zu können.

Aufgrund des Ergebnisses, dass die löslichen Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase allein die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen katalysieren können [Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005], sollten in dieser Arbeit die membrangebundenen Enzyme für die Modells substanz Benzamidoxim weiter charakterisiert werden. Diese Untersuchungen waren ebenfalls für das Dreikomponentensystem bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und gereinigten Enzymen aus Schweinenierenmitochondrien durchzuführen.

2 GEWINNUNG UND BEARBEITUNG VON SCHWEINENIERENMIKROSOMEN

2.1 Einleitung

2.1.1 Das Cytochrom P450-Enzysystem

2.1.1.1 Grundlagen und Vorkommen

Das Cytochrom P450-Enzysystem ist ein Multienzysystem. Es umfasst eine breit gefächerte Superfamilie hämhaltiger Proteine. Es gehört zu den am meisten untersuchten Enzysystemen überhaupt [Ruckpaul, 1993].

Bei Säugetieren gibt es in den meisten Organen und Geweben P450 Enzyme, wobei die Enzyme entweder als lösliche Enzyme im Cytosol niederer Organismen vorkommen [Testa, 1995] oder als membrangebundene Enzyme sowohl im Endoplasmatischen Retikulum als auch in Mitochondrien vorliegen [Testa, 1995]. Die einzelnen Isoenzyme wurden nach ihren Aminosäuresequenzen in verschiedene Klassen eingeteilt. Hierauf beruht die heutige Nomenklatur. Bei mindestens 40 %iger Homologie der Aminosäuresequenz findet eine Einteilung in Familien statt, die mit einer arabischen Ziffer gekennzeichnet sind. Subfamilien werden bei mindestens 59 %iger Homologie mit einem Großbuchstaben charakterisiert. Die einzelnen Isoenzyme werden durch nachstehende arabische Ziffern gekennzeichnet, z. B. CYP2A6 [Nelson *et al.*, 1996].

Sie bestehen aus einem Häm als prosthetische Gruppe und einem Apoprotein. Bei dem Hämrest handelt es sich um ein Porphyrin-Ringsystem (Eisen-Protoporphyrin IX) mit Eisen als Zentralatom, welches in verschiedene Oxidationsstufen übergehen kann. Das Häm ist über hydrophobe Wechselwirkungen und eine koordinative Bindung mit einer Cysteinseitenkette an das Apoprotein gebunden [Porter und Coon, 1991; Testa 1995]. Der Schwefelligand an der 5. Koordinationstelle des Eisens ist für die katalytischen und spektralphotometrischen Eigenschaften von entscheidender Bedeutung [Rein *et al.*, 1984]. Die Namensgebung dieser Enzymfamilie beruht auf dem Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom P450-Kohlenmonoxid-Komplexes bei 450 nm.

Wahrscheinlich ist das Hämeisen im dreiwertigen Zustand an der 6. Koordinationstelle durch Wasser belegt, welches im zweiwertigen Zustand durch ein Sauerstoffmolekül ersetzt werden kann [Porter und Coon, 1991]. Außerdem

können an die 6. Koordinationsstelle des Eisens Kohlenmonoxid, Cyanid, *N*-, *S*- und *O*-haltige Verbindungen koordinieren.

Cytochrom P450 Enzyme verhalten sich wie Monooxygenasen. Sie fügen einzelne Sauerstoffatome in verschiedene Substrate ein, während sie das andere Sauerstoffatom aus dem molekularen Sauerstoff zu Wasser reduzieren. [Ortiz de Montellano, 1986]. Guengerich [1991] konnte zeigen, dass das Enzymsystem unter bestimmten Voraussetzungen auch Oxidase- und Peroxidaseaktivität zeigt (Abb. 2.1).

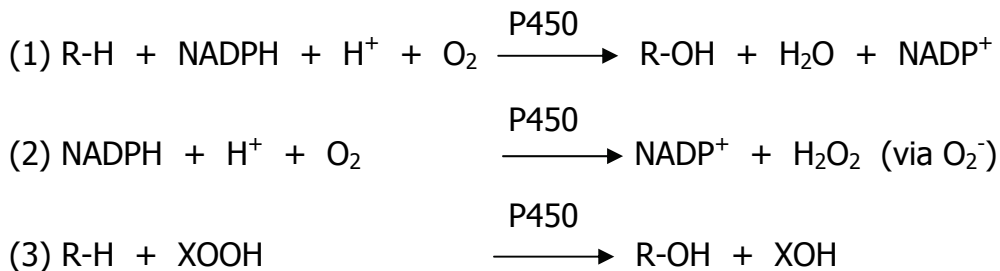


Abb. 2.1: Cytochrom P450-katalysierte Reaktionen [Guengerich, 1991]. Cytochrom P450 Enzyme können als (1) Monooxygenasen, (2) Oxidasen sowie (3) Peroxidasen fungieren.

Die herausragende Aufgabe der Cytochrom P450 Enzyme sind die Monooxygenase-Eigenschaften. Dabei werden nicht nur Fremdstoffe metabolisiert, sondern auch körpereigene Stoffe wie Steroide, Prostaglandine, Eicosanoide, fettlösliche Vitamine und Fettsäuren [Goeptar *et al.*, 1995].

An das Endoplasmatische Retikulum gebundene Isoenzyme können in zwei Klassen unterteilt werden. Die eine Klasse ist am Steroidhormon- und Cholesterinstoffwechsel beteiligt, die andere Klasse am Fremdstoffmetabolismus. Hierbei sind Überschneidungen möglich. Neben diesen Isoenzymen katalysieren die mitochondrialen Enzyme Reaktionen in der Steroidhormon- und Gallensäure-Biosynthese [Wikvall, 2001].

Cytochrom P450 Enzyme akzeptieren in einem Reaktionsschritt nur ein Elektron. Die zugehörigen Reduktionsäquivalente NADPH und NADH stellen aber zwei Elektronen zur Verfügung. Aus diesem Grund wird ein weiteres Enzym für die Reaktion benötigt, welches die Elektronen aufnimmt und nacheinander über Semichinonintermediate an seine prosthetischen Gruppen (FAD und FMN) abgibt. Hierbei handelt es sich normalerweise um die NADPH Cytochrom P450 Reduktase [Testa, 1995]. Bei Bereitstellung der Elektronen durch NADH ist die Übertragung beider Elektronen oder des zweiten Elektrons durch die NADH Cytochrom b_5 Reduktase und das Cytochrom b_5 möglich [Hildebrandt und Estabrook, 1971]. Mitochondriales

Cytochrom P450 überträgt Elektronen mit Hilfe des Flavoproteins Ferredoxin-Reduktase und des Eisen-Schwefel-Proteins Ferredoxin. Die Elektronenübergänge sind in Abb. 2.2 veranschaulicht.

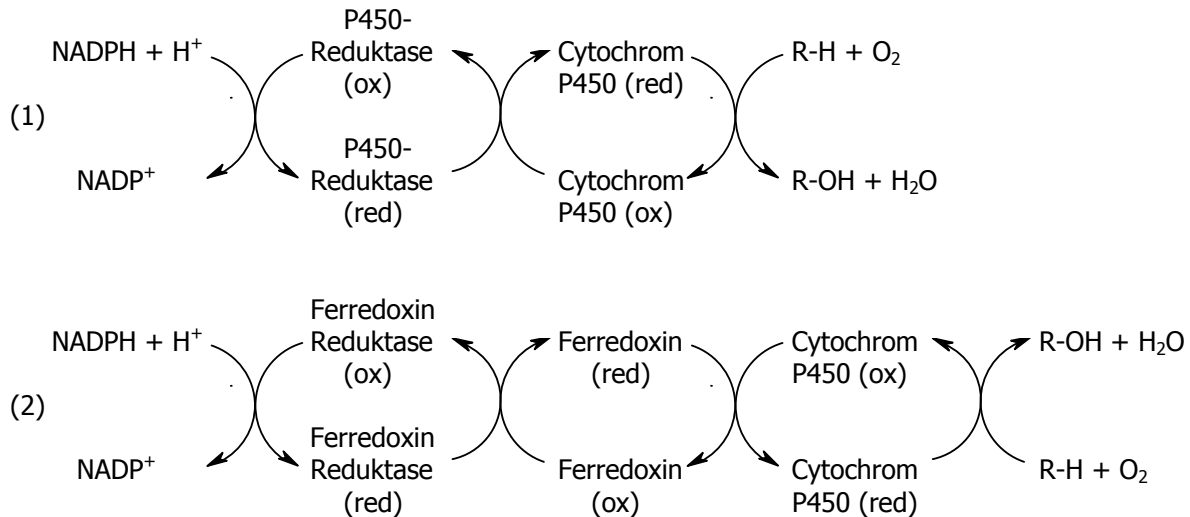


Abb. 2.2: Mechanismen von mikrosomalen (1) und mitochondrialen (2) Cytochrom P450-abhängigen Hydroxylierungen [Wikvall, 2001].

Im Allgemeinen besitzen Cytochrom P450 Isoenzyme keine hohe Substratspezifität. Dieses ist in den metabolisierenden Organen, vor allem Leber und Niere, von großem Vorteil. Dadurch werden Xenobiotika verstoffwechselt, ohne dass das Organ jemals Kontakt zu diesen hatte [Bonse und Metzler, 1978]. Allerdings gibt es eine Gewichtung der Beteiligung der einzelnen Isoenzyme am Fremdstoffmetabolismus. Zu den wichtigsten Cytochrom P450 Isoenzymen zählen u. a. CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 [Guengerich, 2001]. Die einzelnen Isoenzyme unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Aminosäuresequenz. Zudem werden einzelne Isoenzyme durch so genannte Markeraktivitäten unterschieden. Es lassen sich anhand von Korrelationsanalysen mit typisierten Mikrosomen Beteiligungen bestimmter P450 Isoenzyme am Arzneistoffmetabolismus nachweisen.

Cytochrom P450 Enzyme können in ihrer Funktionalität und/oder Expression sehr stark variieren. Die Expression wird durch Enzyminduktion oder Enzyminhibition beeinflusst. Eine Enzyminduktion liegt vor, wenn Xenobiotika die Bildung metabolisierender Enzyme erhöhen. Daraus resultiert eine Erhöhung der absoluten Aktivität und damit der Biotransformationsrate. Für alle Substanzen, die durch das induzierte Enzym metabolisiert werden, verkürzt sich dadurch die Plasmahalbwertszeit und die Wirkdauer. Im Gegensatz dazu werden

Biotransformationen durch Enzyminhibition vermindert. Arzneistoffe unterliegen dann Wirkungsverlängerungen einhergehend mit einer Wirkungssteigerung.

Für einige Isoenzyme (z. B. CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6) sind Polymorphismen bekannt. Ein oder mehrere Isoenzyme können interindividuell sehr stark variieren, was zu einer verstärkten Expression oder zu einem völligen Fehlen des Isoenzym führen kann. Fehlt einem Menschen ein solches Isoenzym, so ist dieser nicht oder nur deutlich langsamer dazu in der Lage, Substrate zu verstoffwechseln (poor metabolizer). Liegt bei einem Menschen hingegen eine extrem hohe Aktivität eines Isoenzym vor, so werden Substrate sehr schnell metabolisiert (ultra-rapid metabolizer) [Ingelmann-Sundberg *et al.*, 1999].

2.1.1.2 Der katalytische Zyklus

Der Mechanismus einer durch das Cytochrom P450 Enzymsystem katalysierten oxidativen Substratumwandlung ist in Abbildung 2.3 wiedergegeben. Das umzuwandelnde Substrat (RH) muss zunächst an einer Substratbindungsstelle in der Nähe des aktiven Zentrums an das Apoprotein gebunden werden (1). Wasser wird von der 6. Koordinationsstelle verdrängt, woraufhin das Fe(III) des Häms vom *low spin* in den *high spin* Zustand wechselt. Das Redoxpotential erhöht sich und ein Substrat lässt sich dadurch schneller reduzieren. In einer Elektronentransferkette wird ein Elektron von NADPH (bzw. NADH) unter Beteiligung der NADPH Cytochrom P450 Reduktase auf das Eisen übertragen, wodurch das Eisen in den zweiwertigen Zustand übergeht (2). Molekularer Sauerstoff wird angelagert (3), welcher in der Lage ist, ein Elektron vom Eisen zu übernehmen (4). Eisen wird dadurch wieder in seinen dreiwertigen Zustand oxidiert. Der entstandene Komplex nimmt in der Folge das zweite Elektron, welches wiederum durch die Reduktase zur Verfügung gestellt wird, auf (5). Mit Hilfe zweier Protonen des oxidierten Flavoproteins kommt es zur Abspaltung eines Sauerstoffatoms unter Bildung von Wasser (6). Der dabei entstandene Oxokomplex ist sehr reaktiv und überträgt sein Sauerstoffatom auf das Substrat (7). In diesem Zuge wird das hydroxylierte Substrat wieder abgespalten und das Cytochrom P450 Enzymsystem steht für einen neuen katalytischen Zyklus zur Verfügung.

Falls der Enzym-Sauerstoff-Komplex zu instabil ist oder kein Substrat zur Verfügung steht, kann es zu einer Entkopplung des katalytischen Zyklus kommen. Spaltet sich der Sauerstoff nach Übertragung des ersten Elektrons ab, so entsteht ein Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$). Spaltet sich der Sauerstoff hingegen nach Übertragung

des zweiten Elektrons ab, so entsteht Peroxid (O_2^{2-}) und anschließend mit zwei Wasserstoffatomen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [Coon *et al.*, 1992].

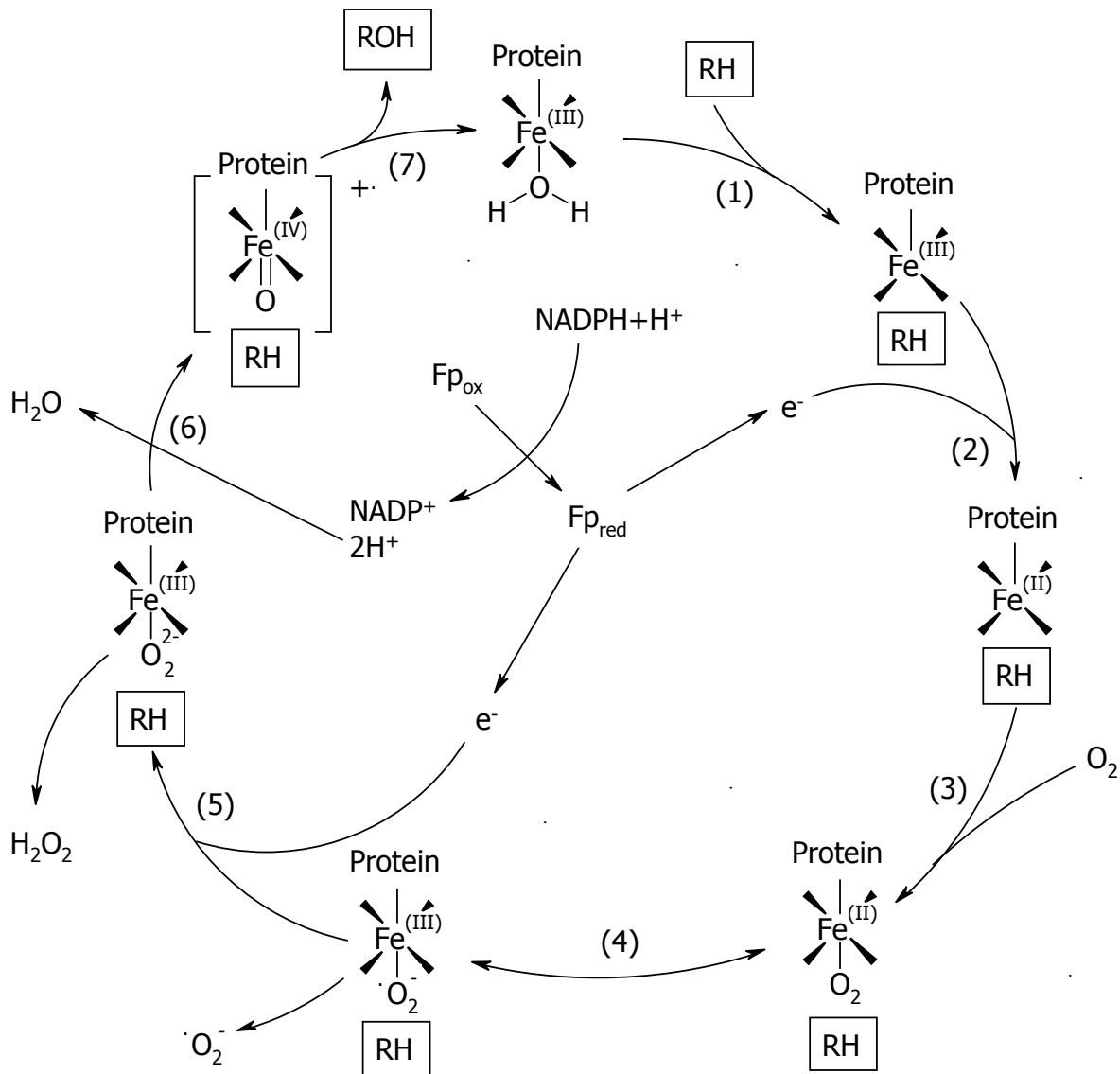


Abb. 2.3: Katalytischer Zyklus der oxidativen Substratumsetzung durch Cytochrom P450 (modifiziert nach Coon *et al.*, 1992) Fe = Hämeisen im katalytischen Zentrum; RH = Substrat; ROH = Produkt; F_p = NADPH-Cytochrom P450 Reduktase

2.1.2 Gewinnung membranständiger Enzyme

Die Molekularbiologie ist in der Lage, Proteine zu klassifizieren und zu identifizieren. Sie erlaubt, isolierte Proteine zu klonen und zu sequenzieren. Gerade bei in geringen Mengen vorliegendem Material ist es leichter, genetisches Material zu untersuchen

als das Protein selbst. Nichtsdestotrotz werden biochemische Untersuchungen sicherlich nie von molekularbiologischen Untersuchungen verdrängt. Voraussetzung für eine Untersuchung ist die Isolierung des Enzyms aus dem Gewebe [Kornberg, 1990].

Liegt ein Enzym isoliert vor, kann es nach verschiedenen Gesichtspunkten charakterisiert werden. Dieses beinhaltet die verschiedensten zur Verfügung stehenden Methoden, beginnend mit der Bestimmung des Molekulargewichts [Laue und Rhodes, 1990], der Identitätsbestimmung [Judd, 1990], führt weiter über die Erhebung biotransformatorischer Daten [Bjornsson *et al.*, 2003] bis hin zur Genklonierung [Wozney, 1990] und Bildung spezifischer Antikörper [Dunbar und Schwoebel, 1990].

Die Reinigung eines Enzyms sollte möglichst spezifische Enzymaktivitätskontrollen zur Überprüfung der Reinigung beinhalten [Smith *et al.*, 1994; Clement *et al.*, 1997]. Immunoblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern stellen eine weitere Möglichkeit dar [Linn, 1990]. Das Enzym sollte im Gewebe in hoher Konzentration vorliegen, um eventuelle Verluste während der Aufarbeitung ausgleichen zu können. Zudem sollte das Gewebe leicht zugänglich sein [Linn, 1990].

Die membranständigen Enzyme sind in intrinsische und extrinsische Proteine zu unterteilen. Erstere sind über Transmembranhelices fest mit der Membran verbunden. Um sie zu reinigen, ist eine Herauslösung aus der Membran mittels Detergentien notwendig. Zudem kann eine Rekonstitution die zusätzliche Anwesenheit von Lipiden bedingen, um eine katalytische Aktivität zu erhalten [Banerjee *et al.*, 1995]. Extrinsische Proteine hingegen sind nur locker mit der Membran verbunden. Eine Veränderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke reicht in der Regel aus, um sie von der Membran abzulösen. Meistens sind sie frei von Lipiden.

Zur Solubilisation der intrinsischen Proteine werden Detergentien eingesetzt. Diese haben ionischen oder nichtionischen Charakter. Die ionischen Detergentien können in anionisch, kationisch oder zwitterionisch unterteilt werden. Ionische Detergentien besitzen in der Regel eine hohe Solubilisationskraft, während nichtionische Detergentien sich weniger stark auf die Enzymaktivität auswirken [Thomas und McNamee, 1990]. In der Regel werden amphiphile Detergentien in wässriger Lösung eingesetzt [Thomas und McNamee, 1990]. Die Auswahlmöglichkeit des einzusetzenden Detergenzes ist groß und muss unter vielen Gesichtspunkten abgewogen werden. Darunter fällt u. a. das „in Lösung halten“ solubilisierter Proteine, da sie häufig aggregieren und ausfallen. Das Detergenz sollte dem

vorbeugen können. Dafür darf es aber die Struktur oder Funktion des Proteins nicht beeinträchtigen [Hjelmeland, 1990; le Maire *et al.*, 2000].

Schließlich sollte das Detergenz der geplanten Reinigung angepasst werden, damit es nicht zu Interaktionen der einzelnen Schritte kommt. Anionische Detergentien interagieren häufig mit Anionenaustauschern. Digitonin und Polyoxyethylen-abkömmlinge bilden große Einschlussverbindungen und sind damit für eine Gelfiltration schlecht geeignet [Thomas und McNamee, 1990]. Phenylhaltige Detergentien absorbieren bei 280 nm und überlagern die UV-Kontrolle der Proteinelution. Auf der anderen Seite kann diese Eigenschaft zur Kontrolle der Detergentienentfernung ausgenutzt werden [Funae und Imaoka, 1985].

Eine gute Solubilisation ist des Weiteren vom vorliegenden Membrantyp, der Detergenzkonzentration und dem Protein-/Detergenzverhältnis abhängig. Somit müssen die idealen Reinigungsbedingungen für das zu untersuchende Enzym empirisch ermittelt werden [Helenius und Simons, 1975].

Die Solubilisationslösung wird in der Regel eine Stunde bei 100.000 *g* zentrifugiert, um nicht-solubilierte Proteine vom Solubilisat abzutrennen. Anschließend steht eine Vielzahl chromatographischer Methoden, wie Affinitäts-, Hydrophobe Interaktions- und Ionenaustauschchromatographie sowie Gelfiltration zur weiteren Auftrennung des Solubilisats zur Verfügung [Pingoud und Urbanke, 1997]. Dabei führt die Kombination mehrerer Methoden häufig zum gewünschten Erfolg. Die gesuchte Enzymaktivität sollte in Bezug auf das Gesamtprotein gesteigert werden [Kornberg, 1990].

Die Reinheit der gewonnenen Enzympräparation kann nicht direkt bestimmt werden. Stattdessen können mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Silberfärbung Verunreinigungen bzw. andere Proteine detektiert und quantifiziert werden [Rhodes und Laue, 1990].

2.1.3 Bisherige Untersuchungen

In früheren Studien wurde die Reduktion *N*-hydroxlierter Verbindungen untersucht. Dabei wurden sowohl verschiedene Spezies und innerhalb dieser auch unterschiedliche Organe verwendet. Ebenso erstreckt sich die Variabilität der eingesetzten Substrate über einen weiten Bereich.

Clement [1988a] und Hauptmann *et al.* [1988] konnten die *N*-Reduktion von Amidoximen zu Amidinen nachweisen. Im Jahre 1994 zeigte Jung mit humanen

Lebermikrosomen die Reduktion des *N*-Dihydroxy-Pentamidins zum Pentamidin. Kurze Zeit später wurde mit der Modellsubstanz Benzamidoxim eine Korrelation zum *N*-Dihydroxy-Pentamidin reduzierenden System aufgestellt [Lomb 1995]. Somit lag es nahe, dass es sich um ein ähnliches, vielleicht sogar das gleiche reduzierende System handeln muss. Lomb konnte weiterhin nachweisen, dass die Reduktion auch mit Schweinelebermikrosomen stattfand. Eine analoge Reduktion des *N*-Hydroxyamidinohydrazons Guanoxabenz durch Kaninchen-, Schweine- und Rattenlebermikrosomen konnte gezeigt werden [Clement und Jung, 1994; Clement *et al.* 1993b; 1996]. Dieses wurde u. a. durch Arbeiten von Mau [2002], Deters [2002] und Lopian [2002] ergänzt, die die Reduktion in verschiedenen Organen (Niere, Gehirn, Lunge, Darm), Organellen (Mikrosomen und Mitochondrien) sowie verschiedenen Spezies (Mensch, Schwein) nachweisen konnten.

Die Reduzierbarkeit anderer *N*-hydroxylierter Verbindungen wie *N*-Hydroxyisothioharnstoffe und *N*-Hydroxyguanidine [Clement und Wissel, 1991; Clement und Kunze, 1992; Clement *et al.*, 1993a] wurde *in vitro* nachgewiesen.

In weiterführenden Studien gelang erstmals die Isolierung und Identifizierung eines für die Reduktion verantwortlichen Enzymsystems in Schweinelebermikrosomen. Dieses besteht aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und einem bislang nicht vollständig identifizierten Cytochrom P450 Enzym der Subfamilie CYP2D [Clement *et al.*, 1997]. Das einzig humane Enzym der Subfamilie CYP2D, welches bisher identifiziert werden konnte, ist das CYP2D6. Durch Testung mit CYP2D6-defekten Mikrosomen konnte die Beteiligung von CYP2D6 an der Reduktion von Amidoximen ausgeschlossen werden. Zudem zeigten Hemmstudien mit Chinidin, einem spezifischen Hemmstoff für CYP2D6, sowie mit einem polyklonalen Antikörper gegen CYP2D6 keinen hemmenden Einfluss auf die Reduktion vom Benzamidoxim zum Benzamidin [Möller, 1997].

Neben den *in vitro*-Studien fanden auch *in vivo*-Studien statt. Hierbei wurden die *N*-dehydroxylierten Metabolite nach Applikation im Plasma von Kaninchen und Ratte nachgewiesen [Clement *et al.* 1992; 1993b]. Behrens [1999] und Rieckert [1999] isolierten aus humanen Lebermikrosomen ein der Schweineleber analoges Enzymsystem. Durch Sequenzierung und Markeraktivitätsbestimmungen wurde es als CYP2A6 identifiziert. Dies konnte durch die Arbeiten von Karhan [2002] und Lopian [2002] bestätigt werden, die aber eine Beteiligung weiterer P450-Isoenzyme als wahrscheinlich ansahen.

Möller [1997] zeigte durch Inhibitorstudien mit polyklonalen Antikörpern gegen CYP2E1 und monoklonalen Antikörpern gegen CYP3A4, dass eine Beteiligung dieser Isoenzyme an der Reduktion als unwahrscheinlich anzusehen ist. In der weiteren Arbeit wurden rekombinante, in Lymphoblasten exprimierte Cytochrom P450

Isoenzyme (CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6-Val, CYP2D6-Met, CYP2E1, CYP3A4, CYP4A11) auf ihre Benzamidoxim-Reduktaseeigenschaften hin untersucht. Diese Isoenzyme sind häufig an Biotransformationen verschiedener Xenobiotika beteiligt, wiesen aber keine metabolische Aktivität in Bezug auf die Reduktion der Modellsubstanz Benzamidoxim auf.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass Cytochrom b_5 und die NADH Cytochrom b_5 Reduktase im Zweikomponentensystem auch zu einer Reduktion von Benzamidoxim führen. Die Umsatzrate ist mit dem Faktor 0,1 deutlich niedriger als nach Zugabe der dritten, aus Schweinelebermikrosomen isolierten, Enzymkomponente.

Havemeyer *et al.* [2006] konnten eine aktive dritte Komponente aus der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien gewinnen und als „*Moco sulphurase C-terminal domain containing 2*“ identifizieren.

2.1.4 Zielsetzung

Lomb [1995] und Möller [1997] identifizierten die mikrosomale Benzamidoxim-Reduktase aus der Schweineleber als Cytochrom P450 Isoenzym der Subfamilie 2D, welches zusammen mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase die *N*-Reduktion katalysiert. Behrens und Rieckert [beide 1999] untersuchten Mikrosomen der humanen Leber im Hinblick auf die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen und fanden das Cytochrom P450 2A6 als die verantwortliche dritte Komponente. Dieses Ergebnis bestätigten Lopian und Karhan [beide 2002] durch ihre Arbeiten, schlossen aber eine Beteiligung weiterer P450 Isoenzyme nicht aus.

Deters und Mau [beide 2002] fanden durch ihre Untersuchungen heraus, dass das *N*-reduktive System nicht allein auf die Leber beschränkt ist, sondern auch in extrahepatischen Geweben wie Niere, Gehirn oder Darm vorkommt. Dabei wurde in der Niere eine höhere Umsatzrate der Benzamidoxim Reduktion festgestellt als in der Leber.

Aufbauend auf diese bekannten Ergebnisse (Kapitel 2.1.3) sollte die verantwortliche mikrosomale dritte Komponente aus der Niere isoliert und charakterisiert werden. Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase sind dabei als zusätzliche Komponenten für das verantwortliche Enzymsystem der Schweineleber zu bestätigen. Die Reinigung sollte anhand der in der Literatur-beschriebenen Methoden zur Gewinnung von Cytochrom P450 Isoenzymen angepasst oder gegebenenfalls modifiziert werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung der Enzympräparation

2.2.1.1 Materialien und Geräte

Sofern nicht angegeben, befindet sich eine Übersicht über die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 der vorliegenden Arbeit.

2.2.1.2 Gewinnung von Schweinenierenmikrosomen

Die Schweinenieren zur Gewinnung der Mikrosomen stammten von einem ortsnahen Schlachter aus Einzelschlachtungen. Die Tiere wurden per Elektroschock getötet, durch Öffnen der Halsschlagader ausgeblutet und anschließend einem Brühbad unterworfen. Danach wurden den Schweinen die Nieren entnommen und in einem 4 °C kalten Transportpuffer (20 mM Kaliumphosphat, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7,4) zum Labor transportiert. Pro Aufarbeitung wurden 8-12 Nieren, sowohl weiblicher Tiere als auch männlicher Kastrate verwendet.

Die folgenden Reinigungsschritte fanden bei 4 °C oder unter Eiskühlung statt. Zunächst wurden die Nieren gehäutet und von ihrer bindegewebsartigen Kapsel entfernt. Eine Perfusion der Nieren wurde mit 50 mM Phosphatpuffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7,4) durchgeführt. Die Gefäße in den Nieren waren sehr klein, so dass die Perfusion nicht ausreichend war. Von den Nieren wurden nur die Rinde sowie das Mark verwendet, Fettgewebe und Sammelbecken wurden verworfen. Die klein geschnittenen Nierenstücke wurden so lange mit 50 mM Phosphatpuffer gespült bis das Waschwasser nahezu farblos blieb. Die gut gespülten Nierenstückchen wurden durch einen handelsüblichen Fleischwolf gegeben. Dieser Vorgang musste zweimal durchgeführt werden, da das Nierengewebe sehr hart und fest war und eine weitere Zerkleinerung sonst nicht möglich gewesen wäre. Die so erhaltene Masse wurde mit gleichem Volumen an 20 mM Phosphatpuffer (250 mM Saccharose, pH 7,4) gemischt und zweimal durch einen Durchflusshomogenisator gegeben [Ziegler und Pettit, 1966]. In den folgenden Schritten wurde nur noch der letztgenannte EDTA freie Puffer verwendet, da das zu verarbeitende Material zu diesem Zeitpunkt blutfrei war. Der Verlust an Volumen durch das Homogenisieren wurde durch Auffüllen mit Puffer wiederhergestellt. Anschließend wurde das entstandene Nierenhomogenat mit Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

Das Homogenat wurde 30 Minuten bei 9.000 *g* (Rotor JA 10) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde zur Abtrennung von Fetten durch Verbandmull koliert. Die vereinigten Überstände wurden für 60 Minuten bei 100.000 *g* (Rotor 45 Ti) der Ultrazentrifugation unterzogen. Der cytosolische Überstand konnte aliquotiert und bei -80 °C eingefroren werden, das erhaltene Pellet wurde mit Puffer in einem Teflon-Glas-Homogenisator resuspendiert und zur weiteren Aufreinigung erneut 60 Minuten bei 100.000 *g* ultrazentrifugiert. Das entstandene mikrosomale Pellet wurde wieder in Puffer resuspendiert, mit Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7,4 eingestellt, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3 Isolierung des zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen verantwortlichen Cytochrom P450 Isoenzym

2.2.1.3.1 Solubilisation

Die Solubilisation wurde mit unterschiedlichen Detergenzkonzentrationen sowie einem Kontrollansatz ohne zugesetztem Detergenz durchgeführt und parallel aufgearbeitet. Sofern nicht anders angegeben, ergab sich folgende Zusammensetzung der Solubilisationsansätze: Schweinenierenmikrosomen wurden mit Solubilisationspuffer (100 mM Kaliumphosphat, 2 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol, 1 M Natriumchlorid, 40 % (w/v) Glycerol, pH 7,4) und Detergenz so verdünnt, dass die entstandene Proteinlösung 5 mg/ml Mikrosomen enthielt. Die Ansätze wurden eine Stunde im Eisbad mit einem Flügelrührer gerührt und anschließend eine Stunde bei 100.000 *g* zentrifugiert, um die solubilisierten Proteine abzutrennen. Das erhaltene Pellet wurde mit detergenzfreiem Standardpuffer (100 mM Kaliumphosphat, 20 % (w/v) Glycerol, pH 7,4) resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Auch der jeweilige Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3.1.1 Polyethylenglykol 6000 Fällung

Nach Solubilisation (Kapitel 2.2.1.3.1) der Schweinenierenmikrosomen wurde die Zentrifugation bei 100.000 *g* nicht durchgeführt. Stattdessen wurde eine 50 %ige Stammlösung von Polyethylenglykol 6000 tropfenweise zugegeben bis das Solubilisat 6 % Polyethylenglykol 6000 enthielt. Dieses Gemisch wurde 20 Minuten im Eisbad mit einem Flügelrührer gerührt und anschließend 10 Minuten bei 5.000 *g* zentrifugiert, um die nicht solubilisierten Proteine abzutrennen. Anschließend wurde

wieder Polyethylenglykol 6000 Lösung zugefügt bis das Solubilisat 9 % Polyethylenglykol 6000 enthielt, das Solubilisat 20 Minuten im Eisbad gerührt und wiederum 10 Minuten bei 5.000 *g* zentrifugiert. Polyethylenglykol 6000 wurde in 3 %-Schritten, bis 24 % erreicht waren, weiter zugeführt. Jede gefällte Fraktion wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Anschließend wurde von jeder Fraktion Proteingehalt und Benzamidoxim-Reduktase Aktivität bestimmt. Die Methode wurde nach Andersson *et al.* [2005] durchgeführt.

2.2.1.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B[®]

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie erfolgte an Octyl-Sepharose CL-4B[®] (Fa. Pharmacia, 2,6 x 35,5 cm, Gelvolumen 190 ml) in Anlehnung an die Methode von Clement *et al.* [1997]. Nach Auftrag des Solubilisats erfolgte die Elution durch einen positiven Stufengradienten der Detergenzkonzentration sowie einen negativen Stufengradienten der Ionenstärke. Die Flussrate betrug 0,83 ml*min⁻¹ und das Volumen der aufgefangenen Fraktionen jeweils 15 ml.

Mittels eines Durchflussphotometers wurde die Elution bei 280 nm (NADH Cytochrom b₅ Reduktase) verfolgt. Ein zusätzliches Elutionsprofil ist durch Vermessen der einzelnen Fraktionen bei 417 nm (Cytochrom b₅) erstellt worden. Außerdem wurden spezielle Aktivitätstests auf Cytochrom b₅, NADH Cytochrom b₅ Reduktase, Cytochrom P450 Enzyme, NADPH Cytochrom P450 Reduktase (siehe Kapitel 2.2.2.2-5) durchgeführt. Alle aktiven Fraktionen wurden in Pools vereinigt, mittels Amicon-Zellen eingengt, umgepuffert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3.2.1 Variation des Detergenzes

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde mit unterschiedlichen Detergentien (Thesit[®], Natriumcholat, Emulgen[®] 911, Zwittergent[®] 3-14) sowie unterschiedlichen Detergenzkonzentrationen (0-2 % (v/v)) durchgeführt. Verwendet wurden die bei 100.000 *g* gewonnenen Überstände, wie unter Kapitel 2.2.1.3.1 beschrieben.

Als Puffer wurde ein 100 mM Phosphatpuffer (1 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 20 % (w/v) Glycerol, 0-500 mM Natriumchlorid, pH 7,4) verwendet. Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial, Detergentien, Salzgradienten und solubilisierter Proteine war eine Erfolgskontrolle nur durch sich wiederholende Aufträge solubilisierter Mikrosomen möglich.

2.2.1.3.2.2 Variation der Salzkonzentration

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0-500 mM Natriumchlorid) durchgeführt. Verwendung fanden die bei 100.000 g gewonnenen Überstände, wie unter 2.2.1.3.1 beschrieben.

Als Puffer wurde ein 100 mM Phosphatpuffer (1 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 20 % (w/v) Glycerol, 0-2 % (v/v) Detergenz, pH 7,4) verwendet. Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial, Detergentien, Salzgradienten und solubilisierter Proteine war eine Erfolgskontrolle nur durch sich wiederholende Aufträge solubilisierter Mikrosomen möglich.

2.2.1.3.3 Präparative HPLC an Fractogel[®] EMD TMAE 650 (S)

Die präparative HPLC-Analytik wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierbei wurde die Säule mit einem Kühlaggregat auf 4 °C gekühlt und die entstandenen Proben in einem mit Eiswasser gekühlten Fraktionssammler gesammelt. Die Puffer wurden ebenfalls in Eiswasser gekühlt. Zuvor wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt und vor der Verwendung entgast.

Die Trennung wurde mit folgendem Chromatographie-System durchgeführt:

HPLC-System:	Biokompatible HPLC-Pumpe, L-6210, Fa. Merck-Hitachi, Darmstadt
Detektor:	UV/VIS-Detektor L-4200, Fa. Merck-Hitachi, Darmstadt
Fraktionssammler:	LKB Frac 200, Fa. Pharmacia
Integrator:	Integrator D-2500, Fa. Merck-Hitachi, Darmstadt
Stationäre Phase:	Superformance [®] -Glaskartuschen-Grundeinheit, Superformance [®] -Glaskartusche gefüllt mit Ionenaustauscher Fractogel [®] EMD TMAE-650 (S) 25-40 µm, 150 x 10 mm
Kühlaggregat:	Julabo F 20, Fa. Julabo Labortechnik, Seelbach

Mobile Phase 1, pH 7,4 (4 °C): 20 mM Tris-Acetat
 20 % (w/v) Glycerol
 0,4 % (w/v) Emulgen 911[®]

Mobile Phase 2, pH 7,4 (4 °C): 20 mM Tris-Acetat
 20 % (w/v) Glycerol
 0,4 % (w/v) Emulgen 911[®]
 1 M Natriumacetat

Laufzeit: 90 min

Flussrate: 1 ml/min

Fraktionsgröße: 1 ml

Gradient:	Zeit (min)	% Puffer 1	% Puffer 2
	0-15	100	0
	15-30	90	10
	30-45	80	20
	45-60	70	30
	60-75	60	40
	75-90	20	80

Injektionsvolumen: 1 ml

Detektion: UV, 280 nm

Das zu trennende Proteingemisch wurde auf die mobile Phase 1 umgepuffert und vor Auftrag durch eine Membranfiltration von partikulären Verunreinigungen befreit. In 1 ml Aliquots wurde die Probe anschließend mittels Probenschleife aus inertem PEEK-Material (Fa. ERC, Altegolfsheim) auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Nach erfolgter Reäquilibration wurde die Elution des gebundenen Proteins anschließend über mehrere Stufengradienten durch Erhöhung der Salzkonzentration durchgeführt. Die eluierten Fraktionen wurden anhand des bei 280 nm aufgenommenen Elutionsprofils, des parallel bestimmten Proteinprofils oder durch Aktivitätstest (NADH Cytochrom b₅ Reduktase (s. Kapitel 2.2.2.4)) gepoolt. Diese gepoolten Fraktionen wurden in Amicon-Zellen einkonzentriert, umgepuffert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3.4 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Folgende Pufferlösungen wurden verwendet:

Äquilibrierpuffer, pH 7,4 (4 °C): 20 mM Tris-Base
 0,1 mM EDTA
 0,1 mM DTT
 0,9 mM Zwittergent[®] 3-14
 20 % (w/v) Glycerol

Elutionspuffer, pH 7,4 (4 °C): 1 M Natriumchlorid in
 Äquilibrierpuffer, pH 7,4

Alle Puffer wurden durch einen Sartorius[®] Membranfilter (0,45 µm) per Vakuumfiltration von Partikeln befreit. Vor der Verwendung wurde der Eluent 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Das erhaltene Solubilisat wurde auf eine DEAE 52-Cellulose SERVACEL[®] Säule (Fa. Serva, 2,5 x 10 cm, 50 ml Gelvolumen) aufgetragen. Zuvor wurde die Säule mit ausreichend Äquilibrierpuffer konditioniert. Nach Auftrag des Solubilisats mit 0,8 ml*min⁻¹ wurde mit weiteren 100 ml Äquilibrierpuffer nachgewaschen. Danach wurde über einen Gradientenformer ein linearer Gradient von 0-1 M Natriumchlorid in einem Volumen von 250 ml erzeugt. Das Eluat wurde in 4 ml Fraktionen aufgefangen, wobei die Pumpe weiterhin mit 0,8 ml*min⁻¹ lief. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C.

Die erhaltenen DEAE-Fraktionen wurden mittels der in Kapitel 2.2.1.3.4.2-15 angegebenen Methoden untersucht. Alle erhaltenen Fraktionen wurden aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3.4.1 Solubilisation

Die Solubilisation der Mikrosomen fand in folgender Lösung statt: 50 mg Mikrosomen, 0,45 mM Zwittergent[®] 3-14, 20 mM Tris-Base, 0,1 mM Dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 20 % Glycerol in einem Endvolumen von 25 ml mit *Aq. bidest.* Das Protein-/Detergenzverhältnis belief sich dabei auf den Faktor vier. Die Lösung wurde auf pH 7,4 mittels Phosphorsäure eingestellt. Danach wurde der Ansatz eine Stunde im Eisbad mit einem Magnetkern gerührt. 200 µl des Solubilisats wurden zu Kontrollzwecken entnommen und bei -80 °C gelagert. Das restliche Solubilisat wurde

auf die Anionenaustauschchromatographie-Säule aufgetragen (Kapitel 2.2.1.3.4). Eine Zentrifugation zur Abtrennung nicht solubilisierter Proteine fand nicht statt.

2.2.1.3.4.2 Protein-Verlaufskontrolle

Die Absorption der eluierten Fraktionen wurde bei 280 nm vermessen. Da der Äquilibrierpuffer eine geringe Eigenabsorption aufwies, wurde dieser Wert von den gemessenen Werten abgezogen.

Zudem wurde der Proteingehalt nach der in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Methode bestimmt.

2.2.1.3.4.3 Cytochrom b_5 -Verlaufskontrolle

Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Cytochrom b_5 Gehalt untersucht. Dabei fand die Cytochrom b_5 -Bestimmung nach der in Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen Methode statt.

2.2.1.3.4.4 NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Verlaufskontrolle

Alle Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie wurde der NADH Cytochrom b_5 Reduktase Bestimmung unterzogen. Die Methode ist in Kapitel 2.2.2.4 wiedergegeben.

2.2.1.3.4.5 Cytochrom P450-Verlaufskontrolle

Zur Bestimmung der Cytochrom P450-Aktivität wurde die in Kapitel 2.2.2.5 beschriebene Methode verwendet.

2.2.1.3.4.6 Monoaminoxidase-Verlaufskontrolle

Zur Bestimmung der Monoaminoxidase-Aktivität wurde die in Kapitel 2.2.2.6 beschriebene Methode verwendet.

2.2.1.3.4.7 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle ohne zusätzliche Enzyme

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet. Das rekonstituierte System bestand aus 10 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben.

2.2.1.3.4.8 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b₅ Reduktase

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet. Das rekonstituierte System bestand aus 10 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion und 0,05 U NADH Cytochrom b₅ Reduktase. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben.

2.2.1.3.4.9 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b₅

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet. Das rekonstituierte System bestand aus 10 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion und 170 pmol Cytochrom b₅. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben.

2.2.1.3.4.10 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b₅ Reduktase und zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b₅

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet. Das rekonstituierte System bestand aus 10 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion, 0,05 U NADH Cytochrom b₅ Reduktase und 170 pmol Cytochrom b₅. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben.

2.2.1.3.4.11 Dextromethorphan-*O*-Demethylierung

Die CYP2D Markeraktivität wurde mittels der *O*-Demethylierung von Dextromethorphan zu Dextrorphan bestimmt. Das rekonstituierte System bestand aus 20 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion und 0,5 U NADPH Cytochrom P450 Reduktase. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.2.3 beschrieben.

2.2.1.3.4.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Überprüfung der Proteinreinigung in den einzelnen Fraktionen wurde mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dargestellt. Die verwendete Methode ist in Kapitel 2.2.2.7 beschrieben.

2.2.1.3.4.13 Massenspektrometrische Analyse

Zur Identifizierung der Proteinbanden im SDS-Gel wurden diese der massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die Methode ist in Kapitel 2.2.2.8 beschrieben.

2.2.1.3.4.14 *nit-1* Rekonstitutions-Assay

Die *nit-1* Rekonstitutionsanalyse diente der Bestimmung der Molybdäncofaktoraktivität. Die Rekonstitution wurde mittels der Nitratreduktaseaktivität der *nit-1* Mutante [Nason *et al.*, 1971] bestimmt und freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Die Methode ist in Kapitel 2.2.2.9 beschrieben.

2.2.1.3.4.15 FormA Analyse

Die FormA Analyse wies spezifisch das Molybdopterin-Grundgerüst nach. Die Bestimmung wurde nach der in Kapitel 2.2.2.10 beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Bestimmung wurde freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt.

Glycerol, pH 7,4) eluiert. Das Eluat wurde einem der nachstehenden Verfahren zur Entfernung des Detergenzes unterzogen.

2.2.1.3.6.1 Calbiosorb®

Das Eluat aus Kapitel 2.2.1.3.6 wurde mit ca. 1 ml des Adsorptionsmaterials Calbiosorb® (EMD Biosciences, San Diego, CA, USA) versetzt und eine Stunde mittels eines Überkopfschüttlers vorsichtig geschüttelt. Nach Sedimentation des Adsorptionsmaterials wurde die Enzympräparation wieder abpipettiert. Zur vollständigen Entfernung der Detergentien musste dieser Vorgang mehrfach wiederholt werden.

2.2.1.3.6.2 Hydroxylapatit

Die Detergenzentfernung an Hydroxylapatit erfolgte an Hydroxylapatit, High Resolution (Fa. Calbiochem, 1,6 x 3,5 cm, Gelvolumen 7 ml). Das Eluat aus Kapitel 2.2.1.3.6 wurde in einem 5 mM Phosphatpuffer (20 % (w/v) Glycerol, 0,05 % Natriumcholat, pH 7,4) umgepuffert. In 1,0 ml Aliquots wurde diese Proteinlösung auf die Hydroxylapatit-Säule aufgetragen. Die Elution wurde bei 280 nm (Absorptionsmaximum des Detergenzes Emulgen 911®) mit einem Durchflussphotometer verfolgt. Die Säule wurde so lange mit einem 5 mM Phosphatpuffer gespült, bis das Durchflussprofil bei 280 nm keine Absorption mehr zeigte. Mittels eines 500 mM Phosphatpuffers (20 % (w/v) Glycerol, 0,05 % Natriumcholat, pH 7,4) konnten die Proteine von der Säule gespült werden. Durch Umpuffern auf Neutralpuffer (100 mM Kaliumphosphat, 20 % (w/v) Glycerol, pH 7,4) wurde das restliche Natriumcholat aus dem Auftrags- und Gradientenpuffer entfernt.

2.2.1.3.6.3 Detergent Out™

Das Eluat aus Kapitel 2.2.1.3.6 wurde auf die Detergent Out™ (EMD Biosciences, San Diego, CA, USA) Säule aufgetragen. Die Detergenzentfernung wurde nach Herstelleranweisung durchgeführt. Nach Entfernung des Detergenzes konnte die detergentenfreie Proteinlösung eluiert werden. Zur vollständigen Entfernung der Detergentien musste dieser Vorgang wiederholt werden.

2.2.1.3.7 Stabilität

Die Gewinnung von Mikrosomen und anschließende Reinigung der Enzympräparation ist ein langer und zeitaufwendiger Prozess. Aus diesem Grund wurden folgende Parameter bezüglich der Stabilität hinsichtlich der zu bestimmenden Reduktase-Aktivität untersucht:

Stabilität bei Lagerung in -80 °C Tiefkühltruhe

Stabilität bei Lagerung im 4 °C Kühlschrank

Stabilität bei Lagerung im 4 °C Kühlschrank nach Solubilisation.

2.2.1.3.8 Lagerung

Sämtliche Enzympräparationen wurden in einer glycerolhaltigen Pufferlösung (100 mM Kaliumphosphat, 20 % (w/v) Glycerol, pH 7,4) bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparationen

2.2.2.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mittels der BCA-Methode [Smith *et al.*, 1985] durchgeführt. Das Arbeitsreagenz (bestehend aus Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, Natriumtartrat und Kupfersulfat in 0,1 N Natronlauge) von Fa. Pierce (Rockford, IL, USA) wurde laut Anleitung für jede Bestimmung frisch hergestellt. 900 µl BCA-Reagenz wurden zu 100 µl Proteinlösung (Verdünnung 1:50 bis 1:100 mit *Aq. bidest.*) gegeben und abweichend von der Firmenvorschrift 20 Minuten bei 60 °C inkubiert. Mittels Eiswasser wurde die Reaktion gestoppt. Innerhalb von drei Minuten wurden die Proben bei 562 nm kolorimetrisch gegen den Blindwert (100 µl Standardphosphatpuffer pH 7,4 als Ersatz für die Proteinlösung) vermessen. Die Auswertung erfolgte durch Erstellung einer Kalibriergeraden mit Rinderserumalbumin in bekannter Konzentration. Diese wurde stets in einem parallelen Ansatz mit dem BCA-Reagenz erstellt.

War der Proteingehalt der Probe sehr gering oder waren Störungen der Bestimmung durch Detergentien oder reduzierende Bestandteile wie Dithiothreitol zu vermuten, so wurde der Proteinbestimmung eine Säurefällung mit Trichloressigsäure vorgeschaltet. Das Arbeitsreagenz (bestehend aus UPPATM - I Reagenz und UPPATM - II Reagenz) von Fa. Pierce (Rockford, IL, USA) wurde laut Arbeitsanweisung verwendet. 250 µl

Reagenz 1 wurden zu 50 µl Proteinlösung gegeben, kurz gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Nach Zufügen von 250 µl Reagenz 2 und kurzem Mischen wurde fünf Minuten bei 10.000 U*min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Anschließend wurde das gefällte Protein in 300 µl BCA-Reagenz durch kräftiges Mischen wieder gelöst. 200 µl dieser Lösung wurden im Microplaterreader 20 Minuten bei 44 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 562 nm kolorimetrisch gegen den Blindwert vermessen. Die Auswertung erfolgte durch Erstellung einer Kalibriergeraden mit Rinderserumalbumin in bekannter Konzentration. Die Kalibriergerade wurde stets in einem parallelen Ansatz mit dem BCA-Reagenz erzeugt, wobei die einzelnen Standards unter den gleichen Bedingungen aufgearbeitet und inkubiert wurden, wie die zu untersuchenden Proben.

2.2.2.2 NADPH Cytochrom P450 Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die NADPH Cytochrom P450 Reduktase-Aktivitätsbestimmung erfolgte mit Modifikationen nach der Methode von Sottocasa *et al.* [1967]. Hierbei wurde die Reduktion von Cytochrom c spektralphotometrisch vermessen, indem die Absorptionsänderung bei 550 nm verfolgt wurde, da das reduzierte Cytochrom c hier sein Absorptionsmaximum besitzt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon=21 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ für die reduzierte Form des Cytochrom c herangezogen [Kamin *et al.*, 1965].

Die Zusammensetzung des Enzymassays stellte sich wie folgt dar: 2-25 µg Protein, 100 µM NADPH, 40-100 µM Cytochrom c, 0,05 % (v/v) Triton[®] X-100 und 300 µM Kaliumcyanid in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5. Alle Reagentien wurden stets frisch hergestellt. Präparationsabhängig wurden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt. Die Messzeit betrug 20 Sekunden bei 30 °C. Die Enzymaktivität ist im Folgenden in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute 1 µmol Cytochrom c umsetzt.

2.2.2.3 Cytochrom b₅-Gehaltsbestimmung

Cytochrom b₅ wurde anhand des Differenzspektrums der reduzierten und oxidierten Form von Cytochrom b₅ bestimmt. Die Methode wurde modifiziert durchgeführt nach Estabrook und Werringloer [1978]. Die Bestimmung beruht auf der Reduktion des Cytochrom b₅, die durch eine Absorptionszunahme bei ~ 426 nm und eine -abnahme bei ~ 409 nm charakterisiert ist. Die Probe wurde entweder unverdünnt oder mit

100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 verdünnt. Nach Aufnahme des ersten Absorptionsspektrums (400-500 nm) wurde eine gewisse Menge einer 60 mM NADH-Lösung (in 100 mM Kaliumphosphatpuffer) zugesetzt, bis die erhaltenen Daten im linearen Bereich lagen. Im Abstand von 60 Sekunden wurde das zweite Spektrum der NADH-reduzierten Präparation aufgenommen. Durch Subtraktion beider Spektren erhielt man ein Differenzspektrum. Die resultierende Absorptionsdifferenz zwischen dem Absorptionsmaximum bei ~ 426 nm und dem -minimum bei ~ 409 nm wurde zur Berechnung des Cytochrom b_5 -Gehaltes herangezogen.

Hierbei wurde nach und nach so viel NADH-Lösung zugegeben, bis die Absorptionsdifferenz zwischen 426 nm und 409 nm maximal war.

Zur Berechnung diente der empirisch ermittelte Absorptionskoeffizient $\epsilon=185 \text{ nM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [Estabrook und Werringloer, 1978].

2.2.2.4 NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivitätsbestimmung

NADH Cytochrom b_5 Reduktase wurde nach der Methode von Mihara und Sato [1978] spektrophotometrisch bestimmt. Die Bestimmung erfolgte durch die Absorptionsabnahme bei 420 nm von Kaliumhexacyanoferrat(III) zu Kaliumhexacyanoferrat(II) nach Zugabe des Cosubstrates. Die Messzeit betrug 60 Sekunden bei 25 °C.

Die Zusammensetzung des Enzymassays stellte sich wie folgt dar: 2-25 μg Protein, 0,1 mM NADH und 1 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5. Alle Reagenzien wurden stets frisch hergestellt, die Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung wurde zudem lichtgeschützt gelagert.

Durch die Reduktion des Eisenkomplexes und der dabei auftretenden Absorptionsabnahme bei 420 nm konnte über den Absorptionskoeffizienten $\epsilon=1,02 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ die Aktivität der Reduktion bestimmt werden [Mihara und Sato, 1978]. Die Enzymaktivität ist im Folgenden in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute 1 μmol Kaliumhexacyanoferrat(III) umsetzt.

2.2.2.5 Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung

Der Cytochrom P450-Gehalt wurde in modifizierter Form nach der Methode von Omura und Sato [1964] spektrophotometrisch mittels des Differenzspektrums zwischen reduziertem Komplex aus Cytochrom P450 und Kohlenmonoxid sowie reduziertem Cytochrom P450 bestimmt. Die Proteinprobe wurde mit 100 mM

Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 verdünnt. Hatte die Proteinlösung eine zu starke Streuung, so wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,02 % (v/v) Triton[®] X-100 zugesetzt. Die Proteinlösung wurde mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt. Nach zwei Minuten wurde das erste Absorptionsspektrum (400-500 nm) der dithionitreduzierten Präparation aufgenommen. Nach weiteren zwei Minuten wurde 30 Sekunden lang Kohlenmonoxid in die Probe eingeleitet. Das zweite Differenzspektrum wurde nach zwei Minuten aufgezeichnet. Von diesem Spektrum wurde das erste Spektrum abgezogen, um das Cytochrom P450 Differenzspektrum zu erhalten.

Das Messprinzip beruht auf der Zunahme der Absorption bei 450 nm des dithionitreduzierten Komplexes bestehend aus Cytochrom P450 und Kohlenmonoxid. Zur Berechnung des Gehaltes wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon=91 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ des reduzierten P450-Kohlenmonoxid-Komplexes verwendet [Omura und Sato, 1964].

2.2.2.6 Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung

Die Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung wurde modifiziert nach der Methode von Kline *et al.* [1986] bestimmt.

Folgende Zusammensetzung wurde für den Enzymassay genutzt: in 500 μl Gesamtvolumen waren etwa 80 μg mikrosomales Protein, 10 mM Benzylamin-HCl, 0,05 % (v/v) Triton X-100 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 enthalten. Alle Reagenzien wurden stets frisch hergestellt. Durch Zugabe des Benzylamin-HCl wurde die Reaktion gestartet. Die Absorptionzunahme bei 250 nm wurde über eine Messzeit von einer Minute bei 30 °C bestimmt.

Das Messprinzip beruht auf der enzymatisch katalysierten Bildung von Benzaldehyd. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon=13 \text{ nM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ für Benzaldehyd [Tabor *et al.*, 1954] verwendet.

Die Enzymaktivität ist im Folgenden in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute 1 μmol Benzylamin-HCl umsetzt.

2.2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach der von Laemmli [1970] beschriebenen diskontinuierlichen Methode durchgeführt. Als Trenngele kamen normalerweise 12 %ige Gele, als Sammelgele 5 %ige Gele zum Einsatz. Die Proben und Standards wurden durch Erhitzen mit SDS und β -Mercaptoethanol vorbehandelt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Anfärbung mit Coomassie-Blau oder Silber.

Verwendete Lösungen:

Alle Lösungen wurden stets frisch mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Stammlösungen wurden innerhalb kurzer Zeit aufgebraucht und während dieser Zeit im Kühlschrank gelagert.

Die folgenden Lösungen, Puffer, Gele und Materialien wurden verwendet:

Elektrophoresepuffer, pH 8,3:	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer, pH 6,8:	250 mM Tris-Base 0,2 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer, pH 8,8:	750 mM Tris-Base 0,2 % (w/v) SDS
Probenauftragspuffer:	25 % (w/v) Trenngelpuffer, pH 8,8 2 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Glycerol 5 % (w/v) β -Mercaptoethanol 0,001 % (w/v) Bromphenolblau
Acrylamidlösung:	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
APS-Lösung:	2 % (w/v) Ammoniumpersulfat
12 %iges Trenngel:	15 ml Trenngelpuffer 12,3 ml Acrylamidlösung 2,7 ml <i>Aq. bidest.</i> 0,1 ml APS-Lösung 0,03 ml TEMED 30
5 %iges Sammelgel:	5 ml Sammelgelpuffer 1,7 ml Acrylamidlösung 3,3 ml <i>Aq. bidest.</i> 0,03 ml APS-Lösung 0,01 ml TEMED 30

Durchführung:

Zwei Glasplatten wurden durch zwei Abstandshalter (Dicke 1,5 mm) getrennt in den Gießstand eingebaut. Das Trenngel wurde nach Vorschrift hergestellt und in den Gießstand eingefüllt, so dass 11 cm Trennstrecke entstanden. Dieses Gel wurde mit etwa 2 ml *Aq. bidest.* überschichtet und eine Stunde zur Polymerisation stehengelassen. Danach wurde das Wasser wieder vollständig entfernt und der Taschenkamm eingebaut. Je nach Probenaufkommen wurde ein Zehn- oder Fünfzehn-Taschenkamm verwendet. Das Sammelgel konnte nun zwischen die Glasplatten bis zur Oberkante eingefüllt werden. Hiernach polymerisierte auch dieses Gel für eine Stunde, bevor der Kamm wieder vorsichtig entfernt werden konnte. Die Probenaschen wurden mehrfach mit Elektrophoresepuffer gespült.

Die Proteinproben wurden mit Probenauftragspuffer verdünnt, so dass sie einen Proteingehalt von 1-20 µg je nach Reinheitsgrad hatten. Diese Proteinverdünnungen wurden etwa fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und vor dem Probenauftrag fünf Minuten bei 10.000 U*min⁻¹ zentrifugiert.

Als Molekulargewicht-Marker wurde ein Low Molecular Weight Standard (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet: Phosphorylase (M_r=98 kDa), Albumin (M_r=66 kDa), Ovalbumin (M_r=45 kDa), Carboanhydrase (M_r=30 kDa), Trypsin Inhibitor (M_r=20,1 kDa) und α-Lactalbumin (M_r=14,4 kDa).

Das Gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer gehängt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet.

Laufbedingungen:

Während der Laufzeit im Sammelgel wurde eine konstante Stromstärke von 25 mA angelegt. Nach Übergang ins Trenngel wurde diese Stromstärke auf 50 mA erhöht. Die Trennung wurde beendet, wenn der Marker Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte (ca. vier Stunden). Durch Kühlung konnte die Temperatur konstant bei 10 °C gehalten werden.

Coomassie-Blau-Färbung:

Coomassie-Blau-Lösung: 2 % (w/v) Coomassie® Brilliant blue R 250
 10 % (v/v) Eisessig
 25 % (v/v) Isopropanol

Entfärbelösung:

12,5 % (v/v) Eisessig
12,5 % (v/v) Isopropanol

Das Gel wurde vorsichtig aus den Platten herausgelöst und für zwei Stunden in der Coomassie-Blau-Lösung gefärbt. Danach wurde das Gel in der Entfärbelösung so lange entfärbt, bis der Hintergrund weitestgehend farblos wurde und die Banden gut zu erkennen waren.

Silberfärbung:

Zur Färbung wurde ein Bio-Rad Silver Stain Kit (Bio-Rad, München) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Trocknen der Gele:

Das gefärbte Gel wurde auf ein dafür vorgesehenes Filterpapier überführt und mit einer Cellophan-Folie bündig abgedeckt. Danach wurde das Gel im Geltrockner bei 70 °C und Vakuum vier Stunden getrocknet.

2.2.2.8 Massenspektrometrische Analyse

Die Proteinbanden der SDS-PAGE wurden ausgeschnitten und der ESI-Analyse zugeführt. Die reduzierten und alkylierten Proben wurden über Nacht durch Trypsin hydrolysiert. Nach Einstellen eines sauren pH-Wertes wurden die Peptide des Hydrolyse-Überstandes durch die nano-HPLC getrennt und mit ESI in der Q-TOF MS/MS analysiert. Zuvor wurde das Massenspektrometer mit Renin kalibriert.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden freundlicher Weise von Richard Jones, Ph. D. (Division of Systems Toxicology, FDA/NCTR, Jefferson, AR 72079) durchgeführt.

2.2.2.9 *nit-1* Rekonstitutions-Analyse

Die *nit-1* Rekonstitutionsanalyse diente der Bestimmung der Molybdäncofaktor-Aktivität. In der *nit-1* Mutante wird kein Molybdäncofaktor gebildet. Deshalb kann die Nitratreduktaseaktivität nur durch extern zugegebenen Molybdäncofaktor rekonstituiert werden. Entstehendes Nitrit wird über eine Azokupplungsreaktion nachgewiesen.

Die Rekonstitution wurde mittels der Nitratreduktaseaktivität der *nit-1* Mutante (*N. crassa*) [Nason *et al.*, 1971] bestimmt und freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Die mikrosomalen Proteinproben wurden jeweils mit 20 μl *nit-1* Extrakt, 5 mM Molybdat und 2 mM Glutathion versetzt. Der Ansatz wurde fünf Minuten entgast und in einem stickstoffgefüllten Exsikkator für zwei Stunden bei 25 °C dunkel inkubiert. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch 0,1 mg NADPH zugefügt und für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Durch Zugabe des 1,5-fachen Volumens der Reaktionslösung (100 mM KNO_3 /0,1 mM FAD (im Verhältnis 2:1)) wurde die rekonstituierte Nitratreduktase induziert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Das Abstoppen der Induktion erfolgte durch fünfminütiges Denaturieren bei 95 °C. Das Messprinzip beruht auf der enzymatisch katalysierten Nitritbildung und deren Nachweis über eine nachgeschaltete Azokupplung.

Das gebildete Nitrit wurde durch Zugabe von je 250 μl 1 %igem (w/v) Sulfanilamid (in 3 M HCl) und 0,02 % (w/v) Naphthyl-Ethylendiamin bei 540 nm photometrisch über eine zuvor erstellte Kalibriergerade quantifiziert.

Die Molybdäncofaktor-Aktivität wird in der vorliegenden Arbeit in $\text{nmol Nitrit} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ angegeben.

2.2.2.10 FormA Analyse

Die FormA Analyse wurde nach der Methode von Johnson und Rajagopalan [1982] freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt.

Die aufwendige Nachweisreaktion wurde für die Benzamidoxim-reduktaseaktiven Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie (Kapitel 2.2.1.3.4) durchgeführt. Dabei wurden sowohl die molybdänhaltige als auch die molybdänfreie Form (Kap. 6.1.4) detektiert.

Der nachgewiesene Molybdoptergehalt ist in $\text{pmol FormA} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein angegeben.

2.2.2.11 Immunoblot-Analyse

Die Immunoblot-Analysen wurden freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) nach folgendem Protokoll durchgeführt. Dabei wurden nachstehende Pufferlösungen stets frisch hergestellt:

Transferpuffer:	10 % (v/v) Methanol 25 mM Tris-HCl 190 mM Glycin (pH-Wert nicht eingestellt)
TBS-Puffer, pH 7,5:	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
PonceauS-Lösung:	5 % (w/v) in TBS-Puffer
Blockierungslösung:	2 % (w/v) BSA in TBS-Puffer
TBSTXS-Puffer:	0,1 % (w/v) BSA 0,05 % (v/v) Triton [®] X-100 0,05 % (w/v) SDS in TBS-Puffer

Das SDS-Gel mit den aufgetrennten SDS-Banden wurde für etwa zehn Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer der Proteine in einem diskontinuierlichen semi-dry-Blot auf die Trägermembran (HybondTM-P, Amersham Biosciences, Freiburg; Roti[®]-PVDF, Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe) wurden vier Lagen transferpuffergetränktes Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Apparatur gelegt, bevor die Membran (zuvor mit Methanol benetzt, mit Wasser gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert), das Gel mit der Oberseite nach unten und weiteren vier Lagen Whatman-Papier aufgebracht wurden. Das Blotting erfolgte bei 32 mA mit $0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ für zwei Stunden. Nach Waschen des Blots in TBS-Puffer wurden die transferierten Proteine reversibel mit PonceauS-Lösung angefärbt.

Für den immunologischen Nachweis der transferierten Proteine wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert, bevor der 1:7000 in Blockierungslösung verdünnte Antikörper (gerichtet und aufgereinigt gegen den rekombinanten C-Terminus der Molybdäncofaktor-Sulfurase ABA3 aus *A. thaliana*) zugegeben wurde. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Schwenken die Membran dreimal acht Minuten mit TBSTXS-Puffer und anschließend einmal zehn Minuten mit 0,8 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. An eine erneute fünfminütige Blockierung schloss sich die Inkubation mit dem sekundären *horseradish-peroxidase-linked* Antikörper Anti-Rabbit-IgG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Verdünnung 1:10000) für weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken an. Nach

erneutem Waschen mit TBSTXS-Puffer und 0,8 % NaCl-Lösung erfolgte die ECL Detektion nach dem Standardprotokoll des Herstellers (Amersham Biosciences, Freiburg).

2.2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktase

2.2.3.1 Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin

Die *N*-reduktive Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet.

2.2.3.1.1 Synthese von Benzamidoxim

Benzamidoxim wurde nach der Methode von Krüger [1885] aus Benzonitril und Hydroxylamin synthetisiert und nach den üblichen Methoden auf Identität und Reinheit geprüft.

2.2.3.1.2 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die mikrosomalen Biotransformationsstudien setzte sich aus 100 µg mikrosomalem Protein, 500 µM NADH und 800 µM Benzamidoxim in 300 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3 zusammen.

Zunächst wurden die Mikrosomen bei 37 °C zwei Minuten vorinkubiert, dann das Benzamidoxim zugegeben und nach weiteren drei Minuten Vorinkubation die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 300 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 *g* trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

2.2.3.1.3 HPLC-Analytik

In Anlehnung an die von Friedrich [2003] entwickelte Methode wurde gebildetes Benzamidin mittels HPLC-Analytik bestimmt.

Der Eluent wurde durch einen Sartorius[®] Membranfilter (0,45 µm) per Vakuumfiltration von Partikeln befreit. Vor der Verwendung wurde der Eluent 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

HPLC-Pumpe und Controller: Waters 600 E Multisolvent Delivery System

Detektor: Waters 486 TAD UV

Autosampler: Waters 700 Satellite WISP

Integrator: EZChrom Client Chromatography Software Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA)

Stationäre Phase: LiChroCART 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher[®] 60 RP-select B (5 µm), Vorsäule RP-select B, 4 x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Mobile Phase: 10 mM 1-Octylsulfonat in *Aq. bidest.*/Acetonitril 82,5:17,5 (v/v) (pH-Wert nicht eingestellt)

Laufzeit: 28 min

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: UV, 229 nm

Die Retentionszeiten lagen bei $8,0 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidoxim) und $24,2 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidin).

Die Kalibrierung zur Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Benzamidin erfolgte mit sieben verschiedenen Konzentrationen im Bereich 0-250 µM in Fließmittel gelöst und wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen. Für jede Konzentration wurden zwei Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt

vermessen wurden. In diesem Bereich verlief die Kalibrierung linear mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9997$. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde den Inkubationsansätzen die für die Kalibrierung verwendeten Benzamidin-Konzentrationen zugesetzt. In Abwesenheit des Cosubstrates NADH sowie nach Denaturierung der Proteinpräparation wurden die Proben analog zur Methode 2.2.3.1.2 vermessen. Benzamidin konnte im angegebenen Konzentrationsbereich (bis 250 μM) quantifiziert werden. Die Wiederfindungsrate betrug $98\pm 9\%$.

2.2.3.1.4 Anaerobe Inkubationsbedingungen

Der Inkubationsansatz entsprach der in Kapitel 2.2.3.1.2 beschriebenen Standardzusammensetzung.

Für die Durchführung wurden Modifikationen vorgenommen. Protein und Substrat wurden in einem mit Argon begasten Exsikkator mit 37 °C warmen Kaliumphosphatpuffer vorinkubiert. Während dieser Vorinkubationszeit wurde der Exsikkator dreimal evakuiert und erneut mit Argon befüllt. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates wurden die Reaktionsgefäße in der Argonatmosphäre verschlossen und im 37 °C Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 300 μl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 g trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

2.2.3.1.5 Hemmstudien

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurde die für die mikrosomale Fraktion gültige Standardzusammensetzung (s. Kapitel 2.2.3.1.2) unter Standardbedingungen verwendet.

IC_{50} Inhibitorkonzentrationen wurden mit dem Programm Sigma Plot 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) berechnet.

Je nach Hemmstoff wurden einzelne Modifikationen durchgeführt. Um allen Hemmstoffen ausreichend Zeit zu bieten mit den Enzymen wechselwirken zu können, ohne dabei durch das Substrat gestört zu werden, wurden die Reaktionen nicht wie üblich durch das Cosubstrat gestartet, sondern mit dem Substrat selbst.

2.2.3.1.5.1 Kaliumcyanid

Es wurde eine 30-minütige Vorinkubation des Proteins mit Kaliumcyanid und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von 300 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

2.2.3.1.5.2 Hydroxylamin-HCl

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit Hydroxylamin-HCl und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von 300 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

2.2.3.1.5.3 *p*-Hydroxymercuribenzoat

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit *p*-Hydroxymercuribenzoat und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von 300 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

2.2.3.1.5.4 Cytochrom c

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit Cytochrom c und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von 300 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g*

zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

2.2.3.1.5.5 Kohlenmonoxid

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 15 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die mikrosomalen Biotransformationsstudien setzte sich aus 1333 µg mikrosomalem Protein, 500 µM NADH, 800 µM Benzamidoxim in 2 ml eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3 zusammen.

Zunächst wurden die Mikrosomen bei 37 °C mit Benzamidoxim zwei Minuten vorinkubiert, dann 30 Sekunden mit Kohlenmonoxid begast und nach weiteren fünf Minuten Vorinkubation die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 *g* trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

2.2.3.1.5.6 Natriumvanadat

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit Natriumvanadat und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von 300 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

2.2.3.1.6 Rekonstitution des P450-Isoenzym zur Reduktion von Benzamidin

Die Zusammensetzung und Durchführung erfolgte modifiziert nach Clement *et al.* [1997] sowie Clement und Lopian [2003]. Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die rekonstituierten mikrosomalen Biotransformationsstudien setzte sich aus 10 µg gereinigter mikrosomaler *N*-reduktiver Enzymfraktion, 0,05 U NADH-Cytochrom *b*₅ Reduktase, 100 pmol

Cytochrom b_5 , 1000 μM NADH und 500 μM Benzamidoxim in 150 μl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3 zusammen.

Zunächst wurde das rekonstituierte System bei 37 °C zwei Minuten vorinkubiert und dann das Benzamidoxim zugegeben. Nach weiteren drei Minuten Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet und nach 20 Minuten durch Zugabe von 150 μl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 g trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

2.2.3.2 O-Demethylierung von Dextromethorphan

Die Markeraktivität für CYP2D6 wurde in der vorliegenden Arbeit über die O-Demethylierung von Dextromethorphan zu Dextrorphan bestimmt.

2.2.3.2.1 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die mikrosomalen Biotransformationsstudien setzte sich aus 500 μg mikrosomalem Protein, 200 μM NADPH und 100 μM Dextromethorphan in 300 μl eines 40 mM Kaliumphosphatpuffers pH 7,4 mit 3,3 mM Magnesiumchlorid zusammen.

Zunächst wurden die Mikrosomen bei 37 °C zwei Minuten vorinkubiert und dann das Dextromethorphan zugegeben. Nach weiteren drei Minuten Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von NADPH gestartet und nach 30 Minuten durch Zugabe von 300 μl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und anschließend einer Zentrifugation bei 12.000 g unterzogen, die das denaturierte Protein abtrennte. Gebildetes Dextrorphan wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.2.2 beschriebenen Analytik quantifiziert.

2.2.3.2.2 HPLC-Analytik

In Anlehnung an die von Harsdorf [1998] entwickelte Methode wurde gebildetes Dextrorphan mittels HPLC-Analytik bestimmt.

Der Eluent wurde durch einen Sartorius® Membranfilter (0,45 µm) per Vakuumfiltration von Partikeln befreit. Vor der Verwendung wurde der Eluent 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

HPLC-Pumpe und Controller: Waters 600

Detektor: Waters 474 Fluorescence Detector

Autosampler: Waters 717 plus

Integrator: EZChrom Client Chromatography Software Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA)

Stationäre Phase: Symmetry C18, 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm (Waters), Vorsäule Phenomenex C18, 4 x 3 mm

Mobile Phase: 1 % Essigsäure in *Aq. bidest.* (pH 4,5, eingestellt mit konz. Ammoniak)/ Acetonitril 70:30 (v/v)

Laufzeit: 15 min

Flussrate: 0,9 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl

Detektion: Fluoreszenz: Ex 227 nm, Em 311 nm

Detektoreinstellung: Gain: 100; Attenuation: 128

Die Retentionszeiten lagen bei $8,3 \pm 0,2$ Minuten (Dextrorphan) und $11 \pm 0,2$ Minuten (Dextromethorphan).

Die Kalibrierung zur Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Dextrorphan erfolgte mit vier verschiedenen Konzentrationen im Bereich 0-10 µM in Fließmittel gelöst und wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen. Für jede Konzentration wurden zwei Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt vermessen wurden. In diesem Bereich verlief die Kalibrierung linear mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9997$. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde den Inkubationsansätzen die für die Kalibrierung verwendeten Dextrorphan-

Konzentrationen zugesetzt. In Abwesenheit des Cosubstrates NADPH sowie nach Denaturierung der Proteinpräparation wurden die Proben analog zur Methode 2.2.3.2.2 vermessen. Dextrorphan konnte im angegebenen Konzentrationsbereich (0-10 μM) quantifiziert werden. Die Wiederfindungsrate betrug $115 \pm 4 \%$.

2.2.3.2.3 Rekonstitution der DEAE-Fractionen zur *O*-Demethylierung von Dextromethorphan

Die Zusammensetzung und Durchführung erfolgte modifiziert nach der Methode von Möller [1997]. Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die rekonstituierten mikrosomalen Biotransformationsstudien setzte sich aus 20 μl DEAE-Fraktion (Kapitel 2.2.1.3.4), 0,5 U NADPH Cytochrom P450 Reduktase, 200 μM NADPH, 100 μM Dextromethorphan und 40 μM DLPC in 150 μl eines 40 mM Kaliumphosphatpuffers pH 7,4 mit 3,3 mM Magnesiumchlorid zusammen. Zunächst wurde das rekonstituierte System bei 37 °C zwei Minuten vorinkubiert, dann das Dextromethorphan zugegeben und nach weiteren drei Minuten Vorinkubation die Reaktion durch Zugabe von NADPH gestartet. Nach 60 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und anschließend einer Zentrifugation bei 12.000 g unterzogen, die das denaturierte Protein abtrennte. Gebildetes Dextrorphan wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.2.2 beschriebenen Analytik quantifiziert.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Solubilisationsstudien

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 gezeigt, war die Solubilisation der Mikrosomen der Ausgangsschritt zur Isolierung membrangebundener Proteine. Bezüglich ihrer Solubilisationseffizienz wurden vier Detergentien verglichen. Dazu gehörten die für die mikrosomale Benzamidoximreduktase aus Schweineleber bereits etablierten Detergentien Thesit[®], Cholat [Clement *et al.*, 1997] sowie Emulgen 911[®], welches sehr häufig speziell zur Gewinnung von Cytochrom P450 Isoenzymen verwendet wurde [Yoshimoto *et al.*, 1986; Imaoka und Funae, 1986; Kastner und Neubert, 1991]. Zusätzlich wurde Zwittergent[®] 3-14 untersucht, dessen zwitterionischer, amphiphiler Aufbau dem Phosphatidylethanolamin und Lecithin [Gonenne und Ernst, 1978] ähnelt und somit die natürlich vorkommende Membran am besten imitiert.

Es ist allgemein gültig, dass ein Protein als solubilisiert gilt, wenn es sich nach Detergenzbehandlung im 100.000 *g* Überstand befindet [Hjelmeland, 1990].

Detergentien bringen oftmals ein falsch positives Ergebnis bei der Proteinbestimmung nach der BCA-Methode [Brown *et al.*, 1989] sowie einen nicht vorhersehbaren Einfluss auf die Enzymaktivität. Daher wurde der nicht solubilisierte Anteil des resultierenden 100.000 *g* Pellets hinsichtlich der Enzymaktivität quantifiziert und gegen einen Kontrollansatz ohne Detergenz vermessen.

Die Solubilisationseffizienz der untersuchten Detergentien war teilweise unterschiedlich. Thesit[®] und Emulgen[®] 911 zeigten sehr ähnliche Eigenschaften, so dass die Daten stellvertretend an Thesit[®] gezeigt werden (Abb. 2.4).

Das anionische Tensid Cholsäure sowie das zwitterionische Tensid Zwittergent[®] 3-14 zeigten einen geringen Einfluß auf die *N*-reduktive Aktivität (Abb. 2.5-6) unter den angegebenen Bedingungen.

Des Weiteren wurde für die einzelnen Detergentien neben der Effizienz auch der Einfluss auf die Benzamidoxim-Reduktase untersucht. Dieses wurde durch Zugabe steigender Mengen Detergenz zum Standardinkubationsansatz (Kapitel 2.2.3.1.2) überprüft.

Die nichtionischen Detergentien Thesit[®] und Emulgen[®] 911 zeigten schon bei geringen Konzentrationen im Standardinkubationsansatz eine starke Hemmwirkung auf die Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität (Abb. 2.4, Daten Emulgen[®] 911 nicht gezeigt).

Hingegen war die Wirkung auf die Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität der ionischen Detergentien eher mild, im Fall des Zwittergent® 3-14 zu Beginn sogar aktivierend (Abb. 2.5-6).

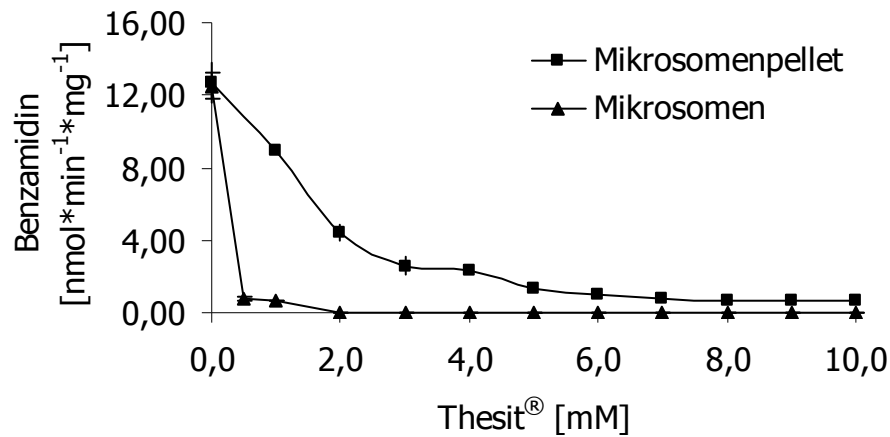


Abb. 2.4: Thesit® Solubilisation mit Schweinenierenmikrosomen: Die Solubilisation wurde nach der in Kapitel 2.2.1.3.1 beschriebenen Methode für die einzelnen Detergentien durchgeführt. Mittels des jeweils resuspendierten Proteinpellets wurde gebildetes Benzamidin nach der in Kapitel 2.2.3.1.4 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die hemmende Wirkung der Detergentien auf die N-reduktive Wirkung wurde in den angegebenen Konzentrationen nach der Methode in Kapitel 2.2.1.3.1 durchgeführt und mit der HPLC-Analytik in Kapitel 2.2.3.1.4 quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

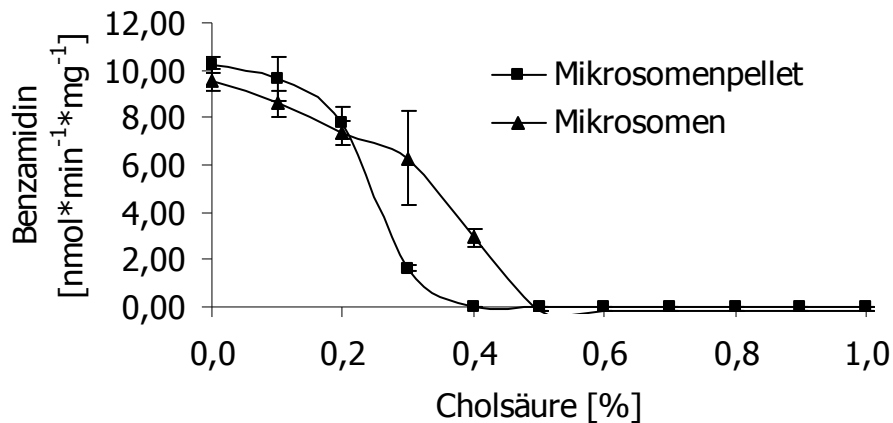


Abb. 2.5: Cholsäure Solubilisation mit Schweinenierenmikrosomen: Die Solubilisation wurde nach der in Kapitel 2.2.1.3.1 beschriebenen Methode für die einzelnen Detergentien durchgeführt. Mittels des jeweils resuspendierten Proteinpellets wurde gebildetes Benzamidin nach der in Kapitel 2.2.3.1.4 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die hemmende Wirkung der Detergentien auf die N-reduktive Wirkung wurde in den angegebenen Konzentrationen nach der Methode in Kapitel 2.2.1.3.1 durchgeführt und mit der HPLC-Analytik in Kapitel 2.2.3.1.4 quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

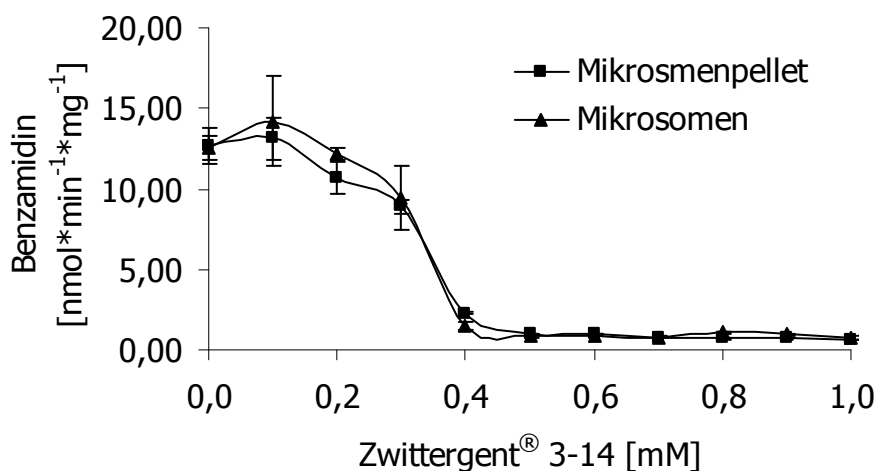


Abb. 2.6: Zwittergent® 3-14 Solubilisation mit Schweinenierenmikrosomen: Die Solubilisation wurde nach der in Kapitel 2.2.1.3.1 beschriebenen Methode für die einzelnen Detergentien durchgeführt. Mittels des jeweils resuspendierten Proteinpellets wurde gebildetes Benzamidin nach der in Kapitel 2.2.3.1.4 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die hemmende Wirkung der Detergentien auf die N-reduktive Wirkung wurde in den angegebenen Konzentrationen nach der Methode in Kapitel 2.2.1.3.1 durchgeführt und mit der HPLC-Analytik in Kapitel 2.2.3.1.4 quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.1.1 Polyethylenglykol 6000 Fällung

Die Polyethylenglykol 6000 Fällung diente der selektiven Isolierung der Benzamidoxim-Reduktase aus den solubilisierten Mikrosomen. In Abbildung 2.7 ist zu sehen, dass mit dieser Methode keine selektive Fällung der Benzamidoxim-Reduktase aus solubilisierten Schweinenierenmikrosomen zu erreichen ist.

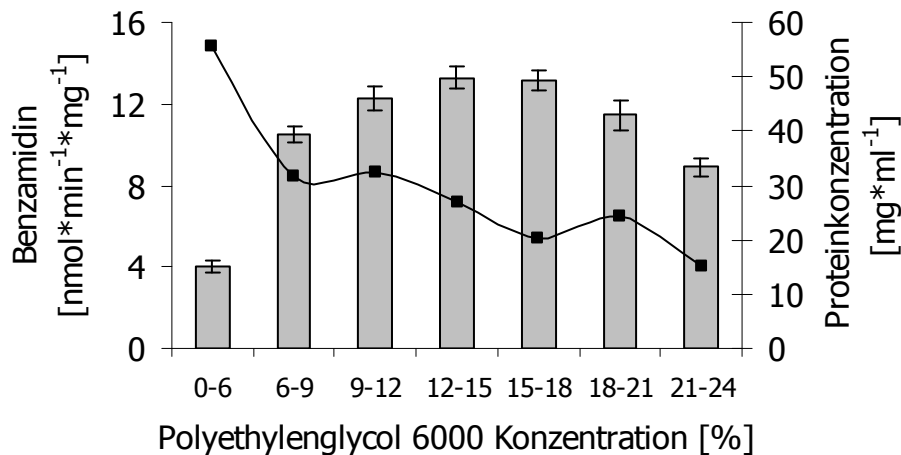


Abb. 2.7: Polyethylenglykol 6000 Fällung nach Solubilisation von Schweinenierenmikrosomen: Die Solubilisation wurde nach der in Kapitel 2.2.1.3.1 beschriebenen Methode durchgeführt, die Polyethylenglykol 6000 Fällung nach Kapitel 2.2.1.3.1.1. Mittels des jeweils resuspendierten Proteinpellets wurde gebildetes Benzamidin nach der in Kapitel 2.2.3.1.4 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Proteingehälter sind nach der Methode in Kapitel 2.2.2.1 bestimmt worden.

2.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B[®]

In Anlehnung an die Methode von Clement *et al.* [1997] wurde nach der erfolgreichen Solubilisation eine Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B[®] angeschlossen. Mit dieser Chromatographie sollten die zwei Elektronentransportproteine Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase sowie die weitere gesuchte dritte Komponente in Fraktionen abgetrennt werden. Die etablierte Methode zur Auftrennung des Solubilisationsansatzes der Schweinelebermikrosomen war auf die Schweinenierenmikrosomen nicht zu

übertragen, da die Enzyme auf der Säule nicht voneinander getrennt werden konnten.

Aufbauend auf die Ergebnisse aus den Leberuntersuchungen wurde eine neue Methode zur Auftrennung der Schweinenierenmikrosomen an Octyl-Sepharose CL 4B[®] entwickelt. Durch eine stufenweise Erniedrigung der Salzkonzentration und gleichzeitige Erhöhung der Detergenzmenge konnten die solubilisierten Proteine in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt werden. 1000 mg Mikrosomen wurden zunächst eine Stunde auf Eis solubilisiert (Endkonzentrationen nach Mikrosomenzugabe: 100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 0,5 M Natriumchlorid, 20 % (w/v) Glycerol, 0,6 % Cholsäure, pH 7,4) und anschließend eine Stunde bei 100.000 *g* zentrifugiert, um nicht-solubilisiertes Protein abzutrennen. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde mit einer Flussrate von 0,313 ml*min⁻¹ auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Danach folgte ein Spülen der Säule mit Eluent 1 (gleiche Bedingungen wie Solubilisationslösung) bis zur deutlichen Abnahme der Absorption bei 244 nm. Die Flussrate wurde ab Eluent 2 (100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 0,4 M Natriumchlorid, 20 % (w/v) Glycerol, 0,5 % Cholsäure, 0,1 % Emulgen[®] 911, pH 7,4) auf 0,83 ml*min⁻¹ erhöht. Da in den eingesetzten Eluenten Emulgen[®] 911 enthalten war, welches bei 280 nm (Verfolgung NADH Cytochrom b₅ Reduktase) eine starke Eigenabsorption besaß, wurde das Absorptionsminimum des Detergenzes (244 nm) zur Vermessung genutzt. Durch Wechsel auf Eluent 2 konnte eine Fraktion von der Säule gespült werden, die unter anderem Cytochrom b₅ enthielt. Anschließend wurde der Salzgehalt mit Eluent 3 (100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 20 % (w/v) Glycerol, 0,2 % Cholsäure, 0,4 % Emulgen[®] 911, pH 7,4) weiter erniedrigt und gleichzeitig die Detergenzkonzentration erhöht, so dass eine Fraktion von der Säule eluiert wurde, welche mit NADH Cytochrom b₅ Reduktase und Cytochrom P450 Isoenzymen angereichert war. Schließlich wurden mit Eluent 4 (100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 20 % (w/v) Glycerol, 1,0 % Emulgen[®] 911, pH 7,4) alle noch verbliebenen Proteine von der Säule gespült (Abb. 2.8).

Die jeweiligen Identitäten der Enzyme wurden mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese bestätigt. Testinkubationen waren mit diesen Fraktionen nicht sofort möglich. Es musste zunächst eine Entfernung des Detergenzes erfolgen (Kapitel 2.2.1.3.6), da die eingesetzten Tenside in schon sehr geringen Konzentrationen die Reduktion von Benzamidoxim hemmten (Kapitel 2.3.1).

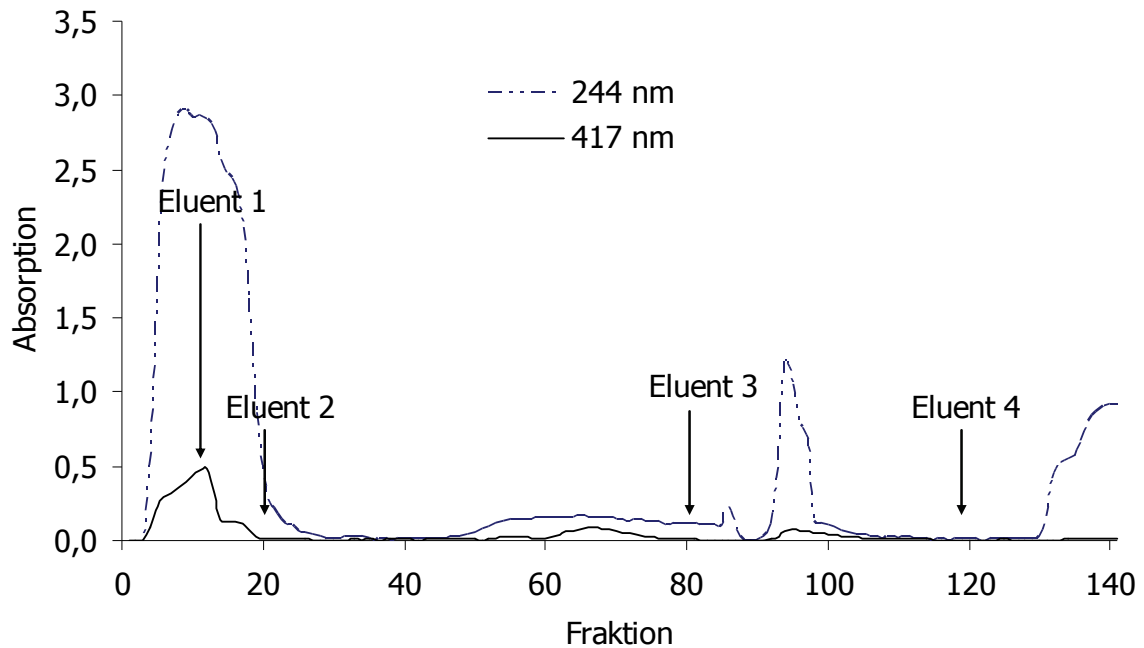


Abb. 2.8: Elutionsprofil von Schweinenierenmikrosomen nach Hydrophober Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B®. Die chromatographischen Bedingungen sind in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

2.3.3 Präparative HPLC an Fractogel® EMD TMAE 650 (S)

Aufbauend auf die Ergebnisse von Lomb [1995] wurde eine Methode entwickelt, welche die gebundenen Proteine mit einem Stufengradienten wieder von der Fractogel® EMD TMAE 650 (S) Säule eluierte (Kapitel 2.2.1.3.3). Das typische Elutionsprofil einer Trennung an dem Anionenaustauscher ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Das Profil wurde bei 244 nm aufgenommen, dem Absorptionsminimum des verwendeten Detergenzes.

Cytochrom P450 wurde nach der in Kapitel 2.2.2.5 beschriebenen Methode vermessen und konnte in den ersten zwei Fraktionen detektiert werden. NADH Cytochrom b₅ Reduktase konnte nach der in Kapitel 2.2.2.4 beschriebenen Methode in der Fraktion, welche mit 200 mM Natriumacetat eluiert wurde, bestimmt werden. Testinkubationen der Fraktionen waren mit diesen Fraktionen nicht sofort möglich. Es musste zunächst eine Entfernung des Detergenzes erfolgen (Kapitel 2.2.1.3.6), da das eingesetzte Tensid in schon sehr geringer Konzentration die Reduktion von Benzamidoxim hemmte (Kapitel 2.3.1).

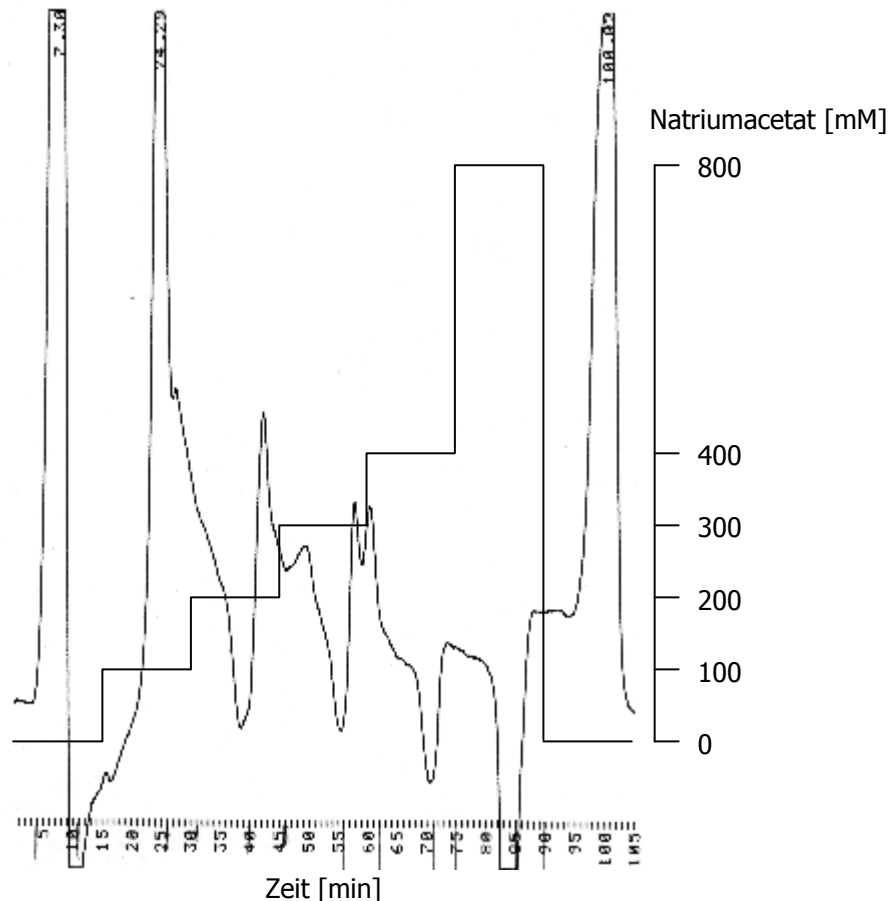


Abb. 2.9: Trennung der NADH Cytochrom b_5 reductasehaltigen Fraktion durch präparative HPLC an Fractogel® TMAE 650 (S). Die Elution erfolgte durch Verwendung eines Natriumacetat-Stufengradienten. Die chromatographischen Bedingungen sind in Kapitel 2.2.1.3.3 beschrieben.

2.3.4 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

2.3.4.1 Solubilisation der Schweinenierenmikrosomen für die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

In der vorliegenden Arbeit wurden die Erkenntnisse von Havemeyer [2006], dass bei einem Protein-/Detergenzverhältnis von zwei mit Zwittergent® 3-14 eine effiziente Solubilisation von äußeren Membranvesikeln der Schweinelebermitochondrien vorlag zu Grunde gelegt und für die Schweinenierenmikrosomen getestet. Es konnte ebenfalls kein anderer Effekt festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ein Protein-/Detergenzverhältnis von 4 reichte für eine effektive Solubilisation schon aus. Die eingesetzte Detergenzkonzentration hatte keinen Einfluss auf die *N*-reduktive Aktivität. Selbst eine Verminderung der Proteinmenge bei konstanter Detergenzmenge hatte kaum einen inhibitorischen Effekt.

2.3.4.2 Protein-Verlaufskontrolle

Schweinenierenmikrosomen wurden nach der Solubilisation auf die Ionenaustausch-Säule aufgetragen.

Dabei wurde nicht-bindendes Protein durch Spülen mit dem zweifachen Säulenvolumen mit Äquilibrierpuffer eluiert. Die Fraktionen 10-28 bildeten hierbei die nicht-bindende Fraktion. Dieses war durch den Absorptionsanstieg bei 280 nm zu verfolgen (Abb. 2.10). Anschließend wurde in einem linearen Gradienten mittels Gradientenmischer der Elutionspuffer zugemischt. Natriumchlorid konnte somit in der Konzentration 0-1 M stetig zugefügt werden. Die Fraktionen 40-68 und 70-80 bildeten die bindenden Proteinfractionen. Die Fraktionen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Eine Minderung der enzymatischen Aktivität war nach dem Auftauen nicht festzustellen.

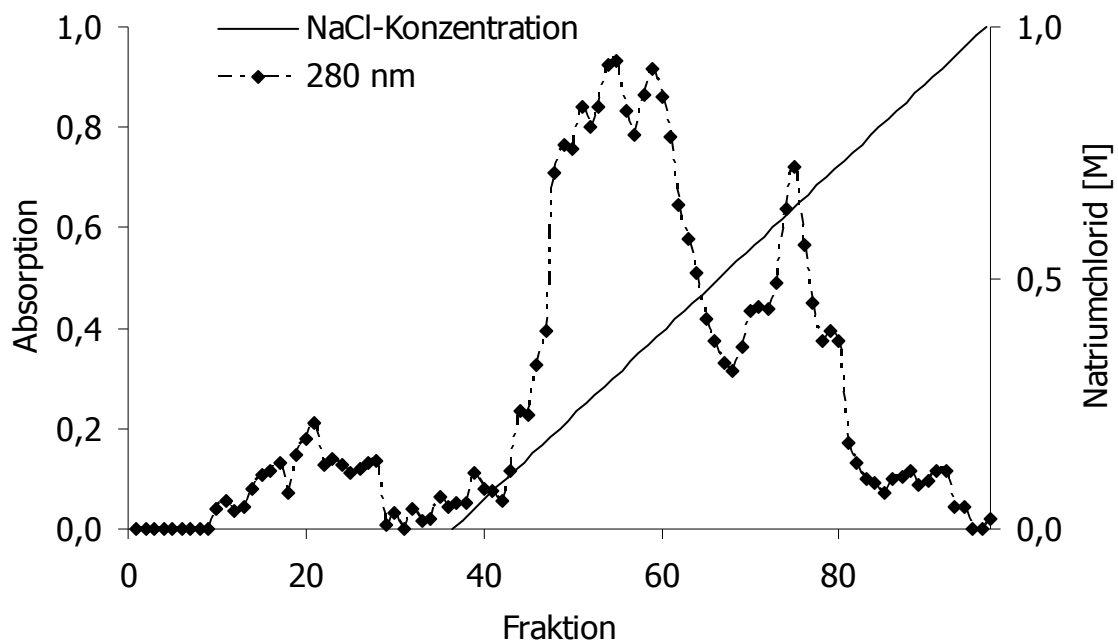


Abb. 2.10: Elutionsprofil der solubilierten Mikrosomen aus Schweinenieren nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Die Mikrosomen wurden nach der in Kapitel 2.2.1.3.4.1 beschriebenen Methode solubiliert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 2.2.1.3.4 beschriebenen Methode.

2.3.4.3 Cytochrom b_5 -Verlaufskontrolle

Von jeweils 200 μl Cytochrom b_5 wurde ein dithionitreduziertes Differenzspektrum aufgenommen und nach der in Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen Methode ausgewertet [Estabrook und Werringloer, 1978]. In den Fraktionen 19-25 und 48-50 konnte Cytochrom b_5 detektiert werden (Abb. 2.11). Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Einzelmessungen.

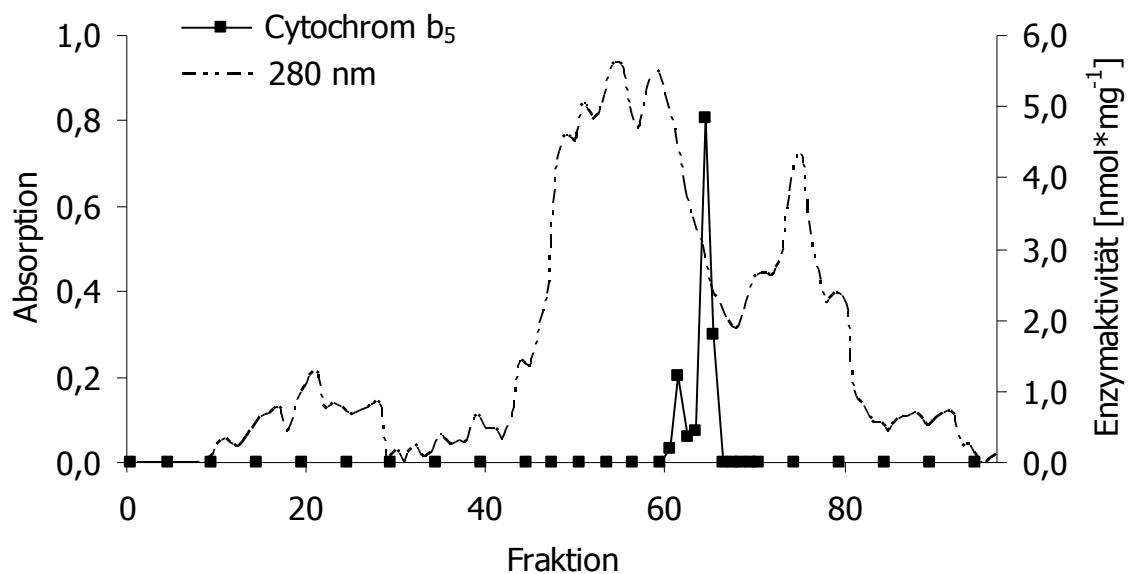


Abb. 2.11: Elutionsprofil der solubilisierten Mikrosomen aus Schweinenieren von Cytochrom b_5 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Die Mikrosomen wurden nach der in Kapitel 2.2.1.3.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 2.2.1.3.4 beschriebenen Methode.

2.3.4.4 NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Verlaufskontrolle

Jeweils 50 μl der Fraktionen wurden auf NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivität hin untersucht und nach der in Kapitel 2.2.2.4 beschriebenen Methode ausgewertet [Mihara und Sato, 1978]. Vor allem in den Fraktionen 45-59 konnte NADH Cytochrom b_5 Reduktase detektiert werden (Abb. 2.12). Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Einzelmessungen.

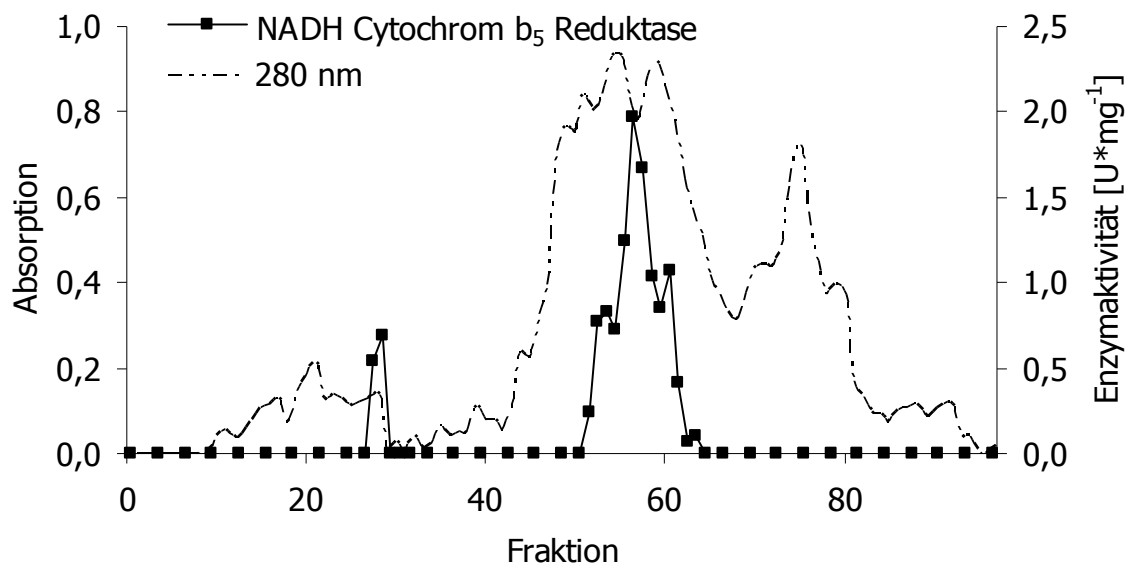


Abb. 2.12: Elutionsprofil der NADH Cytochrom b_5 Reduktase von solubilisierten Mikrosomen aus Schweinenieren nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Die Mikrosomen wurden nach der in Kapitel 2.2.1.3.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 2.2.1.3.4 beschriebenen Methode.

2.3.4.5 Cytochrom P450-Verlaufskontrolle

Jeweils 300 μl der Fraktionen wurden auf Cytochrom P450-Aktivität nach der in Kapitel 2.2.2.5 beschriebenen Methode hin untersucht [Omura und Sato, 1964]. Es konnte keine Cytochrom P450-Aktivität detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

2.3.4.6 Monoaminoxidase-Verlaufskontrolle

Jeweils 50 μl der Fraktionen wurden auf Monoaminoxidase-Aktivität hin untersucht und nach der in Kapitel 2.2.2.6 beschriebenen Methode ausgewertet [Kline *et al.*, 1986]. Vor allem in den Fraktionen 46-57 konnte Monoaminoxidase detektiert werden (Abb. 2.13). Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Einzelmessungen.

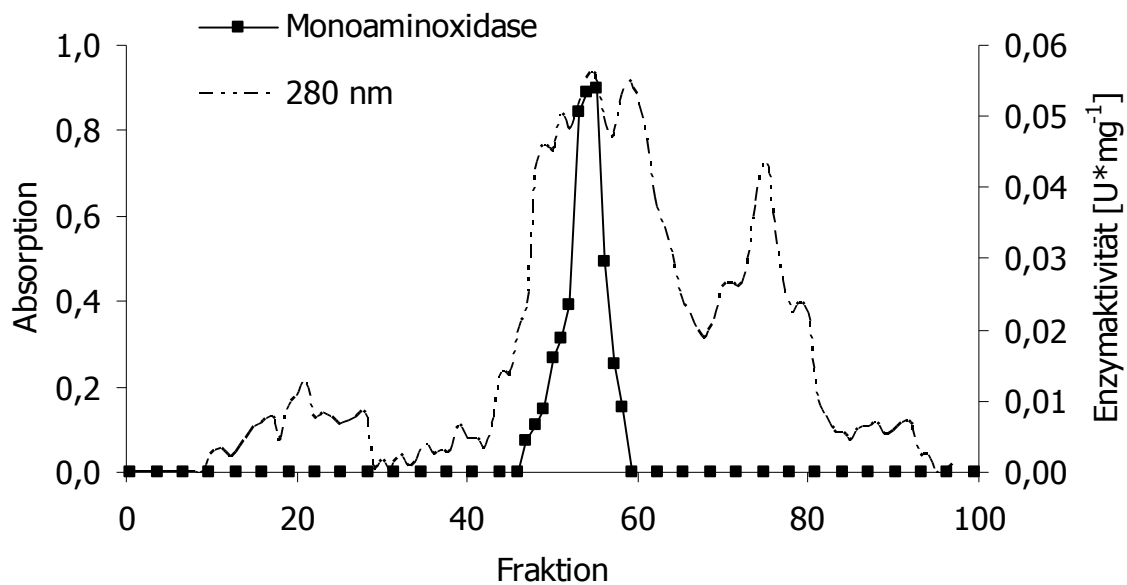


Abb. 2.13: Elutionsprofil der Monoaminoxidase nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Die Mikrosomen wurden nach der in Kapitel 2.2.1.3.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 2.2.1.3.4 beschriebenen Methode.

2.3.4.7 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle ohne zusätzliche Enzyme

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie die Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Ohne Zugabe weiterer Enzyme wurde keine Aktivität in den Fraktionen gefunden (Daten nicht gezeigt).

2.3.4.8 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Das rekonstituierte System bestand aus 10 μ l der entsprechenden DEAE-Fraktion und 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie die Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. In den Fraktionen 42-57 konnte Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität (42-49 und 52-57) detektiert werden (Abb. 2.14). Der Proteingehalt der zugesetzten DEAE-Fraktion bildete die Grundlage zur Berechnung der Aktivität. Die Inkubationen sind stets Einzelinkubationen, die doppelt vermessen wurden.

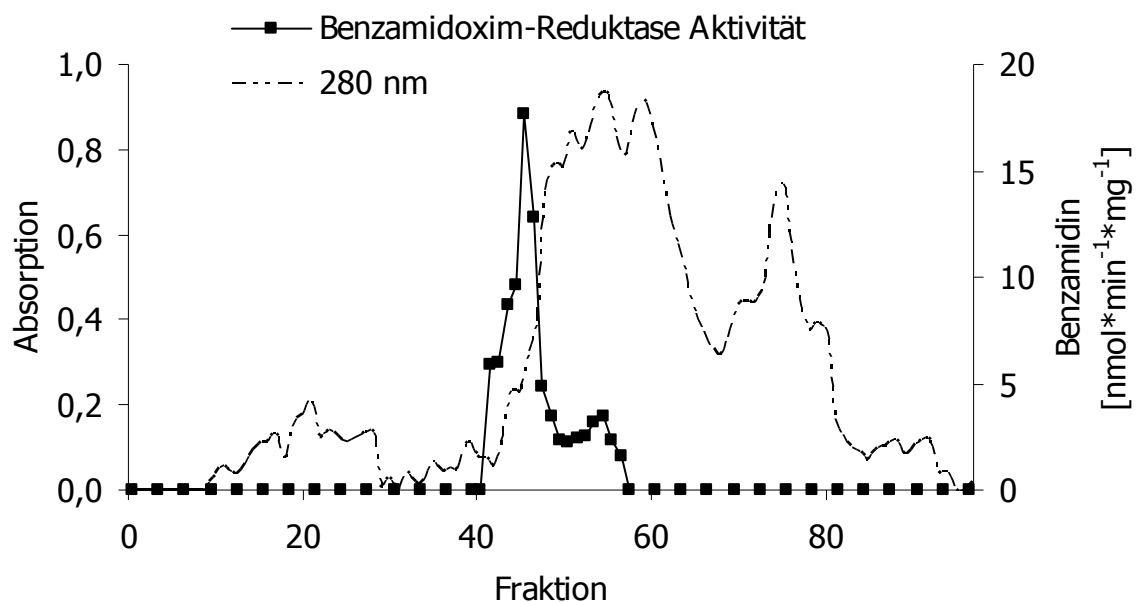


Abb. 2.14: Elutionsprofil der Benzamidoxim-Reduktase mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Die Mikrosomen wurden nach der in Kapitel 2.2.1.3.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 2.2.1.3.4 beschriebenen Methode. Die Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde.

2.3.4.9 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b_5

Die N -reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Das rekonstituierte System bestand aus 10 μl der entsprechenden DEAE-Fraktion und 170 pmol Cytochrom b_5 . Die weitere Durchführung der Inkubation sowie die Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. In den Fraktionen 42-57 konnte Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität (42-50 und 52-57) detektiert werden (Abb. 2.15). Der Proteingehalt der zugesetzten DEAE-Fraktion bildet die Grundlage zur Berechnung der Aktivität. Die Inkubationen sind stets Einzelinkubationen, die doppelt vermessen wurden.

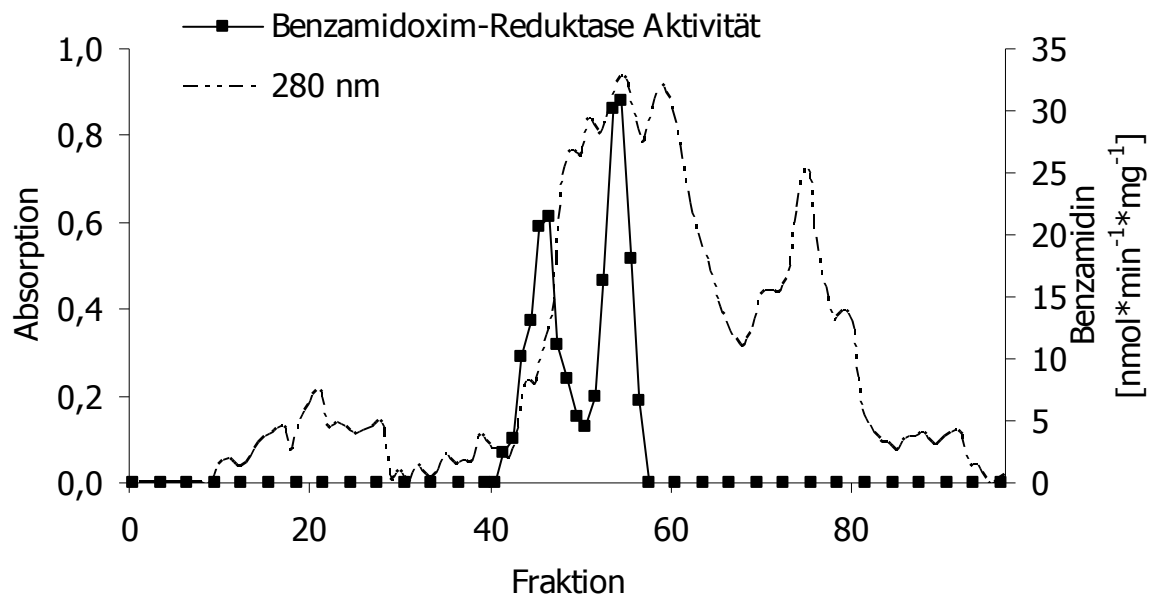


Abb. 2.15: Elutionsprofil der Benzamidoxim-Reduktase mit zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b_5 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Die Mikrosomen wurden nach der in Kapitel 2.2.1.3.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 2.2.1.3.4 beschriebenen Methode. Die Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde.

2.3.4.10 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase und zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b_5

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Das rekonstituierte System bestand aus 10 μ l der entsprechenden DEAE-Fraktion, 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase und 170 pmol Cytochrom b_5 . Die weitere Durchführung der Inkubation sowie die Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. In den Fraktionen 41-59 konnte Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität (42-51 und 53-59) detektiert werden (Abb. 2.16). Der Proteingehalt der zugesetzten DEAE-Fraktion bildet die Grundlage zur Berechnung der Aktivität. Die Inkubationen sind stets Einzelinkubationen, die doppelt vermessen wurden.

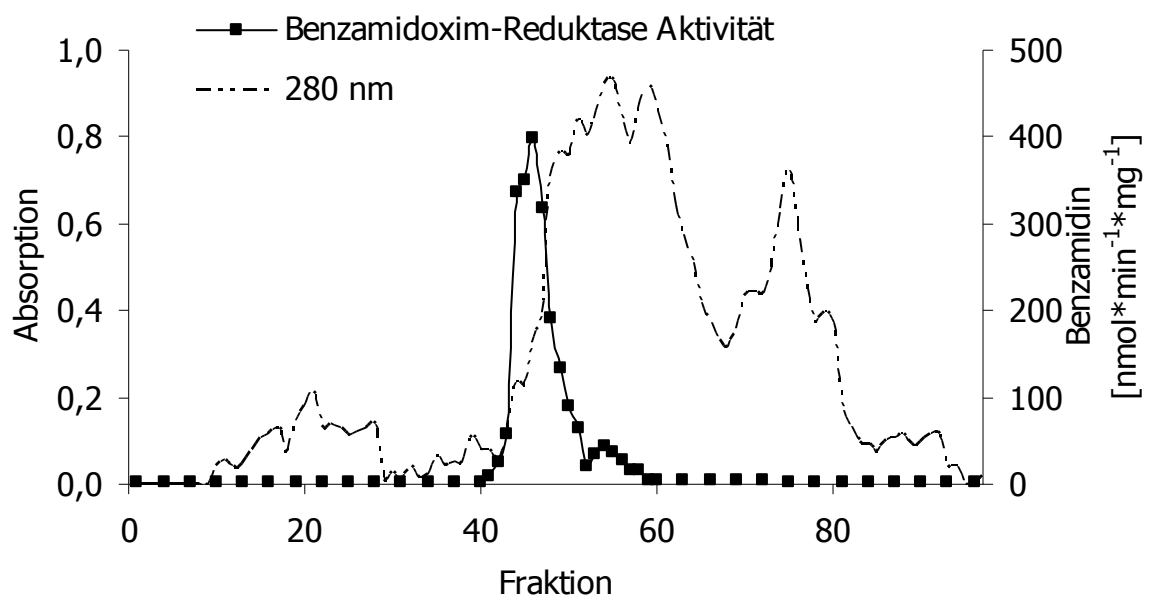


Abb. 2.16: Elutionsprofil der Benzamidoxim-Reduktase mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase und zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Die Mikrosomen wurden nach der in Kapitel 2.2.1.3.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 2.2.1.3.4 beschriebenen Methode. Die Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde.

2.3.4.11 Dextromethorphan-*O*-Demethylierung

Die CYP2D6 Aktivität wurde mittels der *O*-Demethylierung von Dextromethorphan zu Dextrorphan bestimmt. Das rekonstituierte System bestand aus 20 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion und 0,5 U NADPH Cytochrom P450 Reduktase. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie die Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.2.3 angegeben. Gebildetes Dextrorphan wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.2.2 beschriebenen Analytik quantifiziert. In den Fraktionen 41-46 konnte eine Dextromethorphan-*O*-Demethylierung Aktivität detektiert werden (Abb. 2.17). Der Proteingehalt der zugesetzten DEAE-Fraktion bildet die Grundlage zur Berechnung der Aktivität. Die Inkubationen sind stets Einzelinkubationen, die doppelt vermessen wurden.

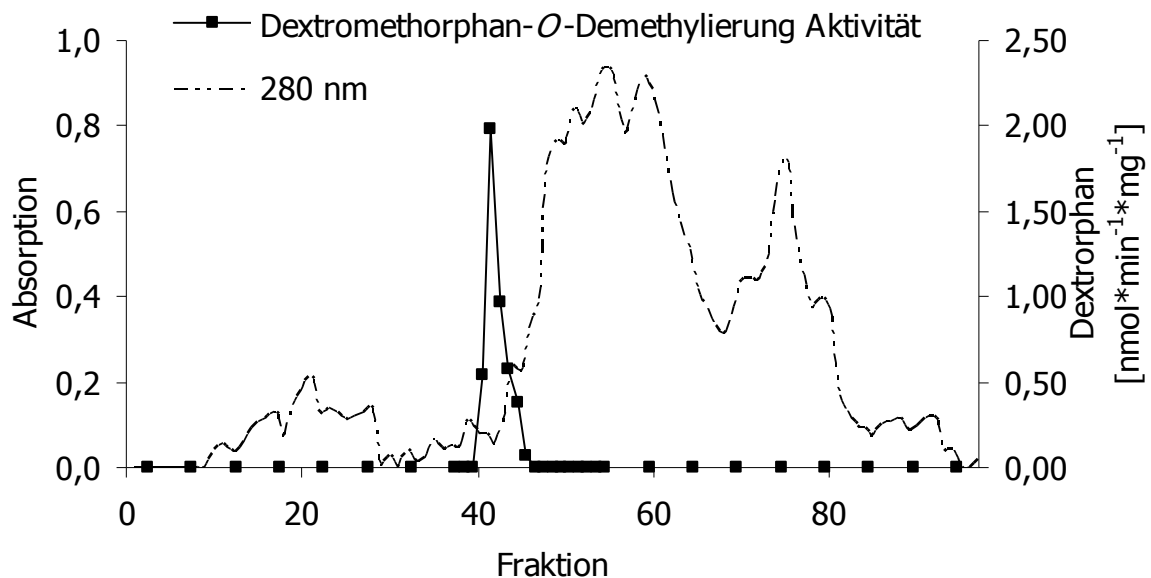


Abb. 2.17: Elutionsprofil der Dextromethorphan-*O*-Demethylierung mit zugesetzter gereinigter NADPH Cytochrom P450 Reduktase nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Die Mikrosomen wurden nach der in Kapitel 2.2.1.3.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 2.2.1.3.4 beschriebenen Methode. Die Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.2.3 angegeben. Gebildetes Dextrorphan wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.2.2 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde.

2.3.4.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde als Proteinverlaufskontrolle durchgeführt. In Abbildung 2.18 sind die Fraktionen 42-57 dargestellt, welche Benzamidoxim-Reduktase-Aktivitäten besaßen. Die umrahmten Banden in Abbildung 2.18 wurden der massenspektrometrischen Analyse (Kapitel 2.3.4.11) unterzogen.

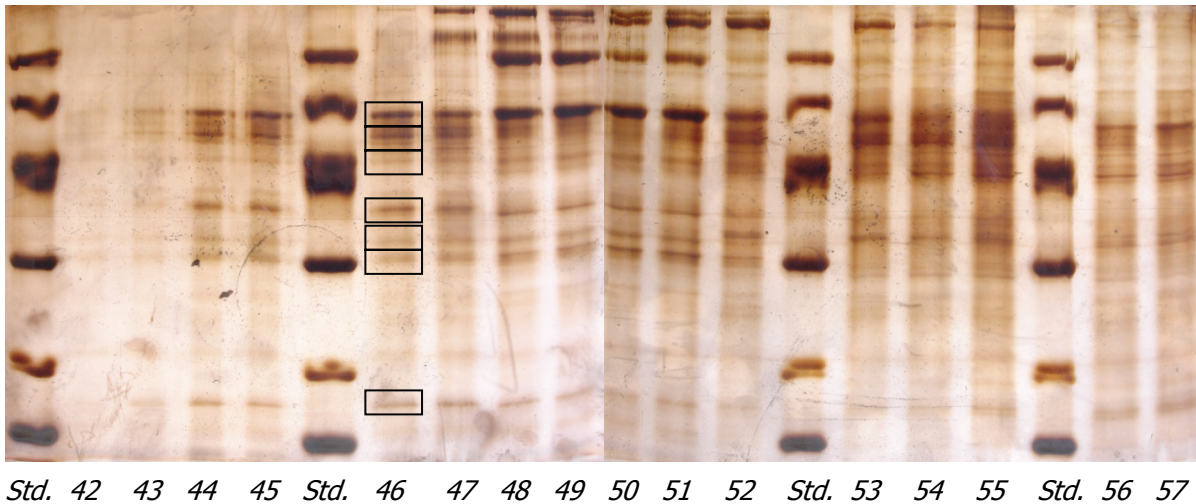


Abb. 2.18: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-Profil von solubilisierten Mikrosomen aus Schweinenieren nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Dargestellt sind die Fraktionen 42-57 und vier Molekulargewichtstandards (Std.) (97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4 kDa). Das Gel wurde nach der in Kapitel 2.2.2.7 beschriebenen Methode hergestellt sowie aufgearbeitet. Das Gel zeigt die detektierten Banden nach Silberfärbung. Auftragen wurden jeweils 5 µg der jeweiligen Fraktion.

2.3.4.13 Massenspektrometrische Analyse

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden der Benzamidoxim-Reduktase aktivsten Fraktion 46 wurden ausgeschnitten und der ESI-Analyse zugeführt. Die Proben wurden über Nacht durch Trypsin hydrolysiert. Nach Einstellen eines sauren pH-Wertes wurden die Peptide des Hydrolyse-Überstandes durch die nano-HPLC getrennt und mit ESI in der Q-TOF MS/MS analysiert. Zuvor wurde das Massenspektrometer mit Renin kalibriert.

Die so erhaltenen Peptidfragmente wurden mit Fragmenten einer elektronischen Datenbank verglichen. Dabei wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Enzyme mit hoher Wahrscheinlichkeit den erhaltenen Peptidfragmenten zugeordnet.

Tab. 2.1: Sequenzanalyse der Proteinbanden aus Fraktion 46

66 kDa Bande
Phenylalanin-tRNA Synthetase-ähnliches Protein Isoform 1
Carboxylesterase Precursor
55 kDa Bande
Aldehyddehydrogenase Familie 3, Subfamilie A2
UDP-Glucuronosyltransferase
50 kDa Bande
Annexin VII Isoform 1
Betain-Homocystein Methyltransferase
35 kDa Bande
hypothetisches Protein
MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2
ähnlich dem Mg87 Protein
32 kDa Bande
γ -Glutamyltranspeptidase
30 kDa Bande
mitochondrialer ADP-ATP Carrier
16 kDa Bande
Trypsin Precursor
Glutathion <i>S</i> -Transferase

Das hypothetische Protein der 35 kDa Bande konnte auf Grund der Peptidfragmente mittels Datenbankrecherche (BlastP) als MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2 (Accession Nummer NP_060368) identifiziert werden. Weitere Peptidfragmente konnten das MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2 (Accession Nummer NP_598445) Protein identifizieren. Das Mg87 Protein der 35 kDa Bande konnte ebenfalls der Familie der Molybdäncofaktor-bindenden Proteine zugeordnet werden (Accession Nummer XP_536125). Im Stammbaum der Proteine

konnte mittels Datenbackrecherche (BlastP) eine eindeutige Zugehörigkeit festgestellt werden.

2.3.4.14 *nit-1* Rekonstitutions-Assay

Die *nit-1* Rekonstitutionsanalyse diente der Bestimmung der Molybdäncofaktor-Aktivität. Die Rekonstitution wurde mittels der Nitratreduktaseaktivität der *nit-1* Mutante (*Neurospora crassa*) [Nason *et al.*, 1971] bestimmt und freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Die Methode ist in Kapitel 2.2.2.9 beschrieben. Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Hierbei wurden nicht alle Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie untersucht, sondern nur die Fraktionen, die eine hohe Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität aufwiesen.

In Tabelle 2.2 sind die *nit-1* Aktivitäten der Mikrosomen und der Benzamidoxim-Reduktase aktiven Fraktionen 45-47 dargestellt.

Tab. 2.2: *nit-1* Aktivität von Schweinenierenmikrosomen sowie DEAE-Fraktionen 45-47

Fraktion	<i>nit-1</i> Aktivität [nmol Nitrit*min ⁻¹ *µg ⁻¹]	Anreicherungsfaktor
Mikrosomen	0,22 ± 0,00	1
Fraktion 45	1,81 ± 0,13	8
Fraktion 46	1,86 ± 0,13	8
Fraktion 47	0,96 ± 0,06	4

Gebildetes Nitrit wurde über eine Azofarbstoffreaktion quantifiziert. Die ermittelten Daten sind Mittelwerte aus mindestens zwei Einzelmessungen.

2.3.4.15 FormA Analyse

Die FormA Analyse wurde nach der in Kapitel 5.2.2.10 beschriebenen Methode freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Hierbei wurden nicht alle Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie untersucht, sondern nur die Fraktionen, die eine hohe Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität aufwiesen. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tab. 2.3: FormA Analyse von Schweinenierenmikrosomen sowie DEAE-Fraktionen 45-47

Fraktion	FormA [pmol*mg ⁻¹]	Anreicherungsfaktor
Mikrosomen	756 ± 22	1
Fraktion 45	15528 ± 334	21
Fraktion 46	8244 ± 412	11
Fraktion 47	6883 ± 111	9

Die ermittelten Daten sind Mittelwerte aus mindestens zwei Einzelmessungen.

2.3.4.16 Immunoblot-Analyse

Der gereinigte und gegen den rekombinanten C-Terminus der Mocosulfurase ABA3 aus *A. thaliana* gerichtete Antikörper erkannte spezifisch das identifizierte Enzym Moco Sulfurase C-Terminus domain containing 2 in den Fraktionen 45-48 (Abb. 2.19).

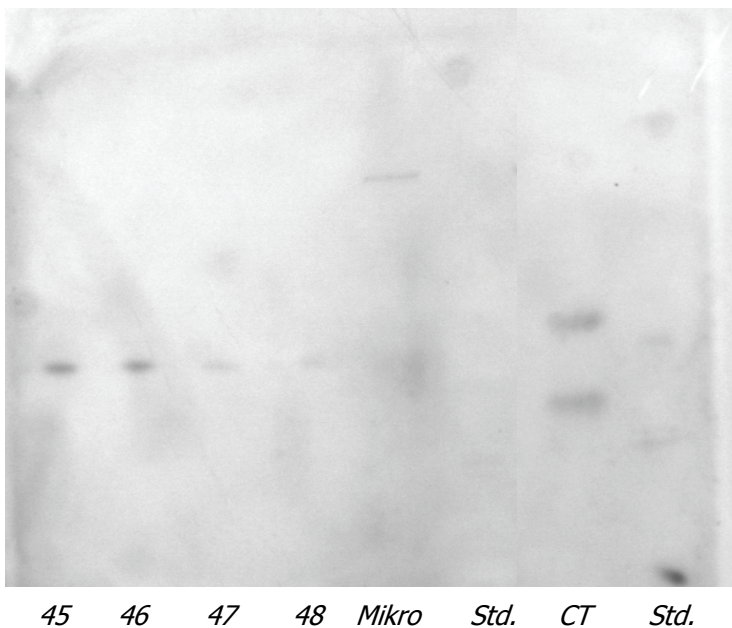


Abb. 2.19: Western Blot der solubilierten Schweinenierenmikrosomen nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Dargestellt sind die Fraktionen 45-48, Schweinenierenmikrosomen (Mikro), zwei Molekulargewichtstandards (Std.) (116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa) und eine C-terminale Domäne der humanen Mocosulfurase (CT) als Positivkontrolle. Aufgetragen wurden 1,5 µg der Fraktion 45, 2,4 µg der Fraktionen 46-48 und der Mikrosomen sowie 2,0 µg der C-terminalen Domäne der humanen Mocosulfurase (CT).

2.3.5 Kationenaustauschchromatographie an CM-Cellulose

Es wurden Mikrosomen nach der beschriebenen Methode [Havemeyer, 2006] solubilisiert. Diese Methode wurde schon für die Anionenaustauschchromatographie (Kapitel 2.3.4) getestet, eine weitere Optimierung war daher nicht erforderlich.

Es wurde die in Kapitel 2.2.1.3.5 beschriebene Methode durchgeführt. Dabei wurden Veränderungen des Salzes (Tris-Acetat, Natriumchlorid), der Salzkonzentration (jeweils 0-1 M), des Grundpuffers (Tris-Acetat, Natriumphosphat) sowie des pH-Wertes durchgeführt. Eine Bindung des *N*-reduktiven Systems konnte unter keiner der genannten Bedingungen erreicht werden.

2.3.6 Stabilität

Die Gewinnung von Mikrosomen und anschließende Reinigung der Enzympräparation ist ein langer und zeitaufwendiger Prozess. Aus diesem Grund wurden Mikrosomen unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert und zu gleichen Zeitpunkten anhand ihrer *N*-reduktiven Aktivität miteinander verglichen (Abb. 2.20).

Die Lagerung bei -80 °C führte nach 35 Tagen zu keinem erkennbaren Aktivitätsverlust. Bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C hingegen nahm die Aktivität der Mikrosomen innerhalb weniger Tage ab. Die solubilisierten Mikrosomen zeigten bei der Lagerungstemperatur von 4 °C ebenfalls einen Aktivitätsverlust. Dieser war allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt als der Aktivitätsverlust der ungelagerten Mikrosomen.

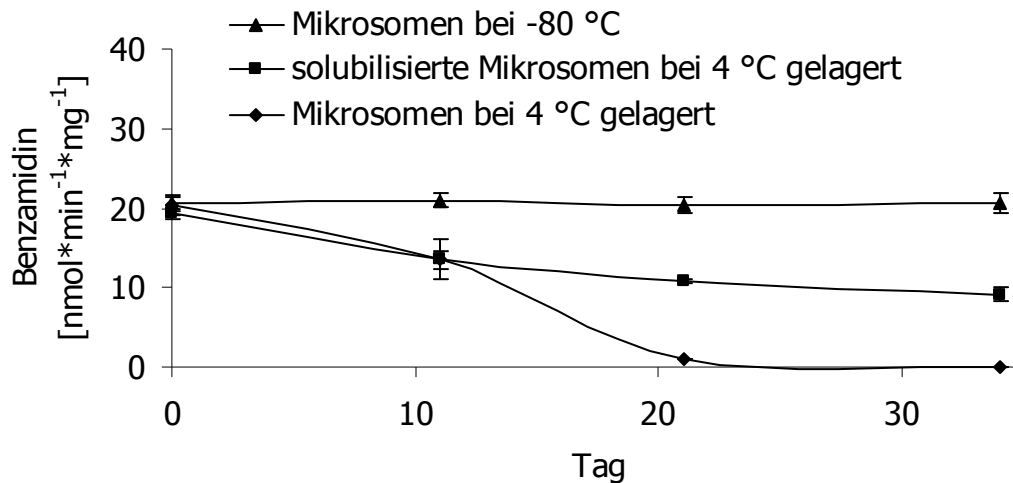


Abb. 2.20: Stabilitätsuntersuchung der Schweinenierenmikrosomen unter unterschiedlichen Bedingungen. Schweinenierenmikrosomen wurden bei -80 °C, 4 °C sowie nach Solubilisierung bei 4 °C gelagert und zum gleichen Zeitpunkt auf ihre N-reduktive Aktivität hin untersucht. Die Durchführung der Inkubation sowie die Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Reaktionsansätzen, welche doppelt vermessen wurden.

2.3.7 Charakterisierung der Schweinenierenmikrosomen

2.3.7.1 Aktivitäten ausgewählter Enzyme in Schweinenierenmikrosomen

2.3.7.1.1 NADPH Cytochrom P450 Reduktase

Die in dieser Arbeit gewonnenen Mikrosomen hatten einen mittleren NADPH Cytochrom P450 Reduktase Gehalt von $0,464 \pm 0,118 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Kapitel 3.3.1.1). Die Bestimmung erfolgte nach der Methode in Kapitel 2.2.2.2.

2.3.7.1.2 Cytochrom b_5

Die mikrosomale Cytochrom b_5 Bestimmung aus Schweinenieren ergab im Mittel $0,12 \pm 0,03 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode in Kapitel 2.2.2.3.

2.3.7.1.3 NADH Cytochrom b₅ Reduktase

Die mikrosomale NADH Cytochrom b₅ Reduktase Bestimmung aus Schweinenieren ergab im Mittel $3,25 \pm 0,53 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode in Kapitel 2.2.2.4.

2.3.7.1.4 Cytochrom P450

Die mikrosomale Cytochrom P450 Bestimmung aus Schweinenieren ergab im Mittel $0,19 \pm 0,06 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode in Kapitel 2.2.2.5.

Außerdem wurde der spezifische Cytochrom P450 Gehalt unter Zugabe steigender Konzentrationen des Detergenzes Zwittergent[®] 3-14 bestimmt. Hierbei wurde eine stetige Abnahme des Cytochrom P450 Gehalts festgestellt, während gleichzeitig die Zunahme eines Peaks bei 420 nm detektiert wurde. Die Abnahme des Cytochrom P450 Gehaltes bei gleichzeitiger Zunahme des Peaks bei 420 nm ist in Abbildung 2.21 dargestellt.

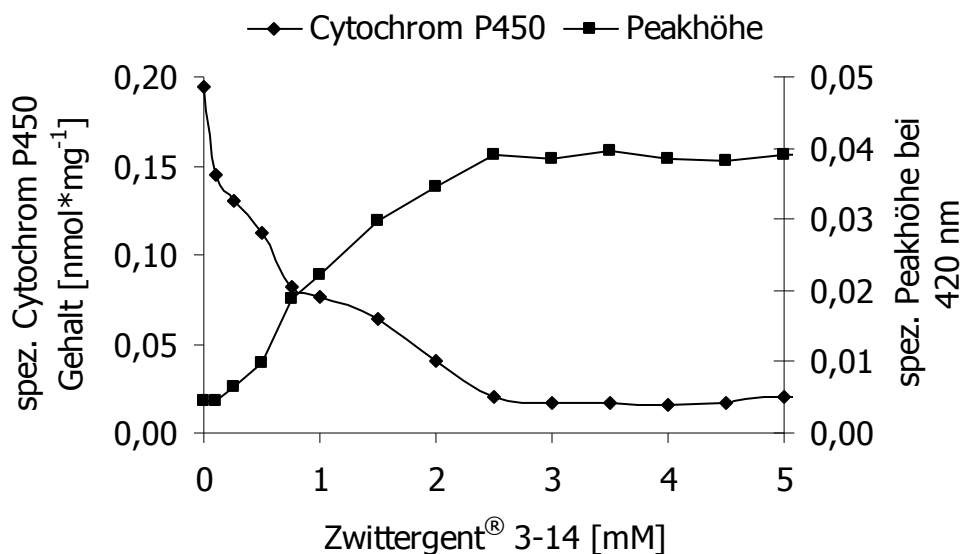


Abb. 2.21: Korrelation der Cytochrom P450 Abnahme bei gleichzeitiger Zunahme des Peaks bei 420 nm nach Zugabe definierter Mengen Zwittergent[®] 3-14 zu Schweinenierenmikrosomen. Schweinenierenmikrosomen wurden nach der Methode in Kapitel 2.2.2.5 auf den spezifischen Gehalt von Cytochrom P450 untersucht. Gleichzeitig wurde das Detergenz Zwittergent[®] 3-14 in definierten Konzentrationen zugesetzt. Die ermittelten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Reaktionsansätzen.

2.3.7.1.5 Monoaminoxidase

Die in dieser Arbeit gewonnenen Mikrosomen hatten einen mittleren Monoaminoxidase Gehalt von $6,0 \pm 2,7 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Kapitel 3.3.1.2). Die Bestimmung erfolgte nach der Methode in Kapitel 2.2.2.6.

2.3.7.2 Charakterisierung und Inkubationsoptimierung der *N*-reduktiven Aktivität von Benzamidoxim der Schweinenierenmikrosomen

Die gewonnenen Schweinenierenmikrosomen wurden nach den Gesichtspunkten Proteinkonzentration, Inkubationszeit, Cosubstratabhängigkeit und -art, pH-Wert und Substratabhängigkeit für das Substrat Benzamidoxim untersucht. Es ergab sich dabei der folgende, optimierte Inkubationsansatz (Kapitel 2.2.3.1.2): 100 µg mitochondriales Protein, 500 µM NADH und 800 µM Benzamidoxim in 300 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3 bei 20 Minuten Inkubationszeit.

2.3.7.2.1 pH-Wert

Die pH-Wertabhängigkeit ergab in einem Bereich von pH 4,0 bis pH 8,0 ein Optimum bei pH 6,3 (Abb. 2.22).

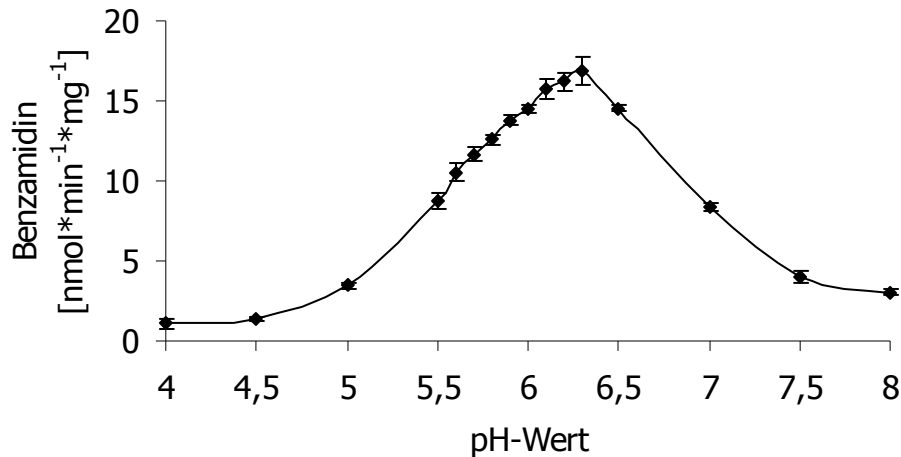


Abb. 2.22: pH-Wertabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 100 µg Protein, 1 mM NADH und 1 mM Benzamidoxim in 300 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 4,0 8,0. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.2.2 Substratabhängigkeit

Die Substratabhängigkeit des Benzamidoxims folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 2.23). Im Lineweaver-Burk-Plot betrug die Substratkonzentration bei halbmaximaler Sättigung (K_m) 2,3 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) $84,0 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die sich daraus ergebende katalytische Effizienz lag bei $3,62 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

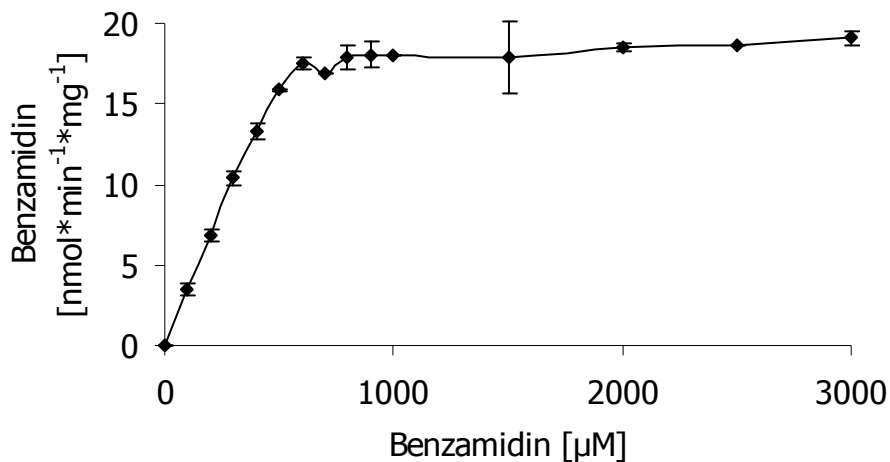


Abb. 2.23: Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: $100 \mu\text{g}$ Protein, 1 mM NADH und $0\text{-}3 \text{ mM}$ Benzamidoxim in $300 \mu\text{l}$ eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.2.3 Cosubstratabhängigkeit und -art

Die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin benötigte die Zugabe eines Cosubstrates. NADH wurde hierbei gegenüber NADPH bevorzugt (Abb. 2.24). Ab einer NADH-Konzentration von 800 μM kam es zu keiner nennenswerten Steigerung der Umsatzrate.

Kontrollinkubationen ohne Cofaktor zeigten keine detektierbaren Mengen an gebildetem Benzamidin.

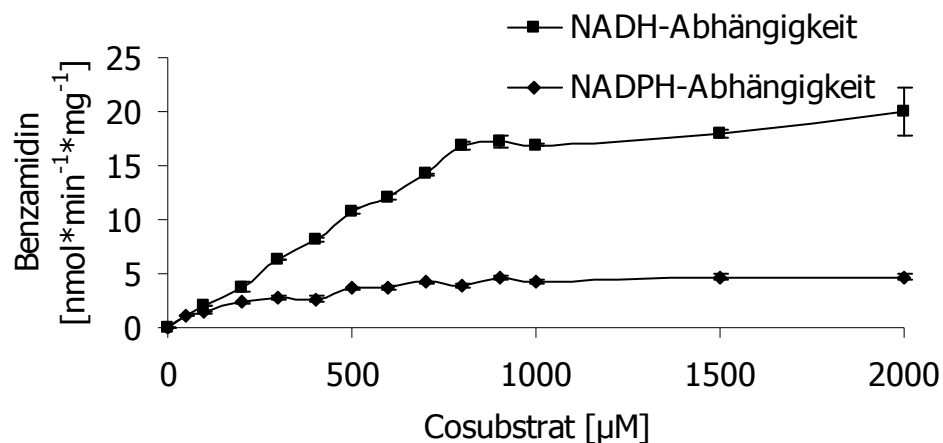


Abb. 2.24: Cosubstratabhängigkeit und -art der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 100 μg Protein, 0-2 mM Cosubstrat (NADH oder NADPH) und 800 μM Benzamidoxim in 300 μl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.3 Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim mittels Schweinenierenmikrosomen

Die Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin mittels Schweinenierenmikrosomen wurden unter aeroben und anaeroben Bedingungen getestet. Dabei war keine Abhängigkeit der Benzamidoxim-Reduktase von Sauerstoff festgestellt (Abb. 2.25).

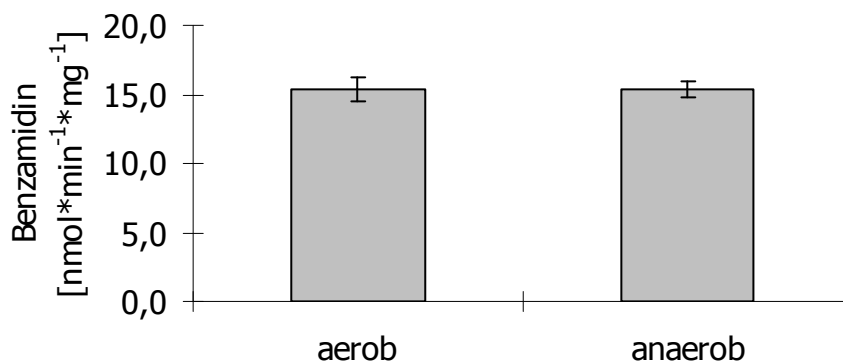


Abb. 2.25: Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 und 2.2.3.1.4 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.4 Hemmstudien

2.3.7.4.1 Kaliumcyanid

Der Cyanidioneneinfluss auf die Reduktion von Benzamidoxim durch Schweinenierenmikrosomen wurde nach der in Kapitel 2.2.3.1.5.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei konnte eine Hemmung festgestellt werden (Abb. 2.26). Es blieb eine Restaktivität von etwa 40 % der Ausgangsaktivität erhalten. Die ermittelte IC_{50} ergab 419 μM .

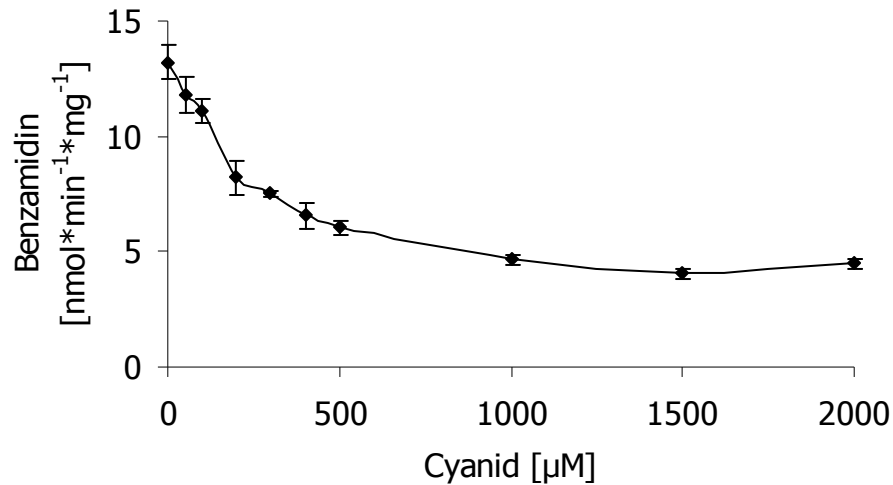


Abb. 2.26: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen in Gegenwart von Kaliumcyanid. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.5.1 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.4.2 Hydroxylamin-HCl

Mit Hydroxylamin-HCl konnte eine Hemmung detektiert werden. Es blieb eine Restaktivität von etwa 5 % der Ausgangsaktivität erhalten (Abb. 2.27). Die ermittelte IC_{50} ergab 114 μM .

Diese kompetitive Hemmung wurde bereits von Andersson *et al.* [2005] und Havemeyer [2006] untersucht.

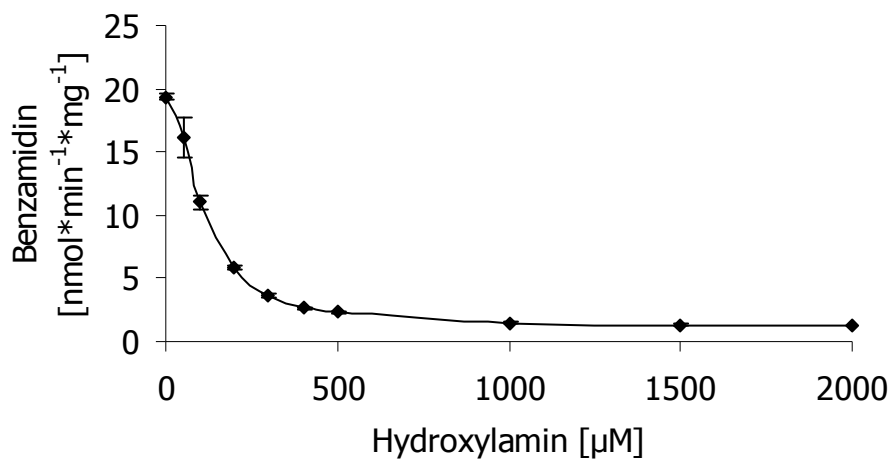


Abb. 2.27: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen in Gegenwart von Hydroxylamin-HCl. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.5.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.4.3 *p*-Hydroxymercuribenzoat

Eine Beteiligung der NADH Cytochrom b_5 Reduktase an der Reduktion von Benzamidoxim konnte durch den Zusatz des selektiven, kompetitiven Inhibitors *p*-Hydroxymercuribenzoat eindeutig gezeigt werden (Abb. 2.28). Ab $300 \mu\text{M}$ *p*-Hydroxymercuribenzoat war keine Restaktivität der Benzamidoxim-Reduktase mehr detektierbar (Abb. 2.28). Die ermittelte IC_{50} ergab $46 \mu\text{M}$.

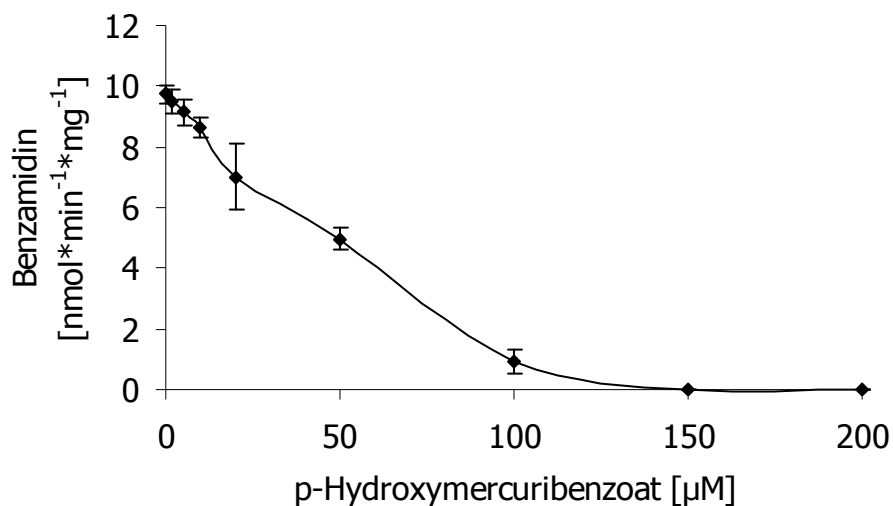


Abb. 2.28: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen in Gegenwart von *p*-Hydroxymercuribenzoat. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.5.3 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.4.4 Cytochrom c

Cytochrom c ist ein potentieller Elektronenakzeptor des Cytochrom b₅ [Bernardi und Azzone, 1981]. Er führt ab einer Konzentration von 100 µM zu einem vollständigen Verlust der *N*-reduktiven Aktivität der Schweinenierenmikrosomen (Abb. 2.29). Die ermittelte IC₅₀ ergab 17 µM.

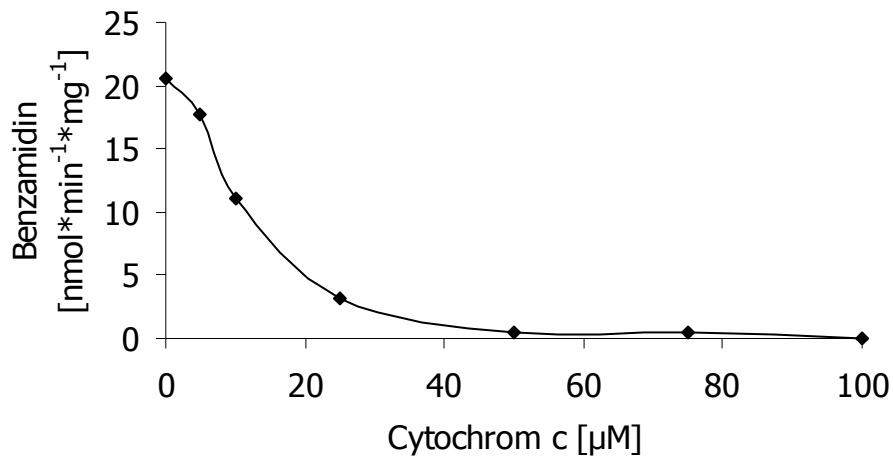


Abb. 2.29: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen in Gegenwart von Cytochrom c. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.5.4 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.4.5 Kohlenmonoxid

Kohlenmonoxid hemmt das Eisen der Oxidationsstufe +2 hämhaltiger Enzyme.

Der Kohlenmonoxideinfluss auf die Reduktion von Benzamidoxim durch Schweinenierenmikrosomen wurde nach der in Kapitel 2.2.3.1.5.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei konnte keine Hemmung festgestellt werden (Abb. 2.30).

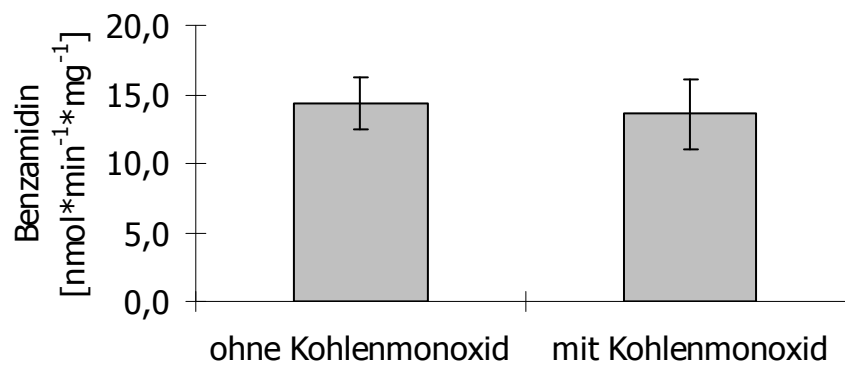


Abb. 2.30: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen in Gegenwart von Kohlenmonoxid. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.5.5 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.4.6 Natriumvanadat

Es konnte durch den Zusatz des Inhibitors Natriumvanadat eine Hemmung gezeigt werden (Abb. 2.31). Ab 200 μM Natriumvanadat lag die Restaktivität unter 5 %. Die ermittelte IC_{50} ergab 73 μM .

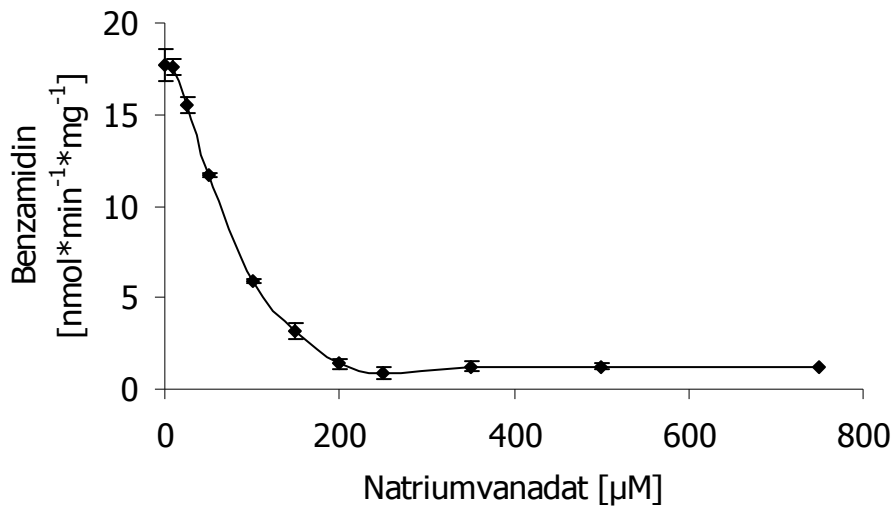


Abb. 2.31: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen in Gegenwart von Natriumvanadat. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.5.6 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.4.7 Zwittergent[®] 3-14

Das zwitterionische Detergenz Zwittergent[®] 3-14 zeigte in den Untersuchungen zunächst eine aktivierende, in höheren Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die Benzamidoxim-Reduktase. Dieser Effekt wurde nochmals näher untersucht. Da in Kapitel 2.3.7.1.4 schon festgestellt wurde, dass Zwittergent[®] 3-14 einen negativen Effekt auf die Cytochrom P450 Aktivitätsbestimmung ausübte, wurde unter den gleichen Bedingungen die *N*-reduktive Aktivität bestimmt. Abbildung 2.32 zeigt die Abnahme des spezifischen Cytochrom P450 Gehalts und gleichzeitig die Aktivität der Benzamidoxim-Reduktase. Diese wird bei kleinen Detergenzmengen zunächst erhöht, in höheren Mengen erniedrigt.

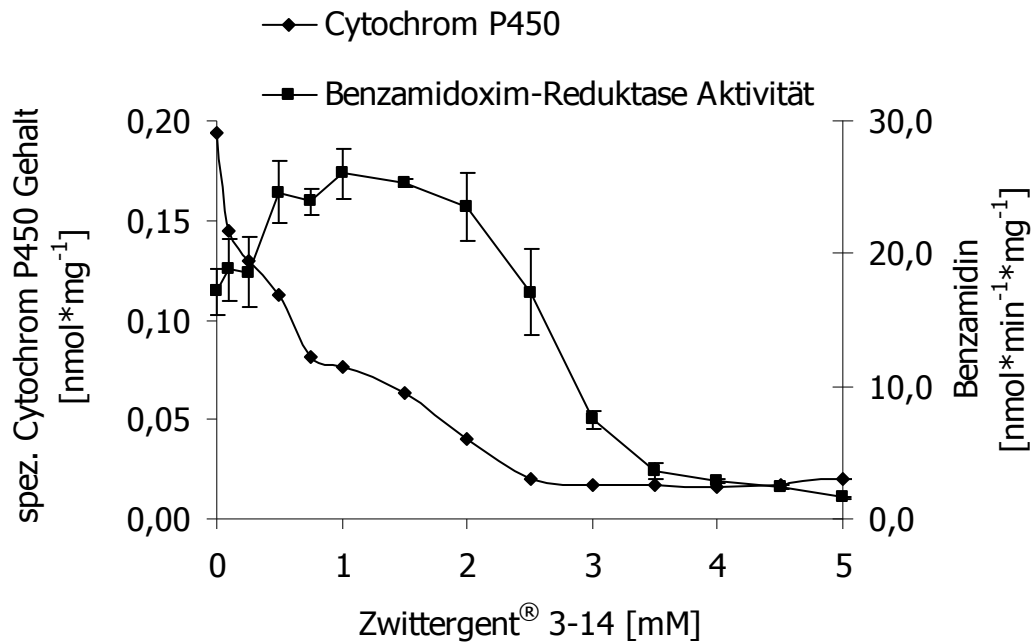


Abb. 2.32: Korrelation der Cytochrom P450 Abnahme bei gleichzeitiger Bestimmung der Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität nach Zugabe definierter Mengen Zwittergent® 3-14 zu Schweinenierenmikrosomen. Schweinenierenmikrosomen wurden nach der Methode in Kapitel 2.2.2.5 auf den spezifischen Gehalt von Cytochrom P450 untersucht. Gleichzeitig wurde das Detergenz Zwittergent® 3-14 in definierten Konzentrationen zugesetzt. Die ermittelten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Reaktionsansätzen. Die Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.7.5 Vergleichsinkubation von Schweineleber- und Schweinenierenmikrosomen bezüglich der Reduktion von Benzamidoxim und *O*-Demethylierung von Dextromethorphan

Die gewonnenen Schweinenierenmikrosomen wurden in ihrer Aktivität bezüglich der Reduktion von Benzamidoxim und der *O*-Demethylierung von Dextromethorphan mit Schweinelebermikrosomen verglichen. Für die Reduktion von Benzamidoxim durch Schweinenierenmikrosomen wurde der optimierte Ansatz verwendet (Kapitel 2.2.3.1.2), für die Reduktion durch Schweinelebermikrosomen der nach Mau [2002] optimierte Ansatz bestehend aus 200 μ g mikrosomalem Protein, 500 μ M NADH und 1000 μ M Benzamidoxim in 300 μ l eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3. Für

die *O*-Demethylierung von Dextromethorphan durch die zwei Mikrosomenarten wurde der in Kapitel 2.2.3.2.1 beschriebene Ansatz verwendet.

Die Abb. 2.33 zeigt, dass die Nierenmikrosomen etwa dreimal mehr Benzamidoxim reduzieren als die Lebermikrosomen. Dagegen *O*-demethylieren die Lebermikrosomen etwa viermal mehr Dextromethorphan als die Nierenmikrosomen.

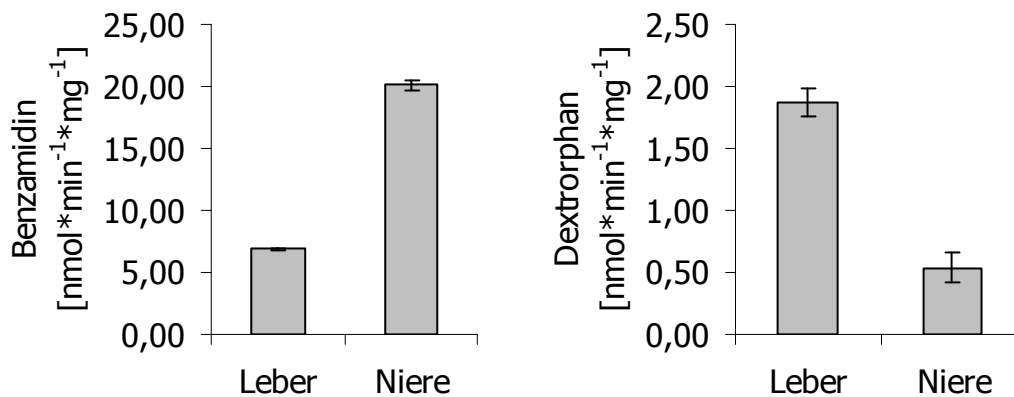


Abb. 2.33: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin und Dextromethorphan-*O*-Demethylierung durch Schweineleber- und Schweinenierenmikrosomen. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze für die Reduktion von Benzamidoxim ist in Kapitel 2.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze für die *O*-Demethylierung von Dextromethorphan ist in Kapitel 2.2.3.2.1 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 2.2.3.2.2 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

2.4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte das verantwortliche Cytochrom P450 Isoenzym aus Schweinenierenmikrosomen gewonnen werden, welches zusammen mit den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin verantwortlich ist. Die Beteiligung der zwei Elektronentransportproteine sollte gleichzeitig untersucht werden. Da die bisherige Isolierung in Lebermikrosomen zu dem Ergebnis führte, dass im Schwein ein Isoenzym der CYP2D Subfamilie [Lomb, 1995] und in humanen Lebermikrosomen das Isoenzym CYP2A6 [Behrens, 1999; Rieckert, 1999] die verantwortlichen dritten Komponenten waren, lag die Vermutung nahe, in den Schweinenierenmikrosomen ebenfalls ein Cytochrom P450 Isoenzym zu finden, welches die Reduktion des Modellsubstrates Benzamidoxim in Kombination mit den zwei Elektronentransportproteinen durchführen kann.

Die Herstellung der Schweinenierenmikrosomen wurde nach der von Mau [2002] beschriebenen Methode durchgeführt. Das Nierengewebe war deutlich härter als das Lebergewebe und musste somit stärker mechanisch vorbehandelt werden. Aus diesem Grund wurde das Gewebe besonders klein geschnitten und zweimal durch den Fleischwolf gegeben. Eine stärkere Zerkleinerung hat aber auch immer die Zerstörung von Zellen und Zellkompartimenten zur Folge, einhergehend mit dem Verschleppen der Kompartimente in die untersuchten subzellulären Fraktionen. Deshalb wurde trotz der invasiveren Methode auf die größtmögliche Schonung des Gewebes Wert gelegt.

Lomb [1995] entwickelte eine Methode zur simultanen Gewinnung von Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und dem dritten Protein. Die in der Literatur [Kling *et al.*, 1985] beschriebene Methode wurde von Lomb [1995] teilweise modifiziert, da einzelne Chemikalien nicht mehr kommerziell erhältlich waren. Der erste Schritt seiner Reinigung sah nach der Solubilisation der Mikrosomen eine Hydrophobe Interaktionschromatographie vor. Diese chromatographische Trennung baut auf dem Prinzip der hydrophoben Wechselwirkung in Kombination mit dem Aussalzeffekt von Proteinen auf [Pingoud und Urbanke, 1997]. Eine Übertragung dieser Methode auf die Nierenmikrosomen war nicht möglich, da die Enzyme Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und das dritte Enzym unter den angegebenen Bedingungen zeitgleich von der Säule eluiert wurden und sich nicht durch unterschiedliche Puffer mit verschiedenen Salz- und Detergenzkonzentrationen trennen ließen (Daten nicht gezeigt).

Zur Entwicklung einer neuen Methode zur Trennung der mikrosomalen Enzyme durch Hydrophobe Interaktionschromatographie wurden zunächst Solubilisationsstudien mit verschiedenen Detergentien durchgeführt. Dabei wurden das von Lomb [1997] genutzte nichtionische Thesit[®], das in der Literatur beschriebene und oft speziell zur CYP450 Isoenzymisolierung verwendete Emulgen[®] 911 [Yoshimoto *et al.*, 1986; Imaoka und Funae, 1986; Kastner und Neubert, 1991] sowie die zwei ionischen Detergentien Cholsäure [Clement *et al.*, 1997] und Zwittergent[®] 3-14 [Gonenne und Ernst, 1978] hinsichtlich ihrer Solubilisationskraft und ihres Einflusses auf die Benzamidoxim-Reduktase Aktivität untersucht. Das Polyoxyethylenderivat Thesit[®] und das Nonoxynol-9 Emulgen[®] 911 zeigten ähnliche Eigenschaften. Sehr geringe Mengen des jeweiligen Detergentes führten zum vollständigen Verlust der Benzamidoxim-Reduktase Aktivität (Abb. 2.4). Die Solubilisation mit Thesit[®] fand erst im höhermolaren Bereich fast vollständig statt (Abb. 2.4), während Emulgen[®] 911 hier schon in geringeren Mengen zum gleichen Ziel führte (Daten nicht gezeigt). Die steroidbasierte Cholsäure zeigte einen geringen Einfluss auf die Reduktion von Benzamidoxim, es wurden allerdings sehr große Mengen dieses Detergentes benötigt, um eine vollständige Solubilisation zu erhalten (Abb. 2.5). Das Sulfobetainderivat Zwittergent[®] 3-14 zeigte gute Solubilisationseigenschaften bei geringen Konzentrationen unter zunächst vollständigem Erhalt der Benzamidoxim-Reduktase Aktivität. Erst in höheren Konzentrationen fand auch hier eine Hemmung der Enzymaktivität statt (Abb. 2.6; 2.32). Somit brachte das zwitterionische Detergent Zwittergent[®] 3-14 die meisten Vorteile mit sich. Cholsäure und Emulgen[®] 911 zeigten hinsichtlich ihrer Solubilisation gute Eigenschaften, ihr Einfluss auf die Benzamidoxim-Reduktase ist aber als negativ anzusehen. Thesit[®] hingegen zeigte in beiden Punkten negative Eigenschaften.

Die eingesetzten Detergentien können nur unter erheblichem Aufwand wieder aus der Proteinlösung unter Erhalt der enzymatischen Aktivität entfernt werden. Die Methoden sind in Kapitel 2.2.1.3.6 beschrieben. Lomb [1997] benutzte das Adsorptionsmaterial Calbiosorb[®]. Diese Methode ist zwar schonend, aber schlecht kontrollierbar (Kapitel 2.2.1.3.6.1). Bei unzureichender Detergententfernung bleibt die Benzamidoxim-Reduktase weiterhin gehemmt. Wird hingegen zu viel Detergent entfernt, fallen die Proteine aus oder werden an den Adsorber gebunden. Das sehr enge Fenster, in dem die Enzyme aktiv sind, ist nicht vorhersehbar und muss ständig überprüft werden.

Detergent Out[™] arbeitet nach dem gleichen Prinzip, nur dass hier die Proteinlösung mittels Zentrifugation durch eine Säule gepresst wird. Die Säulen sind zum einen sehr teuer, zum anderen muss dieser Detergententfernungsschritt mehrfach

wiederholt werden, da häufig nicht alles Detergenz entfernt wird. Die dauerhafte Benutzung ist somit nicht ökonomisch (Kapitel 2.2.1.3.6.3).

Die Entfernung von Emulgen[®] 911 (Kapitel 2.2.1.3.6.2), wie sie in der Literatur beschrieben steht, wird üblicherweise mit Hilfe einer Hydroxylapatitsäule durchgeführt [Yoshimoto *et al.*, 1986; Imaoka und Funae, 1986; Kastner und Neubert, 1991]. Dabei binden die Proteine in einem gering konzentrierten Salzpuffer an den starken Ionenaustauscher, während das Detergenz mit einem detergenzfreien Puffer von der Säule gespült werden kann. Anschließend werden die Proteine mit einem hochmolaren Salzpuffer eluiert. Emulgen[®] 911 absorbiert bei 280 nm. Die vollständige Detergenzentfernung war somit bei 280 nm kontrollierbar. Die Methode erwies sich gerade für Cytochrom P450 Isoenzyme als gut geeignet.

Im Anschluss an die Solubilisierung wurde eine Polyethylenglykolfällung getestet. Andersson *et al.* [2005] beschrieben eine gezielte Fällung der Benzamidoxim-Reduktase mit solubilisierten Rattenlebermikrosomen im Konzentrationsbereich 15-18 %. Für die Schweinenierenmikrosomen brachte dieser Schritt keinen Vorteil, da keine selektive Fällung erzielt werden konnte (Abb. 2.7).

Die mit unterschiedlichen Detergentien solubilisierten Schweinenierenmikrosomen wurden auf eine Hydrophobe Interaktionschromatographie Matrix aufgetragen. Das zunächst gut solubilisierende Zwittergent[®] 3-14 interagiert mit der Säule und fiel nach kurzer Zeit aus. Laut Herstellerangabe ist das Detergenz bei 4 °C in Wasser unlöslich. Sämtliche Versuche, Zwittergent[®] 3-14 in Lösung zu halten, misslingen. Der Einsatz von Zwittergent[®] 3-14 für eine Hydrophobe Interaktionschromatographie ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Außerdem werden für Hydrophobe Interaktionschromatographien nichtionische Detergentien bevorzugt [Pingoud und Urbanke, 1997].

Cholsäure hat eine gute Solubilisationskraft und wurde von Lomb [1997] auch dafür eingesetzt. Zur vollständigen Elution aller Enzyme von der interaktionschromatographischen Säule war Cholsäure nicht in der Lage. Deshalb fügte Lomb [1997] Thesit[®] hinzu, was aber bei den Schweinenierenmikrosomen nicht zum Erfolg führte. Das nichtionische Detergenz Emulgen[®] 911 konnte schließlich sämtliche Enzyme wieder von der Säule eluieren (Abb. 2.8) und war somit das beste der getesteten Detergentien für diesen Arbeitsschritt zur selektiven Abtrennung der CYP450 Isoenzyme. Nachteilig war allerdings, dass die *N*-reduktive Aktivität nicht sofort bestimmt werden konnte. Die Cytochrom P450 Bestimmung wurde mit dem Differenzspektrum nach Omura und Sato [1964] durchgeführt. Der Gehalt vor und nach der Interaktionschromatographie war nahezu identisch, so dass kaum ein Verlust an Cytochrom P450 Isoenzymen bei diesem Schritt zu verzeichnen war. Die

Entfernung des Detergenzes mit Hydroxylapatit (Kapitel 2.2.1.3.6.2) führte im rekonstituierten System (Kapitel 2.2.3.1.6) zu einer Reduktion von Benzamidoxim (Daten nicht gezeigt). Allerdings führte dieser Schritt, ebenso wie bei Lomb [1997], nicht zu einer Anreicherung des Enzyms, sondern nur zur Abtrennung von Cytochrom b₅ und weiteren, nicht analysierten Enzymen.

Als nächster Schritt zur Anreicherung des Enzyms wurde eine Anionenaustauschchromatographie an Fractogel[®] EMD TMAE 650 (S) durchgeführt. Da die nach Lomb [1997] durchgeführte Methode wiederum Thesit[®] enthielt und sich dieses schon in der Hydrophoben Interaktionschromatographie als nachteilig herausgestellt hatte, wurde die Elution wiederum mit Emulgen[®] 911 durchgeführt. Laut Literatur wurden Cytochrom P450 Isoenzyme analog dieser Methode an einem Anionenaustauscher gewonnen [Bansal *et al.*, 1984; Funae und Imaoka, 1985; Imaoka *et al.*, 1990]. Es konnten vor allem in der Durchgangsfraction sowie dem ersten Stufengradienten Cytochrom P450 Aktivitäten detektiert werden (Abb. 2.9). Trotz Detergenzentfernung bei den einzelnen Fraktionen konnte keine *N*-reduktive Aktivität gemessen werden. Dabei konnte eine Hemmung durch das Detergenz ausgeschlossen werden, da diese Fraktionen die Aktivität von Mikrosomen nicht hemmten. Das verwendete Detergenz hingegen hemmte die Mikrosomen schon bei geringster Konzentration in ihrer Reduktion von Benzamidoxim (Kapitel 2.3.1). Eine zusätzliche Aktivierung der Mikrosomen konnte auch nicht gezeigt werden. Lomb [1997] hatte in der Durchgangsfraction seiner Säulenchromatographie ein CYP2D Isoenzym gefunden, welches im rekonstituierten System *N*-reduktive Aktivität zeigte.

Mehrere Gründe können diskutiert werden, warum die Rekonstitution der erhaltenen Cytochrom P450-Fractionen nicht funktioniert hat. Wie schon bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie erwähnt, wurde mit dem ersten chromatographischen Schritt keine Anreicherung des Enzyms erzielt. Die geringe Aktivität könnte eventuell bei der weiteren Auftrennung durch Interaktion mit einzelnen Proteinen oder mit dem Säulenmaterial zum kompletten Aktivitätsverlust geführt haben. Über ein solches Phänomen wurde bereits berichtet [Szymona und Szumilo, 1966]. Zudem wurden die von Imaoka *et al.* [1990] oder Bansal *et al.* [1984] gewonnenen Cytochrom P450 Isoenzyme nicht aufgrund der Beteiligung an einer enzymatischen Reaktion isoliert, sondern nur unter dem Focus der Feststellung, dass Cytochrom P450 Isoenzyme in der Niere vorhanden sind. Somit sind Aktivitäten und damit Aktivitätsverluste nicht beschrieben.

Ein Ausbleiben der Aktivität könnte auch damit erklärt werden, dass in der Niere möglicherweise ein ganz anderes Enzym für die Reduktion verantwortlich ist. Das Cytochrom P450 Isoenzym der Subfamilie 2D aus dem Schwein weist sehr viel

Ähnlichkeit [Berger, 2002] zum literaturbeschriebenen CYP2D25 auf [Postlind *et al.*, 1997]. Das CYP2D25 wurde als die Vitamin D₃ 25-Hydroxylase identifiziert und ist ein hepatisches Enzym. Auch in der Schweineiere konnte ein CYP Isoenzym isoliert werden, welches die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ durchführen konnte [Postlind und Wikvall, 1988]. Hierbei wurde aber nur eine 20 %ige Aktivität der Niere gegenüber der Leber für die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ gefunden. Zudem gibt es bisher keine Hinweise, dass das CYP2D25 an der renalen Reduktion von Benzamidoxim beteiligt ist.

Im Menschen ist bisher nur das CYP2D6 als Mitglied der 2D Subfamilie entdeckt worden. Für das CYP2D6 und das CYP2D25 wurden 77 % Sequenzhomologie festgestellt [Myers *et al.*, 2001]. Das CYP2D25 metabolisiert dabei typische CYP2D6 Substrate, wie Bufuralol oder Dextromethorphan [Myers *et al.*, 2001]. Dies konnte ebenso für das mikrosomale Enzym der Schweineleber gezeigt werden [Friedrich, 2003]. Der mRNA Gehalt des CYP2D6 beträgt aber in der humanen Niere nur etwa 1 % der Menge, die in der Leber gefunden wurde [Nishimura *et al.*, 2003]. Ähnliches stellten Miksys *et al.* [2005] bei einem Organvergleich zwischen Mensch und Maus in Leber und Niere fest. Im Vergleich zur Leber wurde nur ein Zehntel der Menge an CYP2D6 des Menschen sowie CYP2D der Maus in der Immunoblotanalyse der Niere detektiert. Aus diesem Grund wurde eine Vergleichsinkubation von Schweinelebermikrosomen und -nierenmikrosomen hinsichtlich ihrer Benzamidoxim-Reduktase Aktivität sowie Dextromethorphan-*O*-Demethylierung als CYP2D Markerreaktion durchgeführt (Abb. 2.33). Dabei reduzierten die Schweinenierenmikrosomen etwa dreimal mehr Benzamidoxim als die Schweinelebermikrosomen, während die Lebermikrosomen etwa vierfach mehr Dextromethorphan *O*-demethylierten als die Nierenmikrosomen (Abb. 2.33).

Aufgrund dieser Ergebnisse muss angenommen werden, dass das CYP2D aus den Lebermikrosomen nicht das verantwortliche Enzym zur Reduktion von Benzamidoxim in der Niere sein kann.

Parallel zur Anionenaustauschchromatographie wurde eine Auftrennung der durch die Hydrophoben Interaktionschromatographie erhaltenen Enzymfraktion an einem Kationenaustauscher mit Carboxymethylcellulose getestet. Die Enzymfraktion konnte nicht zur Bindung an den Kationenaustauscher gebracht werden. Somit war der Kationenaustauscher ungeeignet (Kapitel 2.3.5).

Da die Anionenaustauschchromatographie bei Lomb [1997] zu einem Ergebnis führte, mit welchem das CYP2D Enzym als verantwortliches Enzym charakterisiert werden konnte, wurden die solubilisierten Mikrosomen direkt auf einen Anionenaustauscher aufgetragen. Verwendet wurde dafür DEAE-Material. Dazu

wurde die von Havemeyer [2006] entwickelte Methode zur Auftrennung solubilisierter äußerer mitochondrialer Vesikel auf die Mikrosomen übertragen. Die gute Solubilisation der Nierenmikrosomen mit Zwittergent[®] 3-14 wurde bereits diskutiert. Ein Elutionsprofil der solubilisierten Enzyme ist in Abbildung 2.10 zu sehen. Ein vorhergehender Aufreinigungsschritt fand nicht statt. Die in der Leber beteiligten Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase konnten detektiert werden. Ihre Elutionsprofile sind in den Abbildungen 2.11 und 2.12 dargestellt. Inkubationen der einzelnen Fraktionen mit Benzamidoxim zur Kontrolle der Benzamidoxim-Reduktase zeigte keine Aktivität (Kapitel 2.3.4.7). Der isolierte Zusatz von Cytochrom b_5 bzw. NADH Cytochrom b_5 Reduktase zu den Fraktionen zeigte jeweils eine geringe Aktivität (Abb. 2.14 und 2.15). Erst die Zugabe beider Elektronentransportproteine führte zu einer 20-fachen Steigerung der reduktiven Aktivität (Abb. 2.16) gegenüber den eingesetzten Mikrosomen. Da Zwittergent[®] 3-14 in der eingesetzten Konzentration die Reduktion nicht störte, konnte auf die aufwendige Entfernung des Detergenzes verzichtet werden, wie sie ehemals durchgeführt werden musste [Clement *et al.*, 1997]. Dieses bestätigt die bisher beschriebenen Ergebnisse über *N*-reduktive membrangebundene Enzymsysteme [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Havemeyer, 2006], welchen es zufolge sich bei der Benzamidoxim-Reduktase um ein Dreikomponentensystem handelt. Zum ersten Mal konnte mit diesem Schritt ein Aufreinigungsfaktor der Benzamidoxim-Reduktase in Mikrosomen erzielt werden.

Zur Kontrolle wurde die *O*-Demethylierung von Dextromethorphan als Markerreaktion des CYP2D [Myers *et al.*, 2001] mit bestimmten Fraktionen der DEAE-Säule durchgeführt. In einem Teil der Fraktionen konnte die *O*-Demethylierung von Dextromethorphan detektiert werden (Abb. 2.17). Die Fraktionen der höchsten Reduktionsrate von Benzamidoxim sowie die Fraktionen der höchsten *O*-Demethylierungsrate von Dextromethorphan korrelieren nicht miteinander (Abb. 2.16; 2.17). Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass das in der Niere enthaltene Enzymsystem zur Reduktion von Benzamidoxim vermutlich nicht mit dem in der Leber entdeckten CYP2D korreliert. Die Benzamidoxim-reduktaseaktiven Fraktionen zeigten zudem im Differenzspektrum nach Omura und Sato [1964] keinen CYP450-Gehalt (Daten nicht gezeigt). In den isolierten Proteinfractionen von Lomb [1997] sowie Rieckert und Behrend [beide 1999] konnte in den aktiven Enzymfraktionen aus porciner und humaner Leber, die das dritte Enzym enthielten, Cytochrom P450 nachgewiesen werden.

Um einem Verlust der *N*-reduktiven Aktivität vorzubeugen, wurden die gewonnenen Enzymfraktionen stets bei -80 °C eingefroren. Trotzdem wurde ein Langzeittest durchgeführt, der zeigte, dass solubilierte Mikrosomen auch nach über 30 Tagen

Lagerung bei 4 °C noch eine 50 %ige Restaktivität zur Reduktion von Benzamidoxim besaßen (Abb. 2.20), während unisolubierte Mikrosomen schon nach wenigen Tagen keinerlei Aktivität mehr aufwiesen. Damit kann eine kurze Haltbarkeit des Enzyms ausgeschlossen werden, wie es von Andersson *et al.* [2005] beschrieben wurde. Zudem konnte damit ausgeschlossen werden, dass die Enzymfraktionen ihre Aktivitäten zu schnell verlieren und sich damit einem positiven Nachweis der Markerreaktionen entziehen.

Wie schon vorher erwähnt, wurden die Mikrosomen nach Solubilisation ohne weitere Vorreinigung auf den Anionenaustauscher aufgetragen. Die SDS-Gele zeigten für die einzelnen Fraktionen mehrere Banden (Abb. 2.18). Auffallend ist, dass im 45-55 kDa Bereich, in dem typischerweise Cytochrom P450 Isoenzyme zu finden sind [Imaoka und Funae, 1986; Yoshimoto *et al.*, 1986; Kastner und Neubert, 1991; Myers *et al.*, 2001], kaum Banden im silbergefärbten SDS-Gel zu detektieren waren. SDS-Gele der dritten Enzymfraktion aus der Leber zeigten typischerweise im 50 kDa Bereich eine deutliche Bande [Clement *et al.*, 1997]. Das isolierte CYP2D25 aus Schweinenieren zeigte im SDS-Gel ebenfalls eine Detektion bei 50 kDa [Bergman und Postlind, 1990]. Auch diese Untersuchung lässt die Beteiligung des CYP2D Enzyms an der Reduktion von Benzamidoxim in den Schweinenieren fragwürdig erscheinen.

Die eingekreisten Banden der SDS-Gele in Abb. 2.18 wurden der massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die identifizierten Proteine sind in Tab. 2.1 dargestellt. Wie aus Abbildung 2.18 ersichtlich ist, waren in Fraktion 46 noch mehrere Proteinbanden enthalten. Die 66 kDa Bande zeigte ihre stärkste Detektion in den Fraktionen 48-52 und korreliert damit nicht mit der Benzamidoxim-reduzierenden Fraktion (Abb. 2.16). Die 55 und 50 kDa Banden waren durchgehend in allen Fraktionen identisch intensiv detektierbar (Abb. 2.18). Hingegen zeigt die 35 kDa Bande eine Anfärbung, die in ihrer Intensität mit den Aktivitäten der Benzamidoxim-reduzierenden Fraktionen korreliert (Abb. 2.16; Abb. 2.18). Im Vergleich dazu nehmen die Farbdetektionen der 32 und 30 kDa Banden über mehrere Fraktionen zu und haben in den Fraktionen 50 und 51 ihre stärkste Intensität (Abb. 2.18). Diese korrelieren nicht mit der Aktivität der Benzamidoxim-Reduktase (Abb. 2.16). Die zusätzlich detektierbare Bande bei 16 kDa konnte in den Fraktionen 43-57 durchgehend angefärbt werden (Abb. 2.18). Auch hier ist keine Korrelation zur Aktivität der Benzamidoxim-Reduktase feststellbar (Abb. 2.16).

Die identifizierten Enzyme der 35 kDa Bande entstammen dem Menschen bzw. dem Affen, da das Genom des Schweins noch nicht vollständig bekannt ist, jedoch in vielen Fällen hohe Homologien zum Menschen vorhanden sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich um ein identisches Enzym handelt. Damit konnte

erstmals in Nierenmikrosomen des Schweins ein molybdäncofaktorhaltiges Enzym detektiert werden.

Das Ergebnis konnte durch den *nit-1* Rekonstitutions-Assay (Tab. 2.2), welcher spezifisch den Molybdäncofaktor nachweist, sowie der FormA-Analyse (Tab. 2.3), welche das Molybdopterin-Grundgerüst nachweist, bestätigt werden. Die erhaltenen Anreicherungsfaktoren sind vergleichbar mit der Anreicherung der Benzamidoxim-Reduktase im rekonstituierten System. Der gegen den rekombinanten C-Terminus der Mocosulfurase gerichtete Antikörper erkannte im Western Blot in den Benzamidoxim-Reduktase aktiven Fraktionen das 35 kDa Protein (Abb. 2.19). Eine Beteiligung des Molybdäncofaktor-haltigen Proteins am Benzamidoxim-Reduktase Enzymsystem ist somit als wahrscheinlich anzusehen.

Zusätzlich zur Reinigung wurden die Mikrosomen anhand einiger Enzyme charakterisiert. Da Cytochrom b_5 am hepatischen Enzymsystem beteiligt ist [Clement *et al.*, 1997], wurde die Aktivität in den Nierenmikrosomen ebenfalls bestimmt. Der ermittelte Wert von $0,25 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Kapitel 2.3.7.1.2) entsprach ungefähr dem von Mau [2002] bestimmten Wert. NADH Cytochrom b_5 Reduktase wurde in den Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien als weitere verantwortliche Komponente der Benzamidoxim-Reduktase identifiziert [Lomb, 1995; Havemeyer, 2006]. Die Aktivität von $3,25 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Kapitel 2.3.7.1.3) war mit der von Mau [2002] vergleichbar. Ein Cytochrom P450 Enzym der Subfamilie 2D wurde bisher in den Schweinelebermikrosomen als die dritte verantwortliche Komponente der Benzamidoxim-Reduktase angenommen [Lomb, 1995]. Der Cytochrom P450 Gehalt unterschied sich ebenfalls nicht wesentlich von dem von Mau [2002] ermittelten Daten (Kapitel 2.3.7.1.4).

NADPH Cytochrom P450 Reduktase ist ein membrangebundenes Enzym und gehört zum endoplasmatischen Monooxygenasesystem [Ruckpaul, 1993]. Es wird häufig als Markerenzym für eine mikrosomale Verunreinigung der Mitochondrien verwendet [Sottocasa *et al.*, 1967; Borgese und Longhi, 1990]. In dieser Arbeit wurde eine deutlich höhere Menge des Enzyms detektiert als Deters [2002] sie für Schweinenierenmikrosomen bestimmt hat (Kapitel 2.3.7.1.1). Bei den vorgenannten Enzymen konnte kein Unterschied in den Aktivitäten zu früheren Daten festgestellt werden, während das mikrosomale Enzym NADPH Cytochrom P450 Reduktase aber in dieser Arbeit eine deutlich erhöhte Aktivität zeigte. Das lässt vermuten, dass die gewonnenen Mikrosomen stärker angereichert und somit weniger stark verunreinigt waren, als die Mikrosomen von Deters [2002]. Die in dieser Arbeit gemessene Benzamidoxim-Reduktase Aktivität in den Schweinenierenmikrosomen war hingegen niedriger (Kapitel 2.3.7.2) verglichen mit den Daten von Mau [2002]. Somit führte

die stärkere Anreicherung der Mikrosomen zu einem geringeren Gehalt an Benzamidoxim-Reduktase. Ein Zusammenhang zwischen diesen Daten lässt den Schluss zu, dass das zu untersuchende Enzymsystem sich eventuell nicht vornehmlich in den Mikrosomen der Schweinenieren befindet, sondern trotz vorsichtiger Gewinnung von einem anderen Zellkompartiment verschleppt wurde.

Mikrosomen sind Trümmerteile des endoplasmatischen Retikulums, die häufig an Mitochondrien assoziiert sind oder diese sogar vollkommen umgeben. Hierbei finden auch Membranfusionen statt [Ardail *et al.*, 1993]. Der Aufbau des Mitochondriums ist in Kapitel 4.1.1 näher erläutert. An dieser Stelle sei erwähnt, dass Mitochondrien aus einer inneren und einer äußeren Membran aufgebaut sind. Da während der Gewinnung von Schweinenierenmikrosomen eine stärkere mechanische Belastung auf das Gewebe wirkt als bei der Gewinnung von Lebermikrosomen (Kapitel 2.2.1.2), ist die Zerstörung anderer Zellkompartimente eher möglich, im speziellen Fall der Mitochondrien eine Abtrennung der äußeren mitochondrialen Membran. Deters [2002] und Havemeyer [2006] konnten die Beteiligung der äußeren mitochondrialen Membran am Benzamidoxim-Reduktase System in der Schweineleber zeigen. Frühere Untersuchungen konnten einen kleinen mitochondrialen Anteil von unter 3 % in Mikrosomen nachweisen [Deters, 2002]. Dazu wurde ein typischer mitochondrialer Marker der inneren Membran gewählt.

In dieser Arbeit wurden die Schweinenierenmikrosomen auf ihren Monoaminoxidasegehalt hin untersucht (Kapitel 2.3.7.1.5). Die Monoaminoxidase ist ein typisches Markerenzym der äußeren mitochondrialen Membran. In den Mikrosomen wurde eine Aktivität von etwa 2 % im Vergleich zu der äußeren mitochondrialen Membran ermittelt (Tab. 3.2 und 4.3). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung einer Verschleppung von Fragmenten der äußeren mitochondrialen Membran in die Mikrosomen. Es sei angemerkt, dass auch in einigen Fraktionen der solubilisierten und am DEAE-Material aufgetrennten Mikrosomen die Monoaminoxidase detektiert werden konnte (Abb. 2.13). Dabei konnten in den Mikrosomen etwa 10 % der Monoaminoxidase-Aktivität detektiert werden, die in den DEAE-Fractionen der solubilisierten äußeren Membran der Schweinenierenmitochondrien festgestellt wurde (Abb. 2.13; 5.4). Dieses entspricht dem Ergebnis der Benzamidoxim-Reduktase Aktivität, welche in den DEAE-Fractionen der solubilisierten Mikrosomen auch etwa 10 % der Aktivität besitzt, die in den DEAE-Fractionen der solubilisierten äußeren mitochondrialen Membran detektiert wurde (Abb. 2.16; 5.8). Diese Untersuchung sollte Gegenstand weiterer Arbeiten zur Klärung der Verunreinigung von Mikrosomen mit äußerer mitochondrialer Membran sein. Möglicherweise hilft hier ein spezifischer Fluoreszenztest zur selektiven Detektion von Monoaminoxidase weiter. Ebenso können rasterelektronen-

mikroskopische Aufnahmen der Enzympräparationen einen genauen Aufschluss über die Zusammensetzung bieten.

Die Enzymverteilung der in dieser Arbeit gewonnenen Schweinenierenmikrosomen differierte teilweise von den Daten, die Mau und Deters [beide 2002] ermittelt hatten. Außerdem zeigten die hier beschriebenen Mikrosomen eine deutlich geringere Benzamidoxim-Reduktase Aktivität von $18 \text{ nmol Benzamidin} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Deshalb wurden die Mikrosomen in dieser Arbeit nochmals bezüglich ihrer *N*-reduktiven Aktivität charakterisiert (Kapitel 2.3.7.2).

Zusätzlich konnte erstmalig die Sauerstoffinsensitivität des Enzymsystems in Schweinenierenmikrosomen gezeigt werden (Abb. 2.25), wie sie vorher schon für das mikrosomale und mitochondriale Enzymsystem der Schweineleber demonstriert werden konnte [Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005].

Eine Beteiligung der Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase an der Benzamidoxim-Reduktase wird beschrieben und gilt in der Leber als gesichert [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 2005]. Inhibitoren hemmen oder verzögern biochemische Enzymreaktionen. Hiermit können Hinweise auf die Identität eines an einer bestimmten Katalyse beteiligten Enzyms gewonnen werden. In dieser Arbeit wurden zur Charakterisierung der *N*-reduktiven Aktivität Hemmstudien durchgeführt.

Der selektive Inhibitor *p*-Hydroxymercuribenzoat hemmt die NADH Cytochrom b_5 Reduktase [Lostanlen *et al.*, 1978], was für die Schweinenierenmikrosomen bestätigt werden konnte (Abb. 2.28). Ebenso konnte die Beteiligung von Cytochrom b_5 durch Hemmung mittels Cytochrom *c* bewiesen werden (Abb. 2.29), wobei der kompetitive Hemmstoff Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor des Cytochrom b_5 fungiert [Bernardi und Azzone, 1981].

Ähnlichkeiten zur beschriebenen Hydroxylaminreduktase [Bernheim und Hochstein, 1968; Kadlubar *et al.*, 1973] führten zu der Annahme, dass Hydroxylamin ein kompetitiver Hemmstoff von Benzamidoxim sein könnte. Havemeyer [2006] bestätigte das in ihrer Arbeit. Die starke Hemmung der Benzamidoximreduktion durch Hydroxylamin konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 2.27). Das Ergebnis lässt den Schluss zu, dass auch in Schweinenierenmikrosomen ein der Hydroxylaminreduktase vergleichbares Enzymsystem vorhanden sein kann.

Neben den membranständigen Enzymen Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase wurde die Beteiligung einer dritten Komponente an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen beschrieben [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et*

al., 1997; Andersson *et al.*, 2005], durch die die Umsetzungsraten deutlich erhöht werden konnten.

Clement *et al.* [1997] beschrieben ein Cytochrom P450 Isoenzym im mikrosomalen Enzymsystem der Schweineleber als verantwortliche Komponente zur Erhöhung der Umsatzratensteigerung. Die Schweinenierenmikrosomen hatten allerdings einen sehr viel geringeren Cytochrom P450-Gehalt als die Schweinelebermikrosomen [Clement *et al.*, 2005b].

Cytochrom P450 Isoenzyme werden durch den unspezifischen Hemmstoff Kohlenmonoxid inhibiert. Der Hemmstoff hatte bei der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (Abb. 2.30). Kohlenmonoxid hemmt die Oxidationsstufe +2 des im Hämgerüst enthaltenen Eisens. Zur Übertragung der Protonen während der Reduktion muss aber im postulierten Mechanismus [Clement, 2002] das Eisen der Oxidationsstufe +3 vorliegen, so dass eine Nichthemmung durch Kohlenmonoxid nicht die Beteiligung von P450 an der Reduktion ausschließt.

Dieses wurde durch den Hemmstoff Kaliumcyanid überprüft (Abb. 2.26). Es konnte eine Empfindlichkeit des Enzymsystems für Cyanidionen festgestellt werden. Dabei wurde die Umsatzrate auf 40 % des Anfangswertes reduziert. Die in der Literatur beschriebenen Daten sind diesbezüglich sehr unterschiedlich. Während Bernheim und Hochstein [1968] eine vollständige Hemmung erreichen konnten, beschrieben Kadlubar und Ziegler [1974] sowie Clement *et al.* [1997] eine Insensitivität des untersuchten Enzymsystems gegenüber Cyanidionen. Lopian [2002], Andersson *et al.* [2005] und Havemeyer [2006] konnten eine partielle Hemmung feststellen. Die inhibitorische Wirkung von Kaliumcyanid auf die Reduktion von Benzamidoxim wurde mit Schweinenierenmikrosomen bisher noch nicht untersucht. Da Cytochrom P450 Enzyme vollständig durch Cyanid gehemmt werden, muss der nur teilweise inhibitorische Effekt in dieser Untersuchung auf einem anderen Mechanismus beruhen. Auf der einen Seite könnten mehrere Enzymsysteme an der Reduktion von Benzamidoxim beteiligt sein, welche sich nur partiell durch Cyanidionen hemmen lassen. Andererseits ist aber auch eine nur partielle Hemmung des Cytochrom b₅ denkbar. Das Hämgerüst dieses Enzyms ist fast vollständig vom umgebenden Medium abgeschirmt [Durley und Mathews, 1996; Strittmatter und Dailey, 1982], was die geringe Bindungsfähigkeit von Cyanid erklärt (Kapitel 6.1.1).

Havemeyer [2006] fand in der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien ein den Molybdäncofaktor enthaltendes Enzym als das verantwortliche Coenzym für die Reduktion von Benzamidoxim. Aufbau und Funktionsweise dieses Coenzym sind in Kapitel 6.1.4 beschrieben. Molybdänhaltige Enzyme sind durch Vanadationen

hemmbar [Ramadoss, 1980]. Die Immunoblot-Analyse detektierte den Molybdäncofaktor spezifisch in den Benzamidoxim-Reduktase aktiven Fraktionen der DEAE-Säule (Abb. 2.19).

Eine Hemmung des in den Schweinenierenmikrosomen befindlichen Enzymsystems fand schon bei geringer Vanadatkonzentration statt (Abb. 2.31). Die Beteiligung des Molybdäncofaktors enthaltenen Enzyms am Benzamidoxim-reduzierenden Enzymsystem ist somit in den Schweinenierenmikrosomen nicht auszuschließen. Da aber mehrere Enzyme durch Vanadationen gehemmt werden, ist eine Bestätigung der Verantwortlichkeit zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich. Dennoch deutet auch dieser Nachweis darauf hin, dass ein Cytochrom P450 Isoenzym, für das eine Vanadathemmung bisher noch nicht beschrieben wurde, an der Reduktion von Benzamidoxim eher nicht beteiligt ist. Außerdem ist fraglich, ob der positive Nachweis des Molybdäncofaktor enthaltenen Enzyms tatsächlich originär aus den Mikrosomen stammt oder, ähnlich wie die Monoaminoxidase, bei der Herstellung der Mikrosomen als Verunreinigung eingeschleppt wurde, denn Havemeyer [2006] hat die Benzamidoxim-Reduktase spezifisch auf der äußeren mitochondrialen Membran der Schweineleber beschrieben.

Das Detergenz Zwittergent[®] 3-14 wirkt sich, wie bereits beschrieben, nur in geringem Umfang auf die *N*-Reduktivität der Schweinenierenmikrosomen aus. Zwittergent[®] 3-14 inaktiviert Cytochrom P450 Isoenzyme, erkennbar am Auftreten eines Maximums bei 420 nm in Gegenwart von Kohlenmonoxid. Ein Vergleich dieser „Hemmung“ von Cytochrom P450 durch Zwittergent[®] 3-14 zeigte deutlich, dass hier keine Korrelation zu finden war (Abb. 2.32). Während der Cytochrom P450-Gehalt stetig abnahm, hatte Zwittergent[®] 3-14 zunächst einen aktivierenden Effekt, wie auch Havemeyer [2006] ihn nachweisen konnte, und erst im höhermolaren Bereich eine hemmende Wirkung. Die Abnahme des CYP450-Gehaltes korrelierte dabei mit der Zunahme des Peaks bei 420 nm, der nicht-aktives Protein zeigte. Diese Reaktion war irreversibel (Daten nicht gezeigt). Die Beteiligung eines CYP450 Isoenzym an der Reduktion von Benzamidoxim in den Schweinenierenmikrosomen wird auch hierdurch eher unwahrscheinlich.

2.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte das verantwortliche Enzymsystem zur Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin aus Schweinenierenmikrosomen isoliert und charakterisiert werden. Das Enzymsystem zur Benzamidoxim-Reduktion der Schweinelebermikrosomen besteht aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und einem Cytochrom P450 Isoenzym der Subfamilie 2D. Der Ablauf der Isolierung des Enzymsystems aus Schweinelebermikrosomen war nicht auf die Reinigung der Nierenmikrosomen übertragbar. Da in der humanen Leber ein Cytochrom P450 Isoenzym isoliert wurde, welches Benzamidoxim zu reduzieren vermochte, wurde eine an die Literatur angepasste Reinigung entwickelt, welche speziell zum Ziel hatte, Cytochrom P450 Isoenzyme zu isolieren. Dieses führte zu einer CYP450 Fraktion, welche nicht in der Lage war Benzamidoxim zu reduzieren. Dabei konnte ein störender Einfluss der Detergentien ausgeschlossen werden, da die isolierte Enzymfraktion keinen Einfluss auf die Reduktion von Benzamidoxim bei Zugabe zu unbehandelten Schweinenierenmikrosomen hatte, während schon die Zugabe geringer Mengen des verwendeten Detergenzes die Reduktion von Benzamidoxim hemmte.

Das bisher aus Schweinelebermikrosomen isolierte CYP450 Isoenzym weist Ähnlichkeiten zur Vitamin D_3 25-Hydroxylase des Schweins auf und wurde als CYP2D25 klassifiziert. Das CYP2D25 wiederum hat 77 % Sequenzhomologie zu CYP2D6 [Myers *et al.*, 2001], welches das bisher einzige im Menschen gefundene CYP2D Enzym darstellt. Neuere Untersuchungen zur mRNA Verteilung von Cytochrom P450 Isoenzymen im Menschen haben ergeben, dass das CYP2D6 in der Niere nur 1 % der Menge entspricht, die in der Leber gefunden wurde [Nishimura *et al.*, 2003]. Immunoblotuntersuchungen haben dieses Verhältnis für Mensch und Maus bestätigt [Miksys *et al.* 2005]. Des weiteren wurde das CYP2D25 sowohl aus der Schweineleber als auch aus der Schweineniere isoliert. Dabei wurde eine nur 20 %ige Aktivität des Enzyms der Niere gegenüber der Leber festgestellt [Postlind und Wikvall, 1988].

Diese Daten waren Grundlage für Vergleichsuntersuchungen von Leber- und Nierenmikrosomen bezüglich Benzamidoxim-Reduktion und einer typischen CYP2D Markerreaktion, der *O*-Demethylierung von Dextromethorphan. Die Schweinelebermikrosomen *O*-demethylierten etwa viermal mehr Dextromethorphan als die Schweinenierenmikrosomen. Die Enzymverteilung in den Organen zeigt klar, dass das CYP2D Isoenzym in wesentlich geringerem Umfang in der Niere zu finden ist, was durch die *O*-Demethylierung von Dextromethorphan bestätigt wurde.

Dahingegen zeigten die Nierenmikrosomen dreifach höhere Aktivität in der Reduktion von Benzamidoxim als die Schweinelebermikrosomen.

Aus der äußeren mitochondrialen Membran der Schweineleber wurde von Havemeyer [2006] ebenfalls ein Enzymsystem isoliert, welches Benzamidoxim zu reduzieren vermag. Dieses setzt sich aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und einem Protein, welches den Molybdäncofaktor enthält, zusammen. Da Mikrosomen und Mitochondrien aneinander gelagert und teilweise sogar miteinander verschmolzen sind, wurden die Schweinenierenmikrosomen hinsichtlich ihrer Verunreinigung mit äußerer mitochondrialer Membran anhand des Markerenzym Monoaminoxidase untersucht. Dieses Enzym wurde zu einem geringen Anteil in den Mikrosomen gefunden, so dass eine Verunreinigung der Mikrosomen mit äußerer mitochondrialer Membran angenommen werden muss. Zudem ist damit unklar, ob die Aktivität der Mikrosomen überhaupt originär aus diesen stammt oder die Verunreinigung mit der äußeren mitochondrialen Membran dafür verantwortlich ist. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Benzamidoxim-Reduktase eher um ein mitochondriales Enzymsystem, welches eventuell im endoplasmatischen Retikulum co-exprimiert wird.

Aus diesem Grund wurden die Mikrosomen analog der mitochondrialen Isolierung aus der Schweineleber über eine Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Dabei wurde eine aktive *N*-reduktive Fraktion isoliert. In dieser Fraktion konnte mittels Immunoblotanalyse die Anwesenheit des Molybdäncofaktors detektiert werden. Auch in der Massenanalyse konnte ein Molybdäncofaktor bestimmt werden. Außerdem wurde durch diesen Reinigungsschritt eine Anreicherung sowohl der Benzamidoxim-Reduktase als auch des Molybdäncofaktors gegenüber den Mikrosomen erreicht. Die *O*-Demethylierung von Dextromethorphan als CYP2D Markerkontrolle fiel in den Benzamidoxim-Reduktase aktiven Fraktionen negativ aus und gab einen weiteren Hinweis darauf, dass das CYP2D Enzym der Leber eher nicht das verantwortliche Enzym in der Niere sein kann.

Da bisher noch nicht gezeigt wurde, dass Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase tatsächlich auch an der Reduktion von Benzamidoxim in der Niere beteiligt sind, wurde dieses durch Hemmstudien belegt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das mikrosomale Enzymsystem der Nieren gut durch Vanadationen hemmbar war, welche einen typischen Hemmstoff von Molybdäncofaktor enthaltenden Enzymen darstellen. Kohlenmonoxid und Kaliumcyanid, typische Inhibitoren von Cytochrom P450 Isoenzymen, zeigten hingegen keinen bzw. nur einen partiellen Einfluss auf die Enzymaktivität. Zusätzlich konnte für das Detergenz Zwittergent[®] 3-14 zunächst ein aktivierender Einfluss auf die Benzamidoxim-Reduktase demonstriert werden, bevor es im höhermolaren Bereich zu einer Hemmung kam. Gleichzeitig zeigte es aber eine

inhibitorische Wirkung auf den Cytochrom P450 Nachweis, der hinsichtlich des Cytochrom P450-Gehaltes nicht mit der Benzamidoxim-Reduktase Aktivität korrelierte.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Beteiligung des CYP2D Isoenzym der Schweineleber am mikrosomalen Enzymsystem der Schweineniere unwahrscheinlich. Die Verunreinigung der Mikrosomen mit äußerer mitochondrialer Membran sollte Anlass zur näheren Untersuchung geben, um eindeutig feststellen zu können, ob die originäre Benzamidoxim-Reduktase Aktivität allein durch die Verunreinigung mit äußerer mitochondrialer Membran hervorgerufen wird. Unabhängig davon zeigen die dargestellten Daten, dass die Niere einen hohen Stellenwert für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen hat, der vergleichbar mit dem der Leber ist. Eine Isolierung und Identifizierung des Enzymsystems zur Reduktion von Benzamidoxim aus den Schweinenierenmitochondrien kann vielleicht dazu beitragen, die originäre Exprimierung dieses Enzymsystems zu lokalisieren.

3 ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON SCHWEINENIERENMITOCHONDRIEN

3.1 Einleitung

Der Metabolismus von endogenen und exogenen Substanzen erfolgt in vielen Geweben des Körpers. Innerhalb dieser Gewebe findet man in unterschiedlichen Bereichen und Zellbestandteilen biotransformatorisch wirksame Enzyme. Der Metabolismus in Nieren wurde in Kapitel 1.2 ausführlich dargestellt. Insbesondere in Mitochondrien konnte eine hohe *N*-reduktive Aktivität nachgewiesen werden [Andersson *et al.*, 2005; Clement *et al.*, 2005b].

Bei der Gewinnung der Schweinenierenmitochondrien ist darauf zu achten, dass sie unversehrt, metabolisch aktiv und möglichst frei von mikrosomalen Membranfragmenten sein sollten. Die Unversehrtheit wird aus dem physiologischen Aufbau der Zellorganelle gefordert. Die Doppelmembran der Mitochondrien muss als Permeationsbarriere erhalten bleiben, um *in vivo* Verhältnisse beizubehalten [Stryer *et al.*, 2003]. Zur näheren Untersuchung der Organelle muss metabolische Aktivität vorliegen. Mikrosomale Fragmente können die Katalyse der zu untersuchenden Biotransformation falsch positiv vortäuschen (s. Kap. 2). Aus diesem Grunde sollte die Gewinnung möglichst schonend ablaufen, um eine Kontamination der Schweinenierenmitochondrien mit mikrosomalen Fragmenten zu vermeiden.

Die Charakterisierung der Mitochondrien ist anhand der oben genannten Punkte durchzuführen. Dabei können verschiedene Methoden wie enzymatische, immunochemische und analytische Testverfahren oder auch elektronen-mikroskopische Aufnahmen eingesetzt werden.

3.1.1 Bisherige Untersuchungen

Das Ausmaß der Kontamination und Intaktheit der Organellen wird wesentlich durch die Gewinnungsmethode bestimmt [Blume, 1979].

Neben einer möglichst schonenden Methode erfolgt die Gewinnung der Mitochondrien mittels Auftrennung der Zellorganellen mit differentieller Zentrifugation, da diese bei unterschiedlichen *g*-Zahlen sedimentieren [Ozols, 1990; Arinc *et al.*, 1992].

Deters [2002] und Havemeyer [2006] haben in ihren Arbeiten Mitochondrien gewonnen. Deters [2002] hat dabei die Organe Leber und Niere verwendet. Sie hat

die Mitochondrien mittels konventioneller Differentialzentrifugation gewonnen. Die in der Literatur beschriebene Methode [Beattie, 1968; Kline *et al.*, 1986] wurde leicht modifiziert angewandt.

Havemeyer [2006] hat in Ihrer Arbeit die von Deters [2002] angewandte Methode mit der in der Literatur beschriebenen Methoden nach Hovius *et al.* [1990] (kontinuierliche Dichtezentrifugation) und einer Kombination aus beiden verglichen. Ihre Untersuchungen fanden mit Schweinelebermitochondrien statt. Die Ergebnisse zeigen eine Gleichwertigkeit der Methoden. Einzig der Zeitfaktor zur Gewinnung der Organellen spricht für die Gewinnungsmethode nach Hovius *et al.* [1990].

3.1.2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten Schweinenierenmitochondrien nach der Methode von Hovius *et al.* [1990] gewonnen werden. Eine Übertragbarkeit der Gewinnungsmethode von Schweinelebermitochondrien auf Schweinenierenmitochondrien sollte überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden. Als Ausmaß für eine mikrosomale Kontamination war die NADPH Cytochrom P450 Reduktase-Aktivität zu bestimmen. Aus diesem Grund sollten gleichzeitig Schweinenierenmikrosomen gewonnen werden. Außerdem war ein typischer Marker (Monoaminoxidase) für die Mitochondrien als Aufreinigungsfaktor zu bestimmen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Mitochondrien, welche Proteinbestimmung, Reinheit, *N*-reduktive Aktivität und Hemmstudien beinhaltet.

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung der Enzympräparation

3.2.1.1 Materialien und Geräte

Sofern nicht angegeben, befindet sich eine Übersicht über die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 der vorliegenden Arbeit.

3.2.1.2 Gewinnung von Schweinenierenmitochondrien

Die Schweinenieren zur Gewinnung der Mitochondrien stammten von einem ortsnahen Schlachter aus Einzelschlachtungen. Die Tiere wurden per Elektroschock getötet, durch Öffnen der Halsschlagader ausgeblutet und anschließend einem Brühbad unterworfen. Danach wurden den Schweinen die Nieren entnommen und in einem 4 °C kaltem Standardpuffer (10 mM Kaliumphosphat, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 % (w/v) BSA, pH 7,4) zum Labor transportiert. Pro Aufarbeitung wurden 8 Nieren sowohl weiblicher Tiere als auch männlicher Kastrate verwendet.

Die Gewinnung der Schweinenierenmitochondrien erfolgte in Anlehnung an die Methode von Hovius *et al.* [1990]. Die folgenden Reinigungsschritte fanden bei 4 °C oder unter Eiskühlung statt. Zunächst wurden die Nieren gehäutet und von ihrer bindegewebsartigen Kapsel getrennt. Eine Perfusion der Nieren wurde mit Standardpuffer durchgeführt. Die Gefäße in den Nieren sind sehr klein, so dass die Perfusion nicht ausreichend war. Von den Nieren wurden nur die Rinde sowie das Mark verwendet, Fettgewebe und Sammelbecken wurden verworfen. Die klein geschnittenen Nierenstücke wurden so lange mit Standardpuffer gespült, bis das Waschwasser nahezu farblos blieb. Die gut gespülten Nierenstückchen wurden durch einen handelsüblichen Fleischwolf gegeben. Dieser Vorgang musste zweimal durchgeführt werden, da das Nierengewebe sehr hart und fest war und eine weitere Zerkleinerung sonst nicht möglich gewesen wäre. Die so erhaltene Masse wurde mit gleichem Volumen Standardpuffer gemischt und zweimal durch einen Durchflusshomogenisator gegeben [Ziegler und Pettit, 1966]. Der Verlust an Volumen durch das Homogenisieren wurde durch Auffüllen mit Standardpuffer wiederhergestellt. Anschließend wurde das entstandene Nierenhomogenat mit Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

Das Homogenat wurde 15 Minuten bei 600 *g* (Rotor JA 10) zentrifugiert, um Zellkerne, Zelltrümmer und Erythrozyten abzutrennen. Dieser Schritt wurde so oft durchgeführt, bis das Pellet nicht mehr rot gefärbt war. In der Regel lief dieser Zentrifugationsschritt fünf- bis siebenmal ab. Der erhaltene Überstand wurde zur Abtrennung von Fettsäuren durch Verbandmull kolliert. Die vereinigten Überstände wurden für 20 Minuten bei 10.300 *g* (Rotor JA 10) zentrifugiert. In diesem Schritt wurde die Mikrosomenfraktion abgetrennt. Das erhaltene Pellet wurde mit wenig Standardpuffer resuspendiert. Es handelte sich hierbei um Mitochondrien, die noch nicht rein waren. Sie werden deshalb als rohe Mitochondrienfraktion bezeichnet.

In einer Dichtegradientenzentrifugation wurde die rohe Mitochondrienfraktion mit einem Gradientenpuffer (30 % Percoll[®], 225 mM Saccharose, 1 mM EGTA, 25 mM HEPES, 1 mM DTT, 0,1 % (w/v) BSA, pH 7,4) weiter gereinigt. Etwa drei bis vier Milliliter der Fraktion wurden vorsichtig auf 62 ml Gradientenpuffer geschichtet und 40 Minuten bei 95.000 *g* (Rotor 45 Ti) zentrifugiert. Die erhaltene dunkle Mitochondrienfraktion wurde abpipettiert und mit 1,5 Liter Standardpuffer zweimal gewaschen. Der Waschschrift fand 20 Minuten bei 6.300 *g* (Rotor JA 10) statt. Das erhaltene Pellet wurde in Standardpuffer resuspendiert, mit Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7,4 eingestellt, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Zur gleichzeitigen Nierenmikrosomengewinnung wurde mit dem 10.300 *g* Überstand nach der unter Kapitel 2.2.1.2 beschriebenen Methode weiter verfahren: Die vereinigten Überstände wurden 60 Minuten bei 100.000 *g* (Rotor 45 Ti) der Ultrazentrifugation unterzogen. Das erhaltene Pellet wurde mit Standardpuffer in einem Teflon-Glas-Homogenisator resuspendiert und zur weiteren Aufreinigung erneut 60 Minuten bei 100.000 *g* ultrazentrifugiert. Das entstandene mikrosomale Pellet wurde wieder in Standardpuffer resuspendiert, mit Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7,4 eingestellt, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparation

3.2.2.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mittels der BCA-Methode [Smith *et al.*, 1985] durchgeführt. Das Arbeitsreagenz (bestehend aus Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, Natriumtartrat und Kupfersulfat in 0,1 N Natronlauge) von Fa. Pierce (Rockford, IL, USA) wurde laut Anleitung für jede Bestimmung frisch hergestellt. 900 µl BCA-Reagenz wurden zu

100 µl Proteinlösung (Verdünnung 1:10 bis 1:50 mit *Aq. bidest.*) gegeben und abweichend von der Firmenvorschrift 20 Minuten bei 60 °C inkubiert. Mittels Eiswasser wurde die Reaktion gestoppt. Innerhalb von 3 Minuten wurden die Proben bei 562 nm kolorimetrisch gegen den Blindwert (100 µl Standardphosphatpuffer pH 7,4 als Ersatz für die Proteinlösung) vermessen. Die Auswertung erfolgte durch Erstellung einer Kalibriergeraden mit Rinderserumalbumin in bekannter Konzentration. Diese wurde stets in einem parallelen Ansatz mit dem BCA-Reagenz erstellt.

War der Proteingehalt der Probe sehr gering oder waren Störungen der Bestimmung durch Detergentien oder reduzierende Bestandteile wie Dithiothreitol zu vermuten, so wurde der Proteinbestimmung eine Säurefällung mit Trichloressigsäure vorgeschaltet. Das Arbeitsreagenz (bestehend aus UPPATM - I Reagenz und UPPATM - II Reagenz) von Fa. Pierce (Rockford, IL, USA) wurde laut Arbeitsanweisung verwendet. 250 µl Reagenz 1 wurden zu 50 µl Proteinlösung gegeben, kurz gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zufügen von 250 µl Reagenz 2 und kurzem Mischen wurde fünf Minuten bei 10.000 U*min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Anschließend wurde das gefällte Protein in 300 µl BCA-Reagenz durch kräftiges Mischen wieder gelöst. 200 µl dieser Lösung wurden im Microplaterreader 20 Minuten bei 44 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 562 nm kolorimetrisch gegen den Blindwert vermessen. Die Auswertung erfolgte durch Erstellung einer Kalibriergeraden mit Rinderserumalbumin in bekannter Konzentration. Die Kalibriergerade wurde stets in einem parallelen Ansatz mit dem BCA-Reagenz erzeugt, wobei die einzelnen Standards unter den gleichen Bedingungen aufgearbeitet und inkubiert wurden, wie die zu untersuchenden Proben.

3.2.2.2 NADPH Cytochrom P450 Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die NADPH Cytochrom P450 Reduktase-Aktivitätsbestimmung erfolgte mit Modifikationen nach der Methode von Sottocasa *et al.* [1967]. Hierbei wurde die Reduktion von Cytochrom c spektralphotometrisch vermessen, indem die Absorptionsänderung bei 550 nm verfolgt wurde, da das reduzierte Cytochrom c hier sein Absorptionsmaximum hat. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon=21 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ für die reduzierte Form des Cytochrom c herangezogen [Kamin *et al.*, 1965].

Die Zusammensetzung des Enzymassays stellte sich wie folgt dar: 2-25 µg Protein, 100 µM NADPH, 40-100 µM Cytochrom c, 0,05 % (v/v) Triton[®] X-100 und 300 µM

Kaliumcyanid in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5. Alle Reagentien wurden stets frisch hergestellt. Präparationsabhängig wurden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt. Die Messzeit betrug 20 Sekunden bei 30 °C. Die Enzymaktivität ist im Folgenden in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute 1 μmol Cytochrom c umsetzt.

Zur Berechnung der mikrosomalen Kontamination wurde die spezifische Enzymaktivität der zugehörigen Mikrosomenfraktion des selben Gewebepools gleich 100 % gesetzt.

3.2.2.3 Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung

Die Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung wurde modifiziert nach der Methode von Kline *et al.* [1986] bestimmt.

Folgende Zusammensetzung wurde für den Enzymassay genutzt: in 500 μl Gesamtvolumen waren etwa 80 μg mitochondriales Protein, 10 mM Benzylamin-HCl, 0,05 % (v/v) Triton X-100 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 enthalten. Alle Reagentien wurden stets frisch hergestellt. Durch Zugabe des Benzylamin-HCl wurde die Reaktion gestartet. Die Absorptionzunahme bei 250 nm wurde über eine Messzeit von einer Minute bei 30 °C bestimmt.

Das Messprinzip beruht auf der enzymatisch katalysierten Bildung von Benzaldehyd. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon=13 \text{ nM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ für Benzaldehyd [Tabor *et al.*, 1954] verwendet.

Die Enzymaktivität ist im Folgenden in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute 1 μmol Benzylamin-HCl umsetzt.

3.2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktase

3.2.3.1 Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin

Die *N*-reduktive Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet.

3.2.3.1.1 Synthese von Benzamidoxim

Benzamidoxim wurde nach der Methode von Krüger [1885] aus Benzonitril und Hydroxylamin synthetisiert und nach den üblichen Methoden auf Identität und Reinheit geprüft.

3.2.3.1.2 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die mitochondrialen Biotransformationsstudien setzte sich aus 75 µg mitochondrialem Protein, 400 µM NADH und 500 µM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,2 zusammen.

Zunächst wurden die Mitochondrien bei 37 °C zwei Minuten vorinkubiert, dann das Benzamidoxim zugegeben und nach weiteren drei Minuten Vorinkubation die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 *g* trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

3.2.3.1.3 HPLC-Analytik

In Anlehnung an die von Friedrich [2003] entwickelte Methode wurde gebildetes Benzamidin mittels HPLC-Analytik bestimmt.

Der Eluent wurde durch einen Sartorius® Membranfilter (0,45 µm) per Vakuumfiltration von Partikeln befreit. Vor der Verwendung wurde der Eluent 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

HPLC-Pumpe und Controller: Waters 600 E Multisolvent Delivery System

Detektor: Waters 486 TAD UV

Autosampler: Waters 700 Satellite WISP

Integrator:	EZChrom Client Chromatography Software Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA)
Stationäre Phase:	LiChroCART 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher [®] 60 RP-select B (5 µm), Vorsäule RP-select B, 4*4 mm (Merck, Darmstadt)
Mobile Phase:	10 mM 1-Octylsulfonat in <i>Aq. bidest./Acetonitril</i> 82,5:17,5 (v/v) (pH-Wert nicht eingestellt)
Laufzeit:	28 Minuten
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektion:	UV, 229 nm

Die Retentionszeiten lagen bei $8,0 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidoxim) und $24,2 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidin).

Die Kalibrierung zur Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Benzamidin erfolgte mit sieben verschiedenen Konzentrationen im Bereich 0-250 µM gelöst in Fließmittel und wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen. Für jede Konzentration wurden zwei Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt vermessen wurden. In diesem Bereich verlief die Kalibrierung linear mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9996$. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde den Inkubationsansätzen die für die Kalibrierung verwendeten Benzamidin-Konzentrationen zugesetzt. In Abwesenheit des Cosubstrates NADH sowie Denaturierung der Proteinpräparation wurden Zusammensetzung, Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung entsprechend der beschriebenen Methode unter 3.2.3.1.2 gewählt. Benzamidin konnte im angegebenen Konzentrationsbereich (bis 250 µM) quantifiziert werden. Die Wiederfindungsrate betrug 104 ± 4 %.

3.2.3.1.4 Anaerobe Inkubationsbedingungen

Der Inkubationsansatz entsprach der in Kapitel 3.2.3.1.2 beschriebenen Standardzusammensetzung.

Für die Durchführung wurden Modifikationen vorgenommen. Protein und Substrat wurden in einem mit Argon begasten Exsikkator mit 37 °C warmem Kaliumphosphatpuffer vorinkubiert. Während dieser Vorinkubationszeit wurde der Exsikkator dreimal evakuiert und erneut mit Argon befüllt. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates wurden die Reaktionsgefäße in der Argonatmosphäre verschlossen und im 37 °C Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 *g* trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

3.2.3.1.5 Hemmstudien

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurde die für die mitochondriale Fraktion gültige Standardzusammensetzung (s. Kapitel 3.2.3.1.2) unter Standardbedingungen verwendet.

IC₅₀ Inhibitorkonzentrationen wurden mit dem Programm Sigma Plot 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) berechnet.

Je nach Hemmstoff wurden einzelne Modifikationen durchgeführt.

3.2.3.1.5.1 Kaliumcyanid

Es wurde eine 30-minütige Vorinkubation des Proteins mit Kaliumcyanid und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

3.2.3.1.5.2 Hydroxylamin-HCl

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit Hydroxylamin-HCl und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach

15 Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

3.2.3.1.5.3 *p*-Hydroxymercuribenzoat

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit *p*-Hydroxymercuribenzoat und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

3.2.3.1.5.4 Cytochrom c

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit Cytochrom c und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

3.2.3.1.5.5 Kohlenmonoxid

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 15 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die mitochondrialen Biotransformationsstudien setzte sich aus 1000 µg mitochondrialem Protein, 400 µM NADH, 500 µM Benzamidoxim in 2000 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,2 zusammen.

Zunächst wurden die Mitochondrien bei 37 °C mit Benzamidoxim zwei Minuten vorinkubiert, dann 30 Sekunden mit Kohlenmonoxid begast und nach weiteren fünf Minuten Vorinkubation die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2000 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei

-20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 *g* trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

3.2.3.1.5.6 Natriumvanadat

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit Natriumvanadat und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Charakterisierung der Schweinenierenmitochondrien

3.3.1.1 Mikrosomale Kontamination

Die Bewertung der mikrosomalen Kontamination der gewonnenen Schweinenierenmitochondrien erfolgte mittels des mikrosomalen Markers NADPH Cytochrom P450 Reduktase. Zur Vergleichbarkeit wurden parallel zur Gewinnung der Mitochondrien aus dem gleichen Nierenpool auch Mikrosomen gewonnen. Tabelle 3.1 zeigt die gemessenen Enzymaktivitäten und die daraus berechnete mikrosomale Kontamination der nach der Methode von Hovius *et al.*, [1990] gewonnenen Schweinenierenmitochondrien.

Tab. 3.1: NADPH Cytochrom P450 Reduktase-Aktivität der mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Schweinenierenmitochondrien und der korrespondierenden Schweinenierenmikrosomen (Kapitel 3.2.1.2)

Zellbestandteil	spezifische Enzymaktivität [U*mg ⁻¹]	Kontamination [%]
Mikrosomen	0,464 ± 0,118	100
rohe Mitochondrien	0,116 ± 0,048	25
reine Mitochondrien	0,012 ± 0,005	3

Die Enzymaktivität wurde als Mittelwert aus mindestens drei separaten Bestimmungen ermittelt. Die Bestimmung wurde nach der in Kapitel 3.2.2.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Die mikrosomale Aktivität wurde als 100 % gesetzt.

3.3.1.2 Anreicherung der Mitochondrien

Die Kontrolle der erfolgreichen Anreicherung der Mitochondrien wurde anhand des mitochondrialen Markers Monoaminoxidase bestimmt. Aus der Anreicherung wurde der Anreicherungsfaktor errechnet. Zur Vergleichbarkeit wurden parallel zur Gewinnung der Mitochondrien aus dem gleichen Nierenpool auch Mikrosomen gewonnen. Tabelle 3.2 zeigt die gemessenen Enzymaktivitäten und den daraus berechneten Anreicherungsfaktor nach der Methode von Kline *et al.* [1986].

Tab. 3.2: Monoaminoxidase-Aktivität der mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Schweinenierenmitochondrien und der korrespondierenden Schweinenierenmikrosomen (Kapitel 3.2.1.2)

Zellbestandteil	spezifische Enzymaktivität [U*mg ⁻¹]	Anreicherung [%]
Mikrosomen	0,0060 ± 0,0027	100
rohe Mitochondrien	0,0157 ± 0,0015	262
reine Mitochondrien	0,0525 ± 0,0084	875

Die Enzymaktivität wurde als Mittelwert aus mindestens drei separaten Bestimmungen ermittelt. Die Bestimmung wurde nach der in Kapitel 3.2.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die mikrosomale Aktivität wurde als 100 % gesetzt.

3.3.1.3 Proteinausbeute der Schweinenierenmitochondrien-Gewinnung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels der BCA-Methode sind jeweils mindestens zwei Einzelmessungen durchgeführt worden. Die daraus gebildeten Mittelwerte wurden für die weiteren Bestimmungen eingesetzt. Die prozentualen Standardabweichungen wurden berechnet und lagen stets unter 4 %. Eventuell störende Substanzen (EDTA, DTT) aus den zur Gewinnung verwendeten Puffern zeigten bei den eingesetzten Probeverdünnungen 1:10 bis 1:50 keinen Einfluss auf die Messergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Der mittlere Proteingehalt einer Mitochondriencharge lag bei 27 mg/ml (Mittelwert aus fünf Mitochondrienchargen). Die dabei gewonnene Gesamtproteinmenge lag chargenabhängig zwischen 170 und 1300 mg (Vergleich der fünf Mitochondrienchargen).

3.3.1.4 Charakterisierung und Inkubationsoptimierung der Reduktion von Benzamidoxim durch Schweinenierenmitochondrien

Die nach der Methode von Hovius *et al.* [1990] gewonnenen Schweinenierenmitochondrien wurden nach den Gesichtspunkten Proteinkonzentration, Inkubationszeit, Cosubstratabhängigkeit und -art, pH-Wert und Substratabhängigkeit für das Substrat Benzamidoxim untersucht. Es ergab sich dabei folgender optimierter Inkubationsansatz (Kapitel 3.2.3.1.2): 75 µg mitochondriales Protein, 400 µM NADH und 500 µM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,2 bei 15 Minuten Inkubationszeit. Die erhaltenen Daten sind in den Abbildungen 3.1-3.5 dargestellt.

3.3.1.4.1 Proteinabhängigkeit

Aus den erhaltenen Signalfächern wurden mit Hilfe der Wiederfindung die Umsatzraten berechnet. Dabei ergaben die Umsatzraten der Inkubationen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Bereich von 0 bis 200 μg je 150 μl Inkubationsansatz einen linearen Verlauf. Höhere Proteinkonzentrationen führten zu einer Hemmung der Umsatzraten (Abb. 3.1).

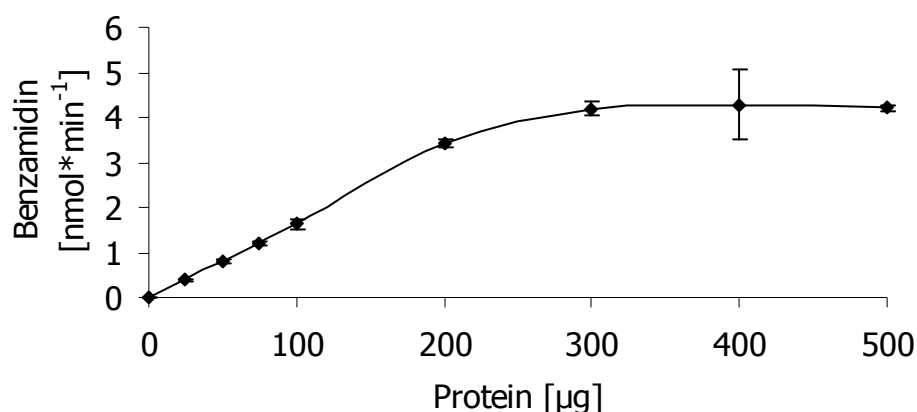


Abb. 3.1: Proteinabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0-500 μg Protein, 1 mM NADH und 1 mM Benzamidoxim in 150 μl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,0. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.4.2 Inkubationszeit

Die Inkubationszeit für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin verlief über einen Zeitraum bis 20 Minuten linear. Wurde noch länger inkubiert, so nahm die Reaktionsgeschwindigkeit ab (Abb. 3.2). Gebildetes Benzamidin war bereits nach wenigen Minuten gut quantifizierbar.

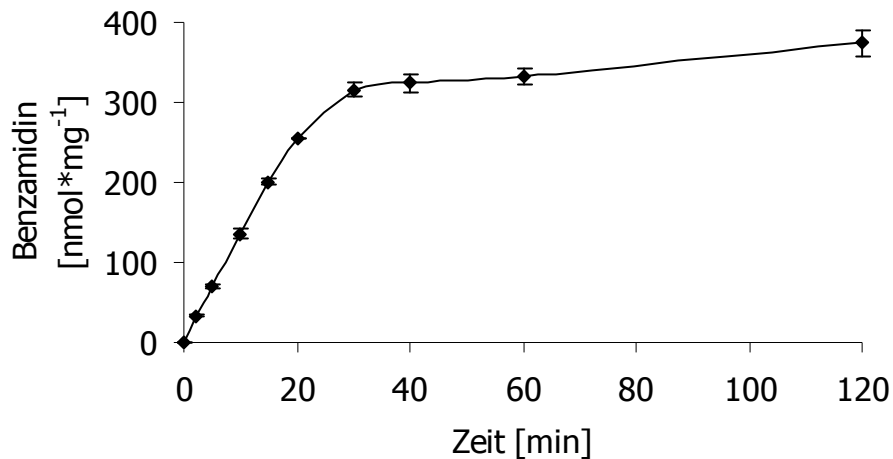


Abb. 3.2: Zeitabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 75 µg Protein, 1 mM NADH und 1 mM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,0. Die Inkubationszeit betrug 0-120 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.4.3 pH-Wert

Die pH-Wertabhängigkeit ergab in einem Bereich von pH 4,0 bis pH 8,0 ein Optimum bei pH 6,2 (Abb. 3.3).

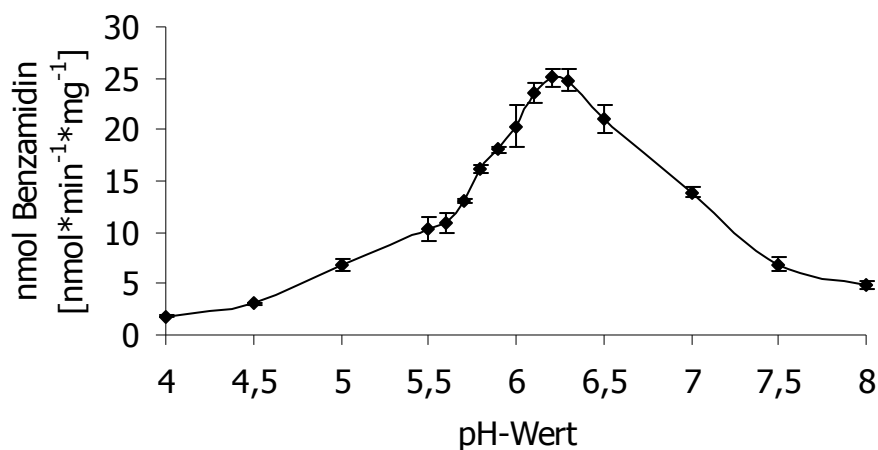


Abb. 3.3: pH-Wertabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 75 µg Protein, 1 mM NADH und 1 mM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 4,0-8,0. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.4.4 Substratabhängigkeit

Die Substratabhängigkeit des Benzamidoxims folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 3.4). Im Lineweaver-Burk-Plot betrug die Substratkonzentration bei halbmaximaler Sättigung (K_m) $75 \mu\text{M}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) $19,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die sich daraus ergebende katalytische Effizienz lag bei $2,56 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

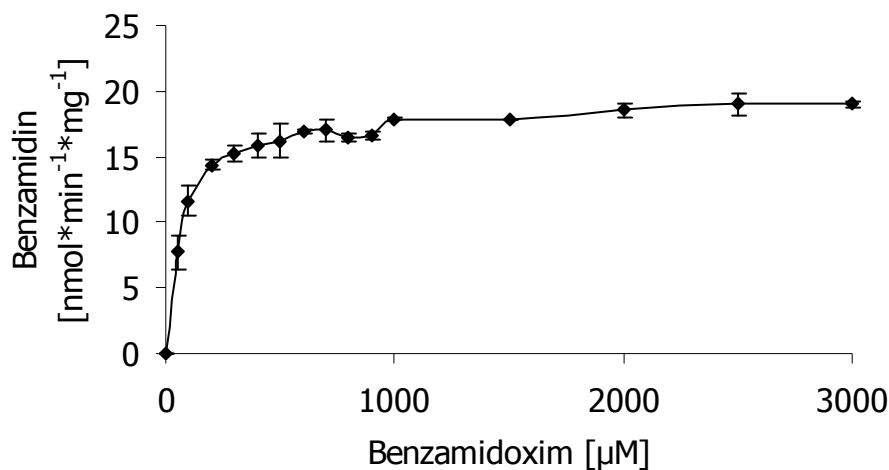


Abb. 3.4: Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: $75 \mu\text{g}$ Protein, 1 mM NADH und $0\text{-}3 \text{ mM}$ Benzamidoxim in $150 \mu\text{l}$ eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers $\text{pH } 6,2$. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.4.5 Cosubstratabhängigkeit und -art

Die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin benötigte die Zugabe eines Cosubstrates. NADH wurde hierbei gegenüber NADPH bevorzugt (Abb. 3.5). Ab einer NADH-Konzentration von 300 μM kam es zu keiner nennenswerten Steigerung der Umsatzrate.

Kontrollinkubationen ohne Cofaktor zeigten keine detektierbaren Mengen an gebildetem Benzamidin.

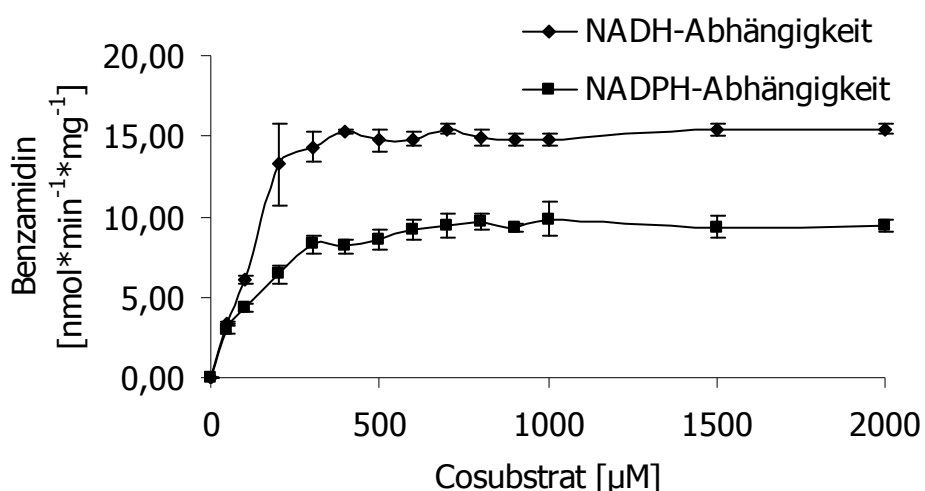


Abb. 3.5: Cosubstratabhängigkeit und -art der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 75 μg Protein, 0-2 mM Cosubstrat (NADH oder NADPH) und 500 μM Benzamidoxim in 150 μl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,2. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.5 Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim mittels Schweinenierenmitochondrien

Die Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin mittels Schweinenierenmitochondrien wurde unter aeroben und anaeroben Bedingungen getestet. Dabei war keine Abhängigkeit festzustellen (Abb. 3.6).

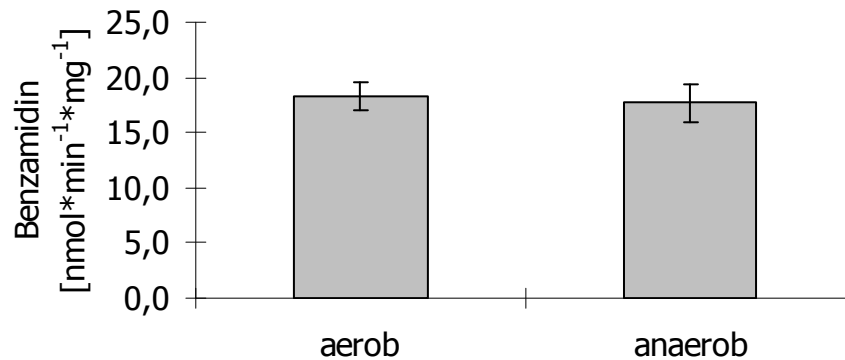


Abb. 3.6: Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.2 und 3.2.3.1.4 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand nach der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.6 Hemmstudien

Inhibitoren hemmen oder verzögern biochemische Enzymreaktionen. Hiermit können Hinweise auf die Identität eines an einer bestimmten Katalyse beteiligten Enzyms gewonnen werden. In dieser Arbeit wurden zur Charakterisierung der *N*-reduktiven Aktivität Hemmstudien durchgeführt.

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, ist Hydroxylamin ein Modellsubstrat der mikrosomalen und mitochondrialen Hydroxylaminreduktase [Bernheim und Hochstein, 1968; Kadlubar und Ziegler, 1974]. Hydroxylamin wurde als kompetitiver Inhibitor für die Schweinenierenmitochondrien eingesetzt.

Kohlenmonoxid und Cyanidionen sind bekannte Inhibitoren hämhaltiger Enzyme. Cyanidionen hemmen Eisen der Oxidationsstufe +3. Kohlenmonoxid hingegen ist ein Inhibitor des Eisens der Oxidationsstufe +2 [Stryer *et al.*, 2003].

NADH Cytochrom b_5 Reduktase wird durch *p*-Hydroxymercuribenzoat gehemmt [Lostanlen *et al.*, 1978]. Ein bekannter potentieller Elektronenakzeptor des Cytochrom b_5 ist Cytochrom *c* [Bernardi und Azzone, 1981]. Eine Hemmung der Reduktion mittels Cytochrom *c* bedeutet eine Elektronenübertragung dieser beiden Enzyme untereinander und beweist indirekt die Beteiligung von Cytochrom b_5 an dieser Reaktion.

Natriumvanadat ist ein Hemmstoff molybdänhaltiger Enzyme [Ramadoss, 1980].

Um allen Hemmstoffen ausreichend Zeit zu bieten mit den Enzymen wechselwirken zu können ohne dabei Einflüssen des Substrates zu unterliegen, wurden die Reaktionen, nicht wie üblich durch das Cosubstrat gestartet, sondern mit dem Substrat selbst.

3.3.1.6.1 Kaliumcyanid

Cyanidionen hemmen das Eisen der Oxidationsstufe +3 hämhaltiger Enzyme.

Der Cyanidioneneinfluss auf die Reduktion von Benzamidoxim durch Schweinenierenmitochondrien wurde nach der in Kapitel 3.2.3.1.5.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei konnte eine Hemmung festgestellt werden (Abb. 3.7). Es blieb eine Restaktivität von etwa 40 % der Ausgangsaktivität erhalten. Die ermittelte IC_{50} ergab 390 μ M.

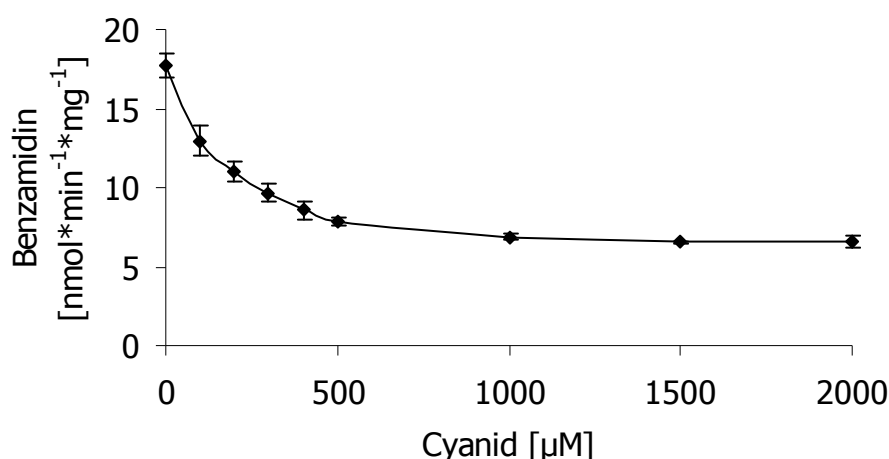


Abb. 3.7: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Kaliumcyanid. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.5.1 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.6.2 Hydroxylamin-HCl

Mit Hydroxylamin-HCl konnte eine Hemmung detektiert werden. Es blieb eine Restaktivität von etwa 5 % der Ausgangsaktivität erhalten (Abb. 3.8). Die ermittelte IC_{50} ergab 31 μM .

Die kompetitive Hemmung wurde bereits von Andersson *et al.* [2005] und Havemeyer [2006] untersucht.

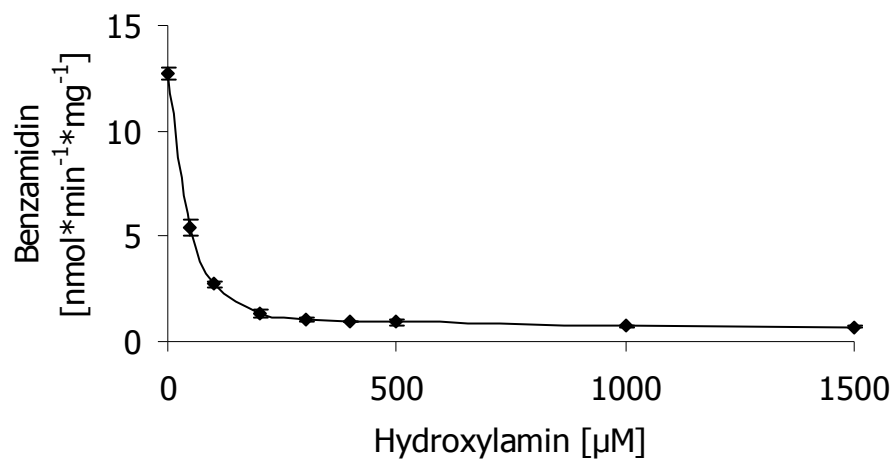


Abb. 3.8: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Hydroxylamin-HCl. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.5.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.6.3 *p*-Hydroxymercuribenzoat

Eine Beteiligung der NADH Cytochrom b_5 Reduktase an der Reduktion von Benzamidoxim konnte durch den Zusatz des selektiven, kompetitiven Inhibitors *p*-Hydroxymercuribenzoat eindeutig gezeigt werden (Abb. 3.9). Ab 300 μM *p*-Hydroxymercuribenzoat war keine Restaktivität mehr detektierbar (Abb. 3.9). Die ermittelte IC_{50} ergab 67 μM .

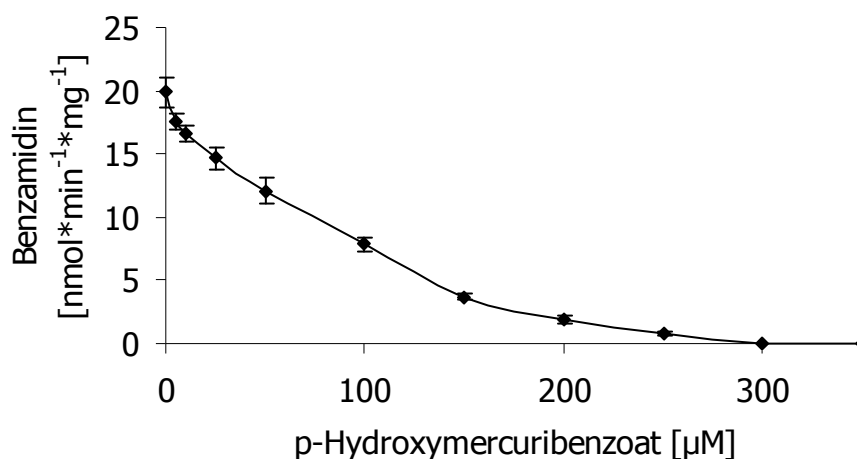


Abb. 3.9: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von *p*-Hydroxymercuribenzoat. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.5.3 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.6.4 Cytochrom c

Cytochrom c ist ein potentieller Elektronenakzeptor des Cytochrom b_5 [Bernardi und Azzone, 1981]. Es führt ab einer Konzentration von 25 μM zu einem vollständigen Verlust der N -reduktiven Aktivität der Schweinenierenmitochondrien (Abb. 3.10). Die ermittelte IC_{50} ergab 1 μM .

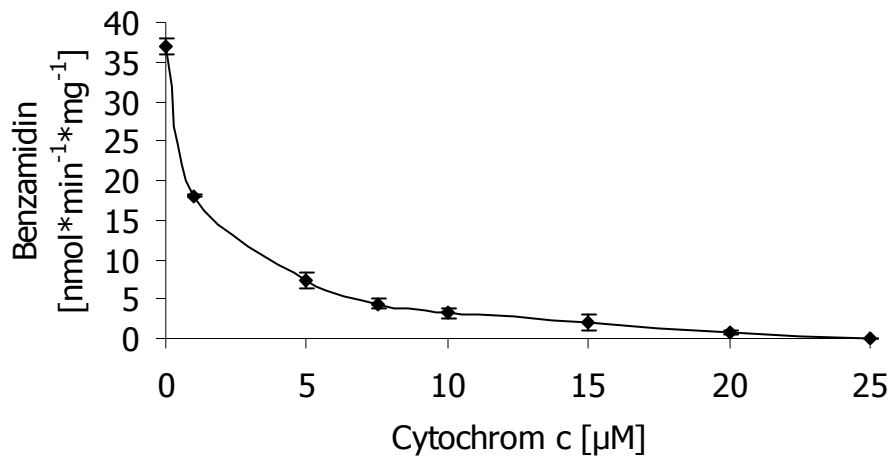


Abb. 3.10: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Cytochrom c. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.5.4 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.6.5 Kohlenmonoxid

Kohlenmonoxid hemmt das Eisen der Oxidationsstufe +2 hämhaltiger Enzyme. Der Kohlenmonoxideinfluss auf die Reduktion von Benzamidoxim durch Schweinenierenmitochondrien wurde nach der in Kapitel 3.2.3.1.5.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei konnte keine Hemmung festgestellt werden (Abb. 3.11).

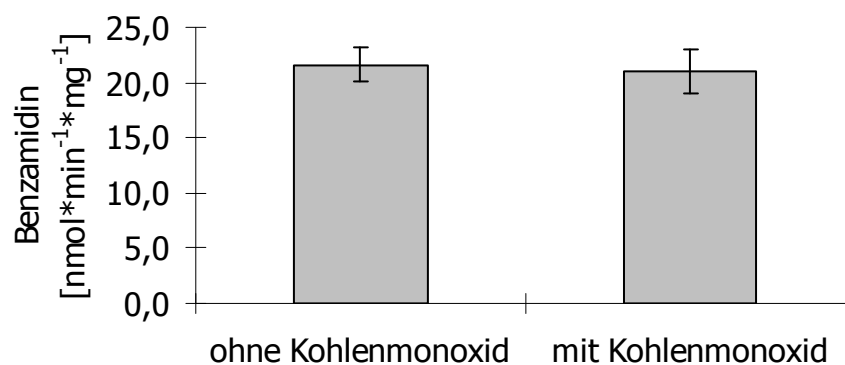


Abb. 3.11: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Kohlenmonoxid. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.5.5 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.6.6 Natriumvanadat

Die Beteiligung eines molybdänhaltigen Enzyms an der Reduktion von Benzamidoxim ist möglich. Dieses konnte durch den Zusatz des hochwirksamen Inhibitors molybdänhaltiger Enzyme Natriumvanadat gezeigt werden (Abb. 3.12). Ab 200 μM Natriumvanadat lag die Restaktivität unter 5 %. Die ermittelte IC_{50} ergab 75 μM .

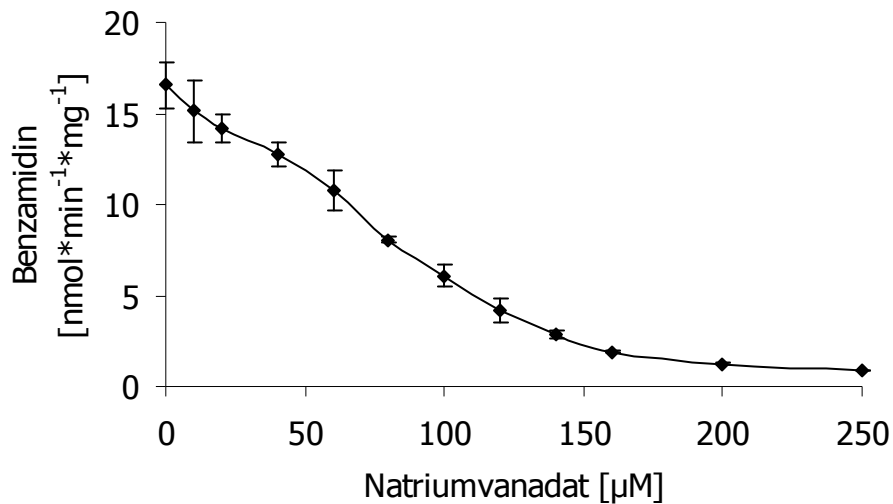


Abb. 3.12: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Natriumvanadat. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 3.2.3.1.5.6 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

3.4 Diskussion

Deters [2002] hat in ihrer Arbeit mit menschlichem und porcinem Gewebe gearbeitet. Ihr Fokus lag dabei auf den Organen Leber und Niere. In ihrer Arbeit konnte sie Ähnlichkeiten zwischen Nieren- und Lebermitochondrien des Menschen und des Schweins feststellen.

Diese große Ähnlichkeit ist schon seit langem bekannt [Douglas, 1972]. Da die Zugänglichkeit von porcinem Gewebe weitaus größer ist als von humanem Gewebe, fanden die *in vitro* Untersuchungen mit Schweinenieren statt.

Havemeyer [2006] konnte zeigen, dass zur Gewinnung von Schweinelebermitochondrien eine möglichst sanfte Methode zum besten Ergebnis führte. Dieses umfasste Methoden, die keine oder zumindest nur eine minimale Beanspruchung für die Mitochondrien bedeutete [Hovius *et al.*, 1990]. Dabei wurde auf die Verwendung eines Potter-Elvehjem-Homogenisators sowie eines Ultraturrax verzichtet. Lediglich ein handelsüblicher Fleischwolf sowie Messer-Homogenisator nach Ziegler (Eigenbau der Universität Austin, Texas, USA) kamen zum Einsatz. Auch die Puffer waren auf größtmögliche Schonung des aufzubereitenden Materials ausgelegt. Als Oxidationsschutz vor Enzyminaktivierung wurde das reduzierende Reagenz Dithiothreitol, als Komplettierungsschutz vor enzyminaktivierenden Schwermetallen EDTA zugesetzt [Bernheim, 1969]. Die Mitochondrienmembran wurde durch den Zusatz von Rinderserumalbumin vor freien Fettsäuren geschützt [Lehninger und Remmert, 1959].

Eine Übertragbarkeit der Methode von Leber auf Niere war im Zerkleinerungsschritt des Gewebes nicht absolut möglich. Das Gewebe musste zweimal durch den Fleischwolf sowie den Messer-Homogenisator gegeben werden, da das Nierengewebe sehr viel härter ist als das Lebergewebe. Dieses führte unweigerlich zu einer erhöhten Zerstörung von Zellen und ihren Bestandteilen [Ziegler und Pettit, 1966].

Zur Kontrolle der Gewinnung von Schweinenierenmitochondrien wurde die Aktivität der NADPH Cytochrom P450 Reduktase als mikrosomaler Marker verfolgt (Tab. 3.1). Gleichzeitig wurde die Monoaminoxidase als mitochondrialer Marker für die Aufreinigung bestimmt (Tab. 3.2). Zur Gewinnung der Schweinenierenmitochondrien wurde stets ein Pool aus 8 Nieren verwendet. Dieses mittelte interindividuelle Enzymaktivitätsunterschiede heraus, wie sie von Mau [2002] und Havemeyer [2006] in der Leber festgestellt wurden. Um dennoch unvorhergesehenen Problemen oder außergewöhnlichen Enzymaktivitäten vorbeugen zu können, wurden neben der Mitochondriengewinnung auch jeweils in geringen Mengen Schweinenieren-

mikrosomen gewonnen. Diese wurden anschließend in ihrer Enzymaktivität mit den Mitochondrien verglichen [Stasiecki *et al.*, 1980].

Aufgrund der Assoziation der mikrosomalen Membran mit der äußeren mitochondrialen Membran [Ardail *et al.*, 1993] lässt sich eine Kontamination nicht vollkommen vermeiden (Tab. 3.1). Zudem wird die Lokalisation der NADPH Cytochrom P450 Reduktase auf der äußeren Membran von Mitochondrien beschrieben [Brunner und Bygrave, 1969; Comte und Gautheron, 1978; Kulkoski *et al.*, 1979]. Eine Restaktivität von 5 % für die NADPH Cytochrom P450 Reduktase ist in der Literatur bekannt [Ohashi und Omura, 1978; Ramanadham und Kaplay, 1978]. Die in dieser Arbeit gefundene Restkontamination liegt unterhalb der in der Literatur beschriebenen Daten. Somit kann die Präparation als vergleichbar rein angesehen werden. Die gleichzeitige Steigerung des mitochondrialen Markers Monoaminoxidase zeigt deutlich die Anreicherung der Mitochondrien in diesem Reinigungsschritt.

Eine Vergleichbarkeit mit den von Deters [2002] gewonnenen Ergebnissen ist nur bedingt gegeben. Sie hatte ihre Schweinenierenmitochondrien mit der konventionellen Differentialzentrifugation [Beattie, 1968; Kline *et al.*, 1986] gewonnen und konnte in den Mitochondrien kein Cytochrom b_5 detektieren, während das Enzym in den nach der Methode von Hovius *et al.* [1990] gewonnenen Mitochondrien bestimmbar war (Daten nicht gezeigt). Hingegen konnte Deters [2006] einen zehnfach höheren Wert an Cytochrom P450 Isoenzymen bestimmen als in dieser Arbeit festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt).

Die *N*-reduktive Aktivität der gewonnenen Schweinenierenmitochondrien wurde anhand des Modellsubstrates Benzamidoxim charakterisiert. Die Schweinenierenmitochondrien sind für diese Reaktion sauerstoffinsensitiv (Abb. 3.6). Das schwach saure pH-Optimum (Abb. 3.3) sowie die Cosubstratabhängigkeit mit einer Bevorzugung von NADH gegenüber NADPH (Abb. 3.5) stimmen mit den bisher gefundenen Ergebnissen (Kapitel 1.4) überein.

Der Verlauf der Bestimmung des pH-Optimums entspricht der Vorstellung der Interaktion von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase [Strittmatter und Dailey, 1982; Durley und Mathews, 1996]. Im niedrigen und hohen pH-Bereich sind die Carboxylgruppen des Cytochrom b_5 jeweils nicht in der Lage, mit der Reduktase zu interagieren (Kapitel 6.1.1). Im leicht sauren Milieu hingegen findet die Übertragung der Protonen optimal statt.

Havemeyer [2006] konnte zeigen, dass in Mitochondrien endogen gebildetes NADH zur Reduktion von Benzamidoxim befähigt ist. Dieses stammte aus dem Citratzyklus,

dessen Enzyme im Matrixraum lokalisiert sind. Zudem hatte Havemeyer [2006] für ihre *in vitro* Untersuchungen exogen zugesetztes NADH verwendet, da hiermit höhere Umsatzraten erzeugt werden konnten. Die erhöhten Umsatzraten durch exogen zugesetzte Stoffe gegenüber denen durch endogene Stoffe hervorgerufenen sind schon lange für die Niere bekannt [Weidemann *et al.*, 1969].

Die bisherigen Untersuchungen zum Benzamidoxim reduzierenden Enzymsystem ergaben eine Michaelis-Menten-Kinetik mit K_m -Werten im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich für Benzamidoxim [Lomb, 1995; Möller, 1997; Mau, 2002; Deters, 2002]. Die in dieser Arbeit gezeigte Kinetik mit einem K_m -Wert von 75 μM entspricht somit den vorgenannten Arbeiten (Kapitel 3.3.1.4.4). Lediglich Deters [2002] hat für Schweinenierenmitochondrien einen K_m -Wert von 12,8 mM bestimmt. Diese Daten differieren um den Faktor 170. Eine mögliche Begründung liegt in der anderen Methode der Mitochondriengewinnung. Wie vorher angeführt, variieren einzelne Enzym-Aktivitätsbestimmungen auch sehr stark.

Die ansonsten sehr ähnlichen K_m -Werte weisen auf ein zumindest ähnliches Enzymsystem zur Reduktion von Benzamidoxim hin. Die Übereinstimmung findet sich dabei nicht nur in den Mitochondrien sondern auch in den bisher untersuchten Mikrosomen. Folgt man der Endosymbiontentheorie, dass Mitochondrien eine Endosymbiose mit prokaryotischen Zellen eingegangen sind, erklären sich die ähnliche Enzymverteilung auf der äußeren Membran von Mitochondrien und Mikrosomen und die damit ähnlichen Eigenschaften der Enzymaktivitäten [Margulis, 1971; Uzzell und Spolsky, 1973].

Eine Beteiligung der Enzyme Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase wird beschrieben und gilt als gesichert [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 2005]. Der selektive Inhibitor *p*-Hydroxymercuribenzoat hemmt die NADH Cytochrom b_5 Reduktase [Lostanlen *et al.*, 1978], was bestätigt werden konnte (Abb. 3.9). Ebenso konnte die Beteiligung von Cytochrom b_5 durch Hemmung mittels Cytochrom c bewiesen werden (Abb. 3.10), wobei der kompetitive Hemmstoff Cytochrom c als Elektronenakzeptor des Cytochrom b_5 fungiert [Bernardi und Azzone, 1981].

Die gefundenen Ähnlichkeiten zur beschriebenen Hydroxylaminreduktase [Bernheim und Hochstein, 1968; Kadlubar *et al.*, 1973] führten zu der Annahme, dass Hydroxylamin ein kompetitiver Hemmstoff von Benzamidoxim sein könnte. Diese wurde in der Arbeit von Havemeyer [2006] bestätigt. Auch in dieser Arbeit konnte die starke Hemmung der Benzamidoximreduktion durch Hydroxylamin belegt werden

(Abb. 3.8). Dieses bedeutet, dass auch in Schweinenierenmitochondrien ein der Hydroxylaminreduktase vergleichbares Enzymsystem vorhanden sein muss.

Neben den Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase, welche in der löslichen Form allein dazu in der Lage sind Benzamidoxim zu reduzieren [Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005], wurde bei den membranständigen Enzymen die Beteiligung einer dritten Komponente beschrieben [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 2005], durch die die Umsetzungsraten deutlich erhöht werden konnten.

Ein Cytochrom P450 Isoenzym soll im mikrosomalen Enzymsystem für diese Umsatzratensteigerung verantwortlich sein [Clement *et al.*, 1997]. Der Cytochrom P450-Gehalt der in dieser Arbeit gewonnenen Schweinenierenmitochondrien war allerdings sehr gering und lag in der Nähe der Detektionsgrenze (Daten nicht gezeigt). In der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien hingegen konnte die Beteiligung des Molybdäncofaktors gezeigt werden [Havemeyer, 2006].

Cytochrom P450 Isoenzyme werden durch den unspezifischen Hemmstoff Kohlenmonoxid inhibiert. Der Hemmstoff hatte bei der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung keinen Einfluss (Abb. 3.11). Kohlenmonoxid hemmt die Ferroform des im Hämgerüst enthaltenen Eisens. Zur Übertragung der Protonen während der Reduktion muss aber im postulierten Mechanismus [Clement, 2002] die Ferriform vorliegen.

Dieses wurde durch den Hemmstoff Kaliumcyanid überprüft (Abb. 3.7). Es konnte eine Empfindlichkeit des Enzymsystems für Cyanidionen festgestellt werden. Dabei wurde die Umsatzrate auf 40 % des Anfangswertes reduziert. Die in der Literatur beschriebenen Daten sind sehr unterschiedlich. Während Bernheim und Hochstein [1968] eine vollständige Hemmung erreichen konnten, beschrieben Kadlubar und Ziegler [1974] sowie Clement *et al.* [1997] eine Insensitivität des untersuchten Enzymsystems gegenüber Cyanidionen. Lopian [2002], Andersson *et al.* [2005] und Havemeyer [2006] konnten die partielle Hemmung feststellen. Die Deutung dieser Feststellung kann unterschiedlich ausgelegt werden. Auf der einen Seite können mehrere Enzymsysteme an der Reduktion von Benzamidoxim beteiligt sein, welche sich nur partiell durch Cyanidionen hemmen lassen. Andererseits ist aber auch eine nur partielle Hemmung des Cytochrom b_5 denkbar. Das Hämgerüst dieses Enzyms ist fast vollständig vom umgebenden Medium abgeschirmt [Strittmatter und Dailey, 1982; Durley und Mathews, 1996]. Durch diese Abschirmung des Hämgerüsts wird unter anderem die geringe Bindungsfähigkeit von Liganden wie Kohlenmonoxid und Cyanid erklärt (Kapitel 6.1.1), was auch zu einer geringeren Hemmung des Enzyms führen könnte.

Havemeyer [2006] hat in der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien den Molybdäncofaktor als verantwortliches Coenzym für die Reduktion von Benzamidoxim gefunden. Aufbau und Funktionsweise sind in Kapitel 6.1.4 beschrieben. Molybdänhaltige Enzyme sind durch Vanadationen hemmbar [Ramadoss, 1980].

Eine Hemmung des in den Schweinenierenmitochondrien befindlichen Enzymsystems fand schon bei niedriger Konzentration von Vanadationen statt (Abb. 3.12). Die Beteiligung des Molybdäncofaktors am Benzamidoxim reduzierenden Enzymsystem ist somit in den Schweinenierenmitochondrien nicht auszuschließen. Da aber neben den molybdänhaltigen Enzymen noch weitere Enzyme wie Tyrosinphosphatase [Swarup *et al.*, 1982], Phospholipase C [Tan und Roberts, 1996], Glucose-6-Phosphatase [Singh *et al.*, 1981] und Succinyl-CoA Ligase [Krivanek und Novakova, 1991] durch Vanadationen gehemmt werden, ist eine Bestätigung der Verantwortlichkeit zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich.

3.5 Zusammenfassung

Es wurden Schweinenierenmitochondrien nach der Methode von Hovius *et al.* [1990] mittels kontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation über Percoll[®] gewonnen. Die Übertragbarkeit dieser Methode von Leber auf Niere war dabei größtenteils gegeben. Das relativ harte Nierengewebe musste zu Beginn maschinell stärker bearbeitet werden, wodurch die Möglichkeit einer Zellbeschädigung erhöht wurde. Während der Zentrifugationsschritte waren die abzutrennenden Nierenfraktionen im Vergleich zu den Leberfraktionen deutlich schlechter sichtbar. Die untersuchten Marker zur Anreicherung der Mitochondrien und zum Kontaminationsnachweis durch mikrosomale Fragmente zeigten aber trotzdem eine gute Isolierung der Mitochondrien, weshalb die Methode nicht weiter verändert werden musste.

Die Schweinenierenmitochondrien zeigten die typischen in der Literatur beschriebenen Charakteristika *N*-reduzierender Reaktionen. Diese beinhalten das schwach saure Milieu sowie Kohlenmonoxid- und Sauerstoffinsensitivität. Die Beteiligung der Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase konnte bestätigt werden. Die Hydroxylaminreduktase beinhaltet auch Cytochrom b_5 und seine Reduktase als verantwortliche Enzyme. Da Hydroxylamin als kompetitiver Hemmstoff der Benzamidoximreduktion fungiert, wurde eine Gemeinsamkeit zur Hydroxylaminreduktase gezeigt. Die Hemmbarkeit der Reaktion durch Vanadationen lässt die Möglichkeit einer Beteiligung vom Molybdäncofaktor zu, da Vanadat als Inhibitor von Molybdoenzymen beschrieben ist.

Im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen wurden, eventuell bedingt durch die unterschiedliche Art der Gewinnung, andere Enzymverhältnisse in den Schweinenierenmitochondrien gefunden. Zudem ergab sich ein wesentlich niedrigerer K_m -Wert, welcher in einem vergleichbaren Rahmen zu den bisherigen Ergebnissen aus Leber, Darm und Gehirn lag.

Eine Cytochrom P450 Isoenzym Beteiligung konnte zu diesem Zeitpunkt weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Der niedrige Cytochrom P450-Gehalt bei gleichzeitig hoher *N*-reduktiver Aktivität sowie Insensitivität gegenüber Kohlenmonoxid und nur partielle Sensitivität gegenüber Cyanidionen lässt eine Beteiligung am mitochondrialen *N*-reduktiven System der Schweineniere unsicher erscheinen.

4 ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER ÄUßEREN MEMBRAN VESIKEL

4.1 Einleitung

4.1.1 Aufbau und Funktion der Mitochondrien

Das Mitochondrium ist ein von einer Doppelmembran umschlossenes Organell, das als „Kraftwerk“ der eukaryotischen Zelle fungiert (Abb. 4.1). Die Hauptfunktion des Mitochondriums ist, im Rahmen der Zellatmung unter Sauerstoff-Verbrauch ATP zu generieren. Mitochondrien kommen verteilt im Cytosol der meisten Eukaryoten vor. Ihre Größe beträgt etwa 0,5 bis 10 µm in der Länge [Stryer *et al.*, 2003].

Besonders viele Mitochondrien finden sich in Zellen, die viel Energie verbrauchen (z. B. Muskelzellen, Nervenzellen, Eizellen). Mitochondrien werden über das Plasma der Eizelle nur von der Mutter vererbt, was Anlass zur Erforschung mütterlicher Verwandtschaftslinien war. Es hat sich mittlerweile herausgestellt, dass auch durch das Spermium einige männliche Mitochondrien in das Plasma der befruchteten Eizelle importiert werden. Diese „männlichen“ Mitochondrien werden jedoch wahrscheinlich recht schnell eliminiert, denn sie sind, so wird inzwischen angenommen, schon von vornherein als potentiell gefährlicher „Zellabfall“ markiert worden.

Der Transport von Proteinen in die Mitochondrien erfolgt über die äußere Membran durch den TOM-Komplex (translocase of outer mitochondrial membrane) und über die innere Membran durch den TIM-Komplex (translocase of inner mitochondrial membrane). Auf der äußeren Membran sind Rezeptorproteine für den Proteintransport [Lill und Neupert, 1996], Porenproteine [Benz, 1994] sowie morphologisch wirksame Proteine [Sogo und Yaffe, 1994] zu finden. Zudem spielt die äußere Membran der Mitochondrien beim programmierten Zelltod eine Rolle [Reed, 1997]. Die regulatorischen Mechanismen sind im Intermembranraum lokalisiert [Parone *et al.*, 2002]. Die innere Membran ist im Gegensatz zur äußeren Membran nicht für kleine Moleküle und Ionen permeabel [Stryer *et al.*, 2005]. Durch eine defekte Mitochondrien-Funktion (Mitochondriopathien) können Krankheiten hervorgerufen werden. Mitochondrien vermehren sich durch Teilung, wobei die Anzahl der Mitochondrien einer Zelle deren Energiebedarf angepasst werden kann. Eine eukaryotische Zelle, die alle ihre Mitochondrien verliert, ist nicht in der Lage diese zu regenerieren.

Mitochondrien sind häufig an das Endoplasmatische Retikulum assoziiert oder sogar vollkommen davon umgeben. Hierbei entstehen auch Membranfusionen [Ardail *et al.*, 1993].

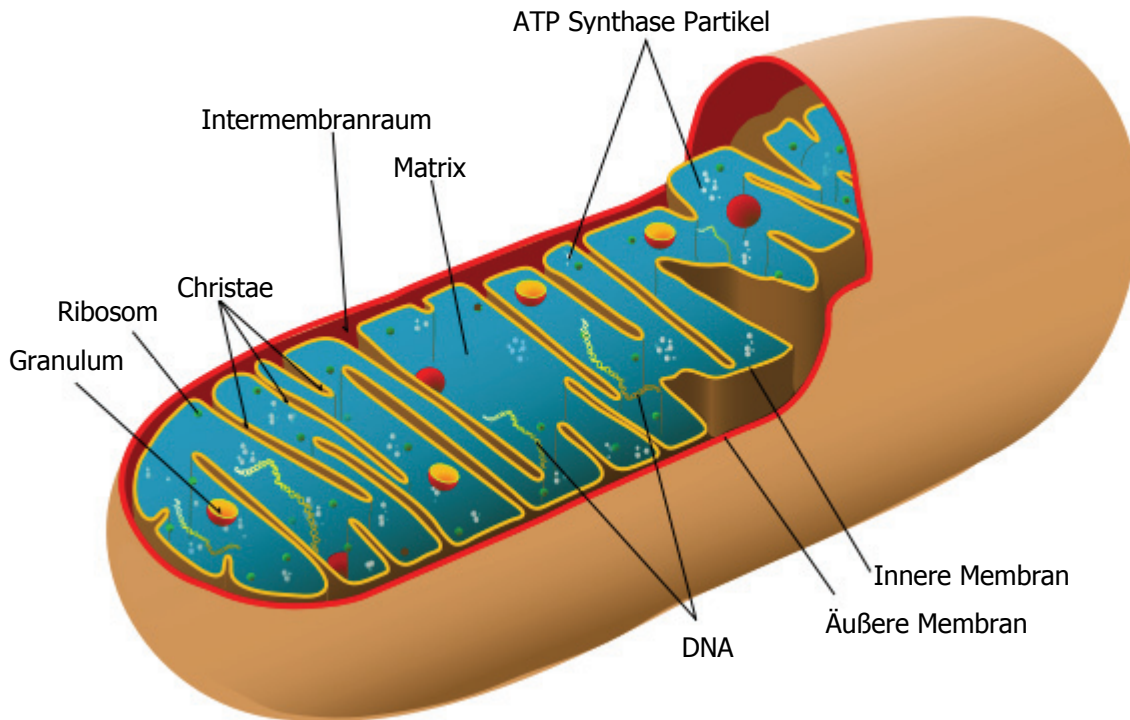


Abb. 4.1: Aufbau eines Mitochondriums
(Quelle: <http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondria>)

Die äußere Membran umschließt das gesamte Mitochondrium und enthält Kanäle aus Proteinkomplexen, welche den Austausch von Molekülen und Ionen zwischen dem Mitochondrium und dem Cytosol ermöglichen. Große Moleküle können die Membran nicht passieren. Die innere Membran besteht entweder beim Christae-Typ aus Christae genannten Einstülpungen, wodurch die Oberfläche, an der die chemischen Reaktionen stattfinden können, erheblich vergrößert wird [Karlson *et al.*, 1994]. Sie umschließt die Matrix, die interne Flüssigkeit des Mitochondriums. Die Membran enthält große Proteinkomplexe, welche für die eigentliche Energiegewinnung zuständig sind sowie spezielle Ionenkanäle und Transportproteine [Karlson *et al.*, 1994; Da Cruz *et al.*, 2003]. Außerdem ist der größte Teil des mitochondrialen Proteoms auf der inneren Membran lokalisiert [Schnaitman *et al.*, 1967; della-Cioppa *et al.*, 1986]. Cytochrom P450 Isoenzyme sind fast ausschließlich auf der inneren Membran lokalisiert [Sottocasa und Sandri, 1970; Comte und Gautheron, 1978; della-Cioppa *et al.*, 1986]. Der andere Membran-Typ heißt Tubuli-Typ und findet sich z. B.

in steroidproduzierenden Zellen. Der Intermembranraum zwischen den beiden Membranen enthält Enzyme, die Nukleotide unter ATP-Verbrauch phosphorylieren können [Karlson *et al.*, 1994]. Zwischen den beiden mitochondrialen Membranen existieren zudem Kontaktstellen [Speer *et al.*, 2005]. Die Matrix und die innere Membran bilden den Mitoplasten.

Die wichtigste Funktion der Mitochondrien ist die Beteiligung an der Atmungskette. Dabei wird mit Hilfe von Elektronen-Transportvorgängen und durch Anreicherung von Wasserstoffionen ein elektrochemischer Gradient zwischen dem Intermembranraum und der mitochondrialen Matrix aufgebaut, der dazu dient, mittels einer speziellen ATPase, der ATP-Synthase, ATP herzustellen. Die zum Aufbau des Gradienten benötigten Elektronen und Wasserstoffatome werden durch oxidativen Abbau aus den vom Organismus aufgenommenen Nährstoffen (z. B. Glucose) gewonnen. Zunächst läuft im Cytoplasma die Glykolyse ab. Hierbei entsteht Pyruvat, welches in die mitochondriale Matrix eingeschleust wird. Durch die Pyruvat-Dehydrogenase wird dann Pyruvat zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Eine andere Quelle des Acetyl-CoA ist der Fettsäureabbau, so dass sich hier katabole Wege vereinigen. Aus Acetyl-CoA wird im Citrat-Zyklus in der Mitochondrien-Matrix der überwiegende Teil der Reduktionsäquivalente gewonnen, die dann in der Mitochondrienmembran innerhalb der Atmungskette in Zellenergie umgewandelt werden.

Nach der Endosymbiontentheorie geht man davon aus, dass sowohl die Mitochondrien als auch die Chloroplasten aus einer Symbiose von aeroben Bakterien mit Eukaryoten hervorgegangen sind. Hinweise darauf sind der Besitz eigener genetischer Information, eine eigene Proteinsynthese und das Vorhandensein einer inneren Membran, die sich deutlich vom Bau der äußeren Membran unterscheidet und die der Erzeugung von ATP aus ADP dient. Die Mitochondrien sind jedoch so spezialisiert, dass sie allein nicht lebensfähig sind. Zuletzt wurde auch herausgefunden, dass die Mitochondrien relativ eng mit anderen, seltener auftretenden Organellen, den Hydrogenosomen verwandt sind. Ein Verbindungsglied stellt das Wasserstoff-synthetisierende Mitochondrium dar [Boxma *et al.*, 2005].

Die Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom, das etwa 1 % der genetischen Information des Menschen ausmacht. Deshalb werden Mitochondrien als semiautonom bezeichnet. Die mitochondriale DNA ist ein ringförmiges DNA-Molekül, welches in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert ist.

Die mitochondriale DNA erlaubt den Mitochondrien nicht, sich unabhängig von der Zelle, in der sie sich befinden, zu teilen und zu vermehren. Allerdings ist die

Teilungsfrequenz der Mitochondrien nur indirekt von derjenigen der Zelle abhängig. Auf der mitochondrialen DNA befinden sich einige Gene für die Enzyme des Citrat-Zyklus sowie Gene, die für die Struktur und Reproduktion der Mitochondrien verantwortlich sind [Karlson *et al.*, 1994]. Jedoch sind die Gene von mehr als 90 % der Proteine, aus denen ein Mitochondrium besteht, im Zellkern lokalisiert und werden im Cytoplasma der Zelle synthetisiert. Die Proteine werden im Anschluss an die Transkription und Translation mit Hilfe einer komplexen Translokationsmaschine über die beiden mitochondrialen Membranen ins Innere der Mitochondrien importiert [Westermann *et al.*, 2001; Rehling *et al.*, 2003].

Ende der Siebziger Jahre wurde erstmalig die Beteiligung der Mitochondrien am Fremdstoffmetabolismus beschrieben [Blume und Oelschläger, 1978]. *N*-reduktive Reaktionen wurden allerdings bereits vorher gefunden [Bernheim, 1969]. In jüngster Zeit werden vor allem Untersuchungen zur Reduktion von Benzamidoximen in Lebermitochondrien untersucht [Kurian *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2005; Clement *et al.*, 2005b].

4.1.2 Methoden zur Gewinnung der Äußeren Membran Vesikel

Erste Hinweise zur Lokalisation des *N*-reduktiven Enzymsystems innerhalb der Mitochondrien sind von Deters [2002] beschrieben worden. Deters [2002] konnte eine *N*-reduktive Aktivität auf der äußeren Membran der Mitochondrien feststellen. Havemeyer [2006] konnte diese These in ihrer Arbeit bestätigen. Beide haben ihre Untersuchungen mit Lebermitochondrien durchgeführt. Havemeyer [2006] hat dabei verschiedene in der Literatur beschriebene Methoden zur Gewinnung der „Äußeren Membran Vesikel“ miteinander verglichen.

Die wohl bekannteste Methode ist das Digitonin-Stripping [Schnaitman *et al.*, 1967]. Hierbei wird die Komplexbildung zwischen Digitonin und Cholesterol ausgenutzt. Da Cholesterol nur in der äußeren, nicht aber in der inneren Membran der Mitochondrien vorkommt [Karlson *et al.*, 1994], soll hiermit eine selektive Ablösung der äußeren Membran möglich sein. Allerdings greift Digitonin in Abhängigkeit der Inkubationsdauer auch die innere Membran an [Hovius *et al.*, 1990]. Zudem hemmt Digitonin die zu untersuchende *N*-reduktive Aktivität [Havemeyer, 2006].

Kurze Zeit später wurde die hypoosmotische Lyse beschrieben [Parsons und Williams, 1967]. Mittels einer hypotonen Lösung werden die Mitochondrien zum Schwellen gebracht. Dadurch bricht die äußere Membran und trennt sich ab.

Die hypoosmotische Lyse wurde in den folgenden Jahren zur Grundlage weiterer Gewinnungsverfahren angewandt und modifiziert [Decker und Greenawalt, 1977]. Im French-pressure-cell Verfahren werden die Mitochondrien ebenfalls vorgequollen. Nach Überführung in eine hydraulische Presse und plötzlich durchgeführtem Druckausgleich platzt die äußere Membran ab. Diese Methode wird vornehmlich zur Gewinnung von Mitoplasten angewendet.

Die Swell-Shrink Methode benutzt als Grundlage ebenfalls die hypoosmotische Lyse. Zusätzlich werden ATP und Magnesiumsalze zugefügt, um ein selektives Schrumpfen der inneren Membran zu erzeugen. Hiermit wird das Aufbrechen der inneren Membran verhindert [Sottocasa *et al.*, 1967; Murthy und Pande, 1987].

Die neueste Methode setzt zunächst auch die hypoosmotische Lyse als ersten Schritt voraus. Danach wird die äußere Membran mechanisch mittels eines Potter-Elvehjem-Homogenisators abgeschilfert [de Kroon *et al.*, 1999]. Aus diesem Grunde wird die Methode auch als Swell-Disruption bezeichnet. Ursprünglich fand sie Anwendung bei der Gewinnung äußerer mitochondrialer Membran aus Schimmelpilzen [Mayer *et al.*, 1993].

Nach Abspaltung der äußeren Membran muss diese im folgenden Schritt von den Mitoplasten abgetrennt werden. Die äußere Membran lagert sich dabei typischerweise zu kleinen Vesikeln zusammen, so dass man dann von „Äußeren Membran Vesikeln“ spricht [Schnaitman *et al.*, 1967; della-Cioppa *et al.*, 1986]. Genutzt wird hierzu die Zentrifugation, wobei zwei unterschiedliche Zentrifugationsschritte, Dichtegradientenzentrifugation oder Differentialzentrifugation, möglich sind. Letztere fällt die Mitoplasten mit 9.500 *g* und die Äußeren Membran Vesikel mit 144.000 *g* [Schnaitman und Greenawalt, 1968].

Ähnlich der Charakterisierung von Mitochondrien (s. Kapitel 3.1) sind die Äußeren Membran Vesikel auf ihre Reinheit hin zu untersuchen. Dabei können verschiedene Methoden, wie enzymatische [Schnaitman und Greenawalt, 1968], immunochemische [de Kroon *et al.*, 1999] und analytische Testverfahren oder auch elektronenmikroskopische Aufnahmen [Parsons und Williams, 1967] eingesetzt werden.

Enzymatische Untersuchungen setzen die Anreicherung von Leitenzymen der jeweiligen Kompartimente voraus. Hierbei sollte das Leitenzym selektiv nur in der zu untersuchenden Subfraktion vorkommen. Bezogen auf die Mitochondrien gelten Monoaminoxidase und Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase für die äußere

Membran als Leitenzyme. Die innere Membran wird durch Cytochrom c Oxidase und Succinat Cytochrom c Reduktase charakterisiert. Schließlich gelten für die Matrix Malat Dehydrogenase und Glutamat Dehydrogenase und für den Intermembranraum Adenylyl Kinase als Markerenzyme [Schnaitman und Greenawalt, 1968; Decker und Greenawalt, 1977].

4.1.3 Bisherige Untersuchungen

Havemeyer [2006] hat in ihrer Arbeit die oben genannten Methoden zur Gewinnung der Äußeren Membran Vesikel miteinander verglichen. Das beste Ergebnis zur Gewinnung der Subfraktion besteht dabei aus der Swell-Disruption Methode kombiniert mit anschließender Zweischritt-Dichtezentrifugation. Diese besteht aus einem Sedimentations- und einem Flotationsschritt. Die Kontamination der Äußeren Membran Vesikel mit innerer Membran war bei dieser Methode am geringsten.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die *N*-reduktive Aktivität in den Äußeren Membran Vesikeln wieder zu finden ist [Havemeyer, 2006]. Alle Arbeiten wurden mit Schweinelebermitochondrien und ihren Äußeren Membran Vesikeln durchgeführt.

4.1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nach der Swell-Disruption Methode mit anschließender Zweischritt-Dichtezentrifugation [de Kroon *et al.*, 1999] gewonnen werden. Eine Übertragbarkeit der Methode auf Schweinenierenmitochondrien sollte überprüft und die Methode gegebenenfalls modifiziert werden. Die erhaltenen Vesikel waren anschließend, basierend auf enzymatische Testverfahren, mit Markeraktivitäten zu bewerten. Die Lokalisation der *N*-reduktiven Aktivität in den Äußeren Membran Vesikeln sollte überprüft werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Äußeren Membran Vesikel, welche Proteinbestimmung, Reinheit, *N*-reduktive Aktivität und Hemmstudien mit einschloss.

4.2 Methoden

4.2.1 Gewinnung der Enzympräparation

4.2.1.1 Materialien und Geräte

Sofern nicht angegeben, befindet sich eine Übersicht über die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 der vorliegenden Arbeit.

4.2.1.2 Gewinnung von Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien

Die Gewinnung der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien wurde modifiziert nach de Kroon *et al.* [1997] durchgeführt. Es handelt sich dabei um die Swell-Disruption Methode mit wiederholter Dichtegradientenzentrifugation. Die folgenden Reinigungsschritte fanden bei 4 °C oder unter Eiskühlung statt.

Die aufgereinigten Mitochondrien, welche mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden (Kapitel 3.2.1.2), sind mit 500 ml Standardpuffer (10 mM Kaliumphosphat, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 % (w/v) BSA, pH 7,4) pro 1 g Mitochondrien versetzt und 20 Minuten bei 10.000 *g* (Rotor JA 10) zentrifugiert worden.

Das erhaltene Pellet wurde in einem hypotonen Puffer (2,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 2,5 mM Dikaliumhydrogenphosphat, 5 mM EDTA, pH 7,2) zu 5 mg/ml resuspendiert und 20 Minuten unter Kühlung gerührt. Die erhaltene Suspension wurde mit einem Potter-Elvehjam-Homogenisator (Potter 940 S Glaszylinder, 20 Auf- und Abbewegungen des Zylinders, 500 Umdrehungen/min des Teflonhomogenisators) homogenisiert.

Das erhaltene Homogenat wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten geschichtet. Dabei bestand der Gradient aus 15 ml 1,1 M Saccharoselösung (1,1 M Saccharose, 10 mM MOPS, 2,5 mM EDTA, pH 7,2), 25 ml 0,25 M Saccharoselösung (0,25 M Saccharose, 10 mM MOPS, 2,5 mM EDTA, pH 7,2) und 30 ml Homogenat. Die Zentrifugation wurde 70 Minuten bei 142.000 *g* (Rotor 45 Ti) durchgeführt. In diesem Sedimentationsschritt reicherten sich die Äußeren Membran Vesikel in der Grenze 0,25 M/1,1 M Saccharose an. Diese Schicht wurde abgetrennt und mit 1,1 M Saccharoselösung zu 240 ml verdünnt.

Im nachfolgenden Flotationsschritt wurde eine weitere diskontinuierliche Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Der Gradient bestand aus 40 ml Lösung

des Sedimentationsschrittes, 10 ml 1,065 M Saccharoselösung (1,065 M Saccharose, 10 mM MOPS, 2,5 mM EDTA, pH 7,2) und 20 ml Basispuffer (10 mM MOPS, 2,5 mM EDTA, pH 7,2). Die Zentrifugation wurde 16 Stunden bei 142.000 *g* (Rotor 45 Ti) durchgeführt. Die Äußeren Membran Vesikel reicherten sich in der Grenzschicht Basis-/Saccharoselösung an. Diese Schicht wurde abgetrennt und mit Basispuffer zu 420 ml verdünnt.

Die gewonnenen Äußeren Membran Vesikel wurden abschließend 70 Minuten bei 235.000 *g* (Rotor 45 Ti) gefällt. Das resultierende Pellet wurde mit 4-6 ml Lagerungspuffer (220 mM Mannitol, 70 mM Saccharose, 2 mM HEPES, pH 7,4) zu 1 mg/ml resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

4.2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparation

4.2.2.1 Proteinbestimmung

Die Methode zur Proteinbestimmung ist in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben.

4.2.2.2 Succinat Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Succinat Cytochrom c Reduktase-Aktivität wurde nach der Methode von Sottocasa *et al.* [1967] durchgeführt. Hierbei wurde die Reduktion von Cytochrom c spektralphotometrisch vermessen. Es wurde die Absorptionsänderung bei 550 nm verfolgt, da das reduzierte Cytochrom c hier sein Absorptionsmaximum hat. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon=21 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ für die reduzierte Form des Cytochrom c herangezogen [Kamin *et al.*, 1965].

Die Zusammensetzung des Enzymassays war wie folgt: etwa 20 µg Protein, 3000 µM Succinat, 100 µM Cytochrom c, 300 µM Kaliumcyanid in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5. Alle Reagenzien wurden stets frisch hergestellt. Präparationsabhängig wurden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt. Succinat wurde als Reaktionsstarter zum Schluss zugesetzt. Die Messzeit betrug 60 Sekunden bei 30 °C. Die Enzymaktivität ist im Folgenden in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute 1 µmol Cytochrom c umsetzt.

4.2.2.3 Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivität wurde nach der Methode von Sottocasa *et al.* [1967] durchgeführt. Hierbei wurde die Reduktion von Cytochrom c spektralphotometrisch vermessen. Es wurde die Absorptionsänderung bei 550 nm verfolgt, da das reduzierte Cytochrom c hier sein Absorptionsmaximum hat. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon=21 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ für die reduzierte Form des Cytochrom c herangezogen [Kamin *et al.*, 1965].

Die Zusammensetzung des Enzymassays war wie folgt: 2-5µg Protein, 100 µM NADH, 100 µM Cytochrom c, 300 µM Kaliumcyanid, 1,5 µM Rotenon in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5. Alle Reagenzien wurden stets frisch hergestellt. Präparationsabhängig wurden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt. Das Rotenon musste aufgrund seiner geringen Löslichkeit zunächst in einer 3,75 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid gelöst werden. In einer 1:50 Verdünnung wurde durch vorsichtige Zugabe des Phosphatpuffers eine 75 µM Lösung geschaffen, die im Enzymassay eingesetzt werden konnte. NADH wurde als Reaktionsstarter zum Schluss zugesetzt. Die Messzeit betrug 60 Sekunden bei 30 °C. Die Enzymaktivität ist im Folgenden in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute 1 µmol Cytochrom c umsetzt.

4.2.2.4 Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung

Die Methode der Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung ist in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben.

4.2.2.5 Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung

Die Methode der Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung ist in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben.

4.2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktase

4.2.3.1 Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin

Die *N*-reduktive Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet.

4.2.3.1.1 Synthese von Benzamidoxim

Benzamidoxim wurde nach der Methode von Krüger [1885] aus Benzonitril und Hydroxylamin synthetisiert und nach den üblichen Methoden auf Identität und Reinheit geprüft.

4.2.3.1.2 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die Biotransformationsstudien der äußere Membran setzte sich aus 4 µg mitochondrialem Protein, 300 µM NADH und 400 µM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 5,9 zusammen.

Zunächst wurde die äußere Membran bei 37 °C zwei Minuten vorinkubiert, dann das Benzamidoxim zugegeben und nach weiteren drei Minuten Vorinkubation die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Nach zehn Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 *g* trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

4.2.3.1.3 HPLC-Analytik

In Anlehnung an die von Friedrich [2003] entwickelte Methode wurde gebildetes Benzamidin mittels HPLC-Analytik bestimmt.

Der Eluent wurde durch einen Sartorius[®] Membranfilter (0,45 µm) per Vakuumfiltration von Partikeln befreit. Vor der Verwendung wurde der Eluent 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

HPLC-Pumpe und Controller: Waters 600 E Multisolvent Delivery System

Detektor: Waters 486 TAD UV

Autosampler: Waters 700 Satellite WISP

Integrator: EZChrom Client Chromatography Software Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA)

Stationäre Phase: LiChroCART 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher[®] 60 RP-select B (5 µm), Vorsäule RP-select B, 4*4 mm (Merck, Darmstadt)

Mobile Phase: 10 mM 1-Octylsulfonat in *Aq. bidest.*/Acetonitril 82,5:17,5 (v/v) (pH-Wert nicht eingestellt)

Laufzeit: 28 Minuten

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: UV, 229 nm

Die Retentionszeiten lagen bei $8,0 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidoxim) und $24,2 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidin).

Die Kalibrierung zur Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Benzamidin erfolgte mit sieben verschiedenen Konzentrationen im Bereich 0-250 µM gelöst in Fließmittel und wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen. Für jede Konzentration wurden 2 Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt vermessen wurden. In diesem Bereich verlief die Kalibrierung linear mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9996$. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden den Inkubationsansätzen die für die Kalibrierung verwendeten Benzamidin-Konzentrationen zugesetzt. In Abwesenheit des Cosubstrates NADH sowie nach

Denaturierung der Proteinpräparation wurden die Proben analog zur Methode 4.2.3.1.2 vermessen. Benzamidin konnte im angegebenen Konzentrationsbereich (bis 250 μM) quantifiziert werden. Die Wiederfindungsrate betrug $98 \pm 8 \%$.

4.2.3.1.4 Anaerobe Inkubationsbedingungen

Der Inkubationsansatz entsprach der in Kapitel 4.2.3.1.2 beschriebenen Standardzusammensetzung.

Für die Durchführung wurden Modifikationen vorgenommen. Protein und Substrat wurden in einem mit Argon begasten Exsikkator mit 37 °C warmem Kaliumphosphatpuffer vorinkubiert. Während dieser Vorinkubationszeit wurde der Exsikkator dreimal evakuiert und erneut mit Argon befüllt. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates wurden die Reaktionsgefäße in der Argonatmosphäre verschlossen und im 37 °C Schüttelwasserbad inkubiert. Nach zehn Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μl Methanol gestoppt. Die Proben wurde fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 g trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

4.2.3.1.5 Hemmstudien

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurde die für die mitochondriale Fraktion gültige Standardzusammensetzung (s. Kapitel 4.2.3.1.2) unter Standardbedingungen verwendet.

IC_{50} Inhibitorkonzentrationen wurden mit dem Programm Sigma Plot 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) berechnet.

Je nach Hemmstoff wurden die nachfolgend aufgeführten Modifikationen durchgeführt. Um allen Hemmstoffen ausreichend Zeit zu bieten mit den Enzymen wechselwirken zu können, ohne dabei durch das Substrat gestört zu werden, wurden die Reaktionen, nicht wie üblich durch das Cosubstrat gestartet, sondern mit dem Substrat selbst.

4.2.3.1.5.1 Kaliumcyanid

Es wurde eine 30-minütige Vorinkubation des Proteins mit Kaliumcyanid und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

4.2.3.1.5.2 Hydroxylamin-HCl

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit Hydroxylamin-HCl und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

4.2.3.1.5.3 *p*-Hydroxymercuribenzoat

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit *p*-Hydroxymercuribenzoat und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

4.2.3.1.5.4 Cytochrom c

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit Cytochrom c und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei

12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 3.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

4.2.3.1.5.5 Kohlenmonoxid

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 15 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die Biotransformationsstudien setzte sich aus 53 µg Äußeren Membran Vesikeln, 300 µM NADH und 400 µM Benzamidoxim in 2000 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 5,9 zusammen.

Zunächst wurden die Äußeren Membran Vesikel bei 37 °C zwei Minuten mit Benzamidoxim vorinkubiert, dann 30 Sekunden mit Kohlenmonoxid begast, und nach weiteren fünf Minuten Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Nach zehn Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2000 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 *g* trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

4.2.3.1.5.6 Natriumvanadat

Es wurde eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit Natriumvanadat und NADH im 37 °C Schüttelwasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates Benzamidoxim gestartet. Die Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt, mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren, fünf Minuten bei 12.000 *g* zentrifugiert und anschließend nach der unter Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen Methode quantifiziert.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Charakterisierung der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien

4.3.1.1 Proteinausbeute der Äußeren Membran Vesikel-Gewinnung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels der BCA-Methode sind jeweils mindestens zwei Einzelmessungen durchgeführt worden. Die daraus gebildeten Mittelwerte wurden für die weiteren Bestimmungen eingesetzt. Die prozentualen Standardabweichungen wurden berechnet und lagen stets unter 5 %. Eventuell störende Substanzen (EDTA, DTT) aus den zur Gewinnung verwendeten Puffern zeigten bei den eingesetzten Probeverdünnungen 1:2 bis 1:5 keinen Einfluss auf die Messergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Der mittlere Proteingehalt einer Mitochondriencharge lag bei 1-1,5 mg/ml. Die dabei gewonnene Gesamtproteinmenge lag chargenabhängig zwischen 7 und 10 mg. Damit wurde eine Ausbeute von etwa 0,5-0,6 % erzielt.

4.3.1.2 Enzymatische Charakterisierung der Äußeren Membran Vesikel

4.3.1.2.1 Succinat Cytochrom c Reduktase

Die Kontrolle der erfolgreichen Abscheidung der Matrix, der inneren Membran und des Intermembranraums von der äußeren Membran wurde anhand des inneren Membranmarkers Succinat Cytochrom c Reduktase bestimmt. Aus der spezifischen Aktivität des Enzyms in der äußeren Membran im Verhältnis zur spezifischen Aktivität in den Mitochondrien wurde die relative spezifische Aktivität errechnet. Tabelle 4.1 zeigt die spezifische und relative Aktivität nach der Methode von Sottocasa *et al.* [1967].

Tab. 4.1: Succinat Cytochrom c Reduktase-Aktivität der mittels Swell-Disruption Methode gewonnenen Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien und der korrespondierenden Schweinenierenmitochondrien (Kapitel 4.2.1.2)

Fraktion	spezifische Enzymaktivität [U*mg ⁻¹]	relative spezifische Aktivität
Mitochondrien	0,118 ± 0,015	1
Äußere Membran Vesikel	0,003 ± 0,000	0,025

Die Enzymaktivität wurde als Mittelwert aus mindestens drei separaten Bestimmungen ermittelt. Die Succinat Cytochrom c Reduktase-Aktivität wurde nach der Methode von Sottocasa et al. [1967] bestimmt. Hierbei wurde die Reduktion von Cytochrom c spektralphotometrisch vermessen (Kap. 4.2.2.2).

4.3.1.2.2 Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivität

Die Kontrolle der erfolgreichen Anreicherung der Äußeren Membran Vesikel wurde anhand des äußeren Membranmarkers Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase bestimmt. Aus der spezifischen Aktivität des Enzyms in der äußeren Membran im Verhältnis zur spezifischen Aktivität in den Mitochondrien wurde die relative spezifische Aktivität errechnet. Tabelle 4.2 zeigt die spezifische und relative Aktivität nach der Methode von Sottocasa et al. [1967].

Tab. 4.2: Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivität der mittels Swell-Disruption Methode gewonnenen Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien und der korrespondierenden Schweinenierenmitochondrien (Kapitel 4.2.1.2)

Fraktion	spezifische Enzymaktivität [U*mg ⁻¹]	relative spezifische Aktivität
Mitochondrien	0,195 ± 0,013	1
Äußere Membran Vesikel	1,560 ± 0,298	8

Die Enzymaktivität wurde als Mittelwert aus mindestens drei separaten Bestimmungen ermittelt. Die Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivität wurde nach der Methode von Sottocasa et al. [1967] bestimmt. Hierbei wurde die Reduktion von Cytochrom c spektralphotometrisch vermessen (Kap. 4.2.2.3).

4.3.1.2.3 Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung

Die zusätzliche Kontrolle der erfolgreichen Anreicherung der Äußeren Membran Vesikel wurde anhand des äußeren Membranmarkers Monoaminoxidase bestimmt. Aus der spezifischen Aktivität des Enzyms in der äußeren Membran im Verhältnis zur spezifischen Aktivität in den Mitochondrien wurde die relative spezifische Aktivität errechnet. Tabelle 4.3 zeigt die spezifische und relative Aktivität nach der Methode von Kline *et al.* [1986].

Tab. 4.3: Monoaminoxidase-Aktivität der mittels Swell-Disruption Methode gewonnenen Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien und der korrespondierenden Schweinenierenmitochondrien (Kapitel 4.2.1.2)

Fraktion	spezifische Enzymaktivität [U*mg ⁻¹]	relative spezifische Aktivität
Mitochondrien	0,053 ± 0,001	1
Äußere Membran Vesikel	0,353 ± 0,008	7

Die Enzymaktivität wurde als Mittelwert aus mindestens drei separaten Bestimmungen ermittelt. Die Monoaminoxidase-Aktivität wurde modifiziert nach der Methode von Kline et al. [1986] bestimmt. Hierbei wurde die enzymatisch katalysierte Bildung von Benzaldehyd vermessen (Kap. 4.2.2.4).

4.3.1.2.4 Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung

Cytochrom P450 konnte in der nach Omura und Sato [1964] modifizierten Methode in den Äußeren Membran Vesikeln nicht detektiert werden. Es konnte somit aus dem aufgenommenen Differenzspektrum kein Gehalt errechnet werden.

4.3.1.2.5 N-reduktive Aktivität

Die Kontrolle der Lokalisation der N-reduktiven Aktivität in den Äußeren Membran Vesikeln wurde anhand der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Aus der spezifischen Aktivität des Enzyms in der äußeren Membran im Verhältnis zur spezifischen Aktivität in den Mitochondrien wurde die relative spezifische Aktivität errechnet. Tabelle 4.4 zeigt die spezifische und relative Aktivität nach der Methode von Friedrich [2003].

Tab. 4.4: N-reduktive Aktivität der mittels Swell-Disruption Methode gewonnenen Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien und der korrespondierenden Schweinenierenmitochondrien (Kapitel 4.2.1.2)

Fraktion	spezifische Aktivität [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	relative spezifische Aktivität
Mitochondrien	21,38 ± 2,02	1
Äußere Membran Vesikel	210,55 ± 6,11	10

Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.2.6 Gesamtergebnis der Enzymcharakterisierung

Die Gewinnung der Äußeren Membran Vesikel dient dem Zweck, den Rest des Mitochondriums möglichst vollständig zu entfernen. Die Fraktion enthält bestenfalls nur noch Enzyme, die auch in der äußeren Membran vorkommen. Das heißt, spezifische Enzyme der Matrix, der inneren Membran und des Intermembranraumes sollten in den Äußeren Membran Vesikeln nicht mehr zu finden sein. Der Grad der Reinheit der gewonnenen Vesikel wird über Quotienten relativer, spezifischer Aktivitäten eines äußeren Membranmarkers im Verhältnis zur relativen, spezifischen Aktivität intramitochondrialer Marker in diesen Vesikeln berechnet. Die relative, spezifische Aktivität ist der Quotient aus der spezifischen Aktivität eines Enzyms und der spezifischen Aktivität des Homogenats bzw. der Mitochondrien. Das Homogenat stellt dabei die nach der Behandlung mit hypotonem Puffer erhaltene Mitochondrienfraktion dar (Kap. 4.2.1.2). Die Literatur verwendet üblicherweise die Aktivität von Mitochondrien als Vergleich, so dass in dieser Arbeit die relativen spezifischen Aktivitäten auf Mitochondrien bezogen wurden.

Wird der Quotient der äußeren Membran ins Verhältnis zur inneren Membran gesetzt, so erhält man die in Tabelle 4.5 aufgeführten Werte.

Tab. 4.5: Verunreinigung der mittels Swell-Disruption Methode gewonnenen Äußeren Membran Vesikel mit innerer Membran

Marker der äußeren Membran	Marker der inneren Membran	relative spezifische Aktivitäten	Quotient
Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase	Succinat Cytochrom c Reduktase	8 / 0,025	320
Monoaminoxidase	Succinat Cytochrom c Reduktase	7 / 0,025	280

Die relativen spezifischen Aktivitäten sind auf die unfractionierten Mitochondrien bezogen.

4.3.1.3 Charakterisierung und Inkubationsoptimierung der Reduktion von Benzamidoxim durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien

Die nach der Methode von de Kroon *et al.* [1997] gewonnenen Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien wurden nach den Gesichtspunkten Proteinkonzentration, Inkubationszeit, Cosubstratabhängigkeit und -art, pH-Wert und Substratabhängigkeit für das Substrat Benzamidoxim untersucht. Es ergab sich dabei folgender optimierter Inkubationsansatz (Kapitel 4.2.3.1.2): 4 µg Äußere Membran Vesikel, 300 µM NADH und 400 µM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 5,9 bei 10 Minuten Inkubationszeit. Die erhaltenen Daten sind in den Abbildungen 4.1-4.5 dargestellt.

4.3.1.3.1 Proteinabhängigkeit

Aus den erhaltenen Signalfächern wurden mit Hilfe der Wiederfindung die Umsetzungsraten berechnet. Dabei ergaben die Umsetzungsraten der Inkubationen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Bereich von 0 bis 20 µg je 150 µl Inkubationsansatz einen linearen Verlauf. Eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration führte zu einer Hemmung der Umsetzungsraten (Abb. 4.1).

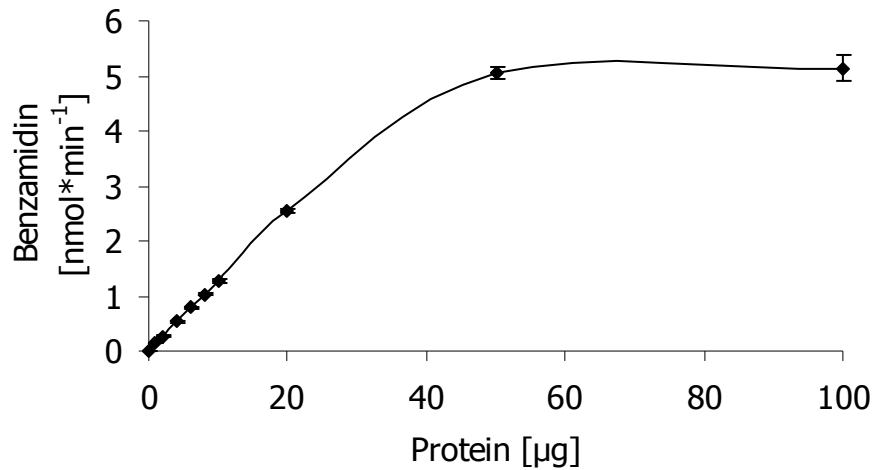


Abb. 4.1: Proteinabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0-100 µg Protein, 1 mM NADH und 1 mM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,0. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.3.2 Inkubationszeit

Bis zu einem Inkubationszeitraum von 20 Minuten verlief die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin linear. Wurde noch länger inkubiert, so nahm die Reaktionsgeschwindigkeit ab (Abb. 4.2). Gebildetes Benzamidin war bereits nach wenigen Minuten gut quantifizierbar.

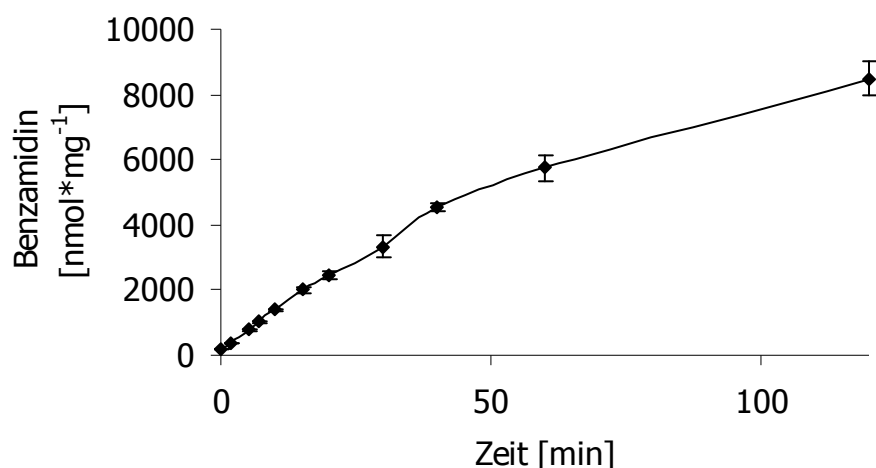


Abb. 4.2: Zeitabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 4 µg Protein, 1 mM NADH und 1 mM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,0. Die Inkubationszeit betrug 0-120 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.3.3 pH-Wert

Die pH-Wertabhängigkeit ergab in einem Bereich von pH 4,0 bis pH 8,0 ein Optimum bei pH 5,9 (Abb. 4.3).

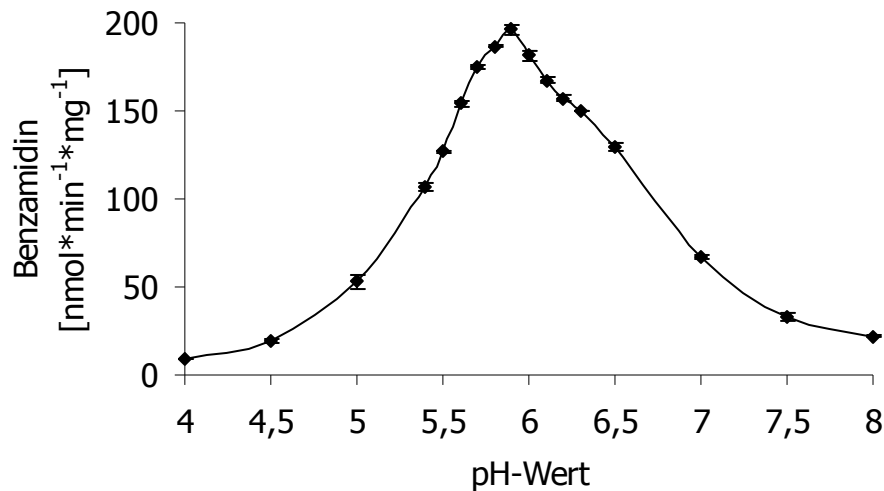


Abb. 4.3: pH-Wertabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 4 µg Protein, 1 mM NADH und 1 mM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 4,0-8,0. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.3.4 Substratabhängigkeit

Die Substratabhängigkeit des Benzamidoxims folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 4.4). Im Lineweaver-Burk-Plot betrug die Substratkonzentration bei halbmaximaler Sättigung (K_m) $26 \mu\text{M}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) $128,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die sich daraus ergebene katalytische Effizienz lag bei $5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

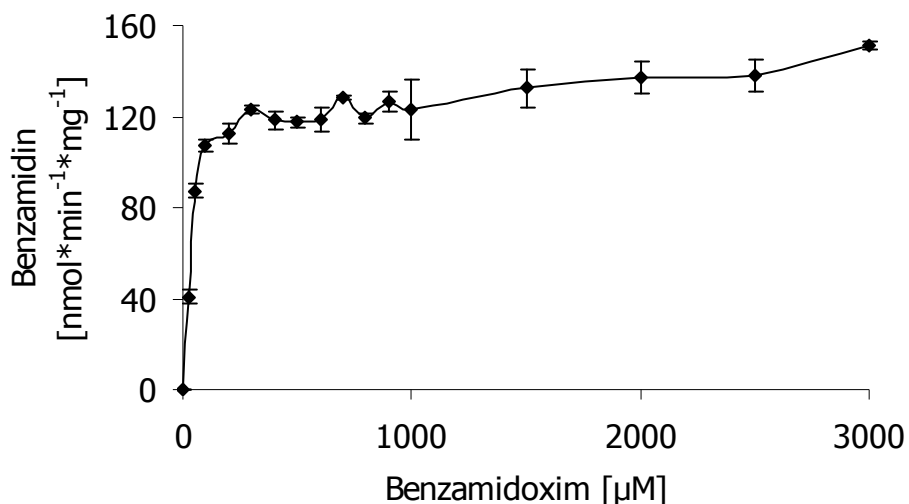


Abb. 4.4: Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: $4 \mu\text{g}$ Protein, 1 mM NADH und $0\text{-}3 \text{ mM}$ Benzamidoxim in $150 \mu\text{l}$ eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 5,9. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.3.5 Cosubstratabhängigkeit und -art

Zur Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin war die Zugabe eines Cosubstrates nötig. NADH wurde hierbei gegenüber NADPH bevorzugt (Abb. 4.5). Ab einer NADH-Konzentration von 100 μM kam es zu keiner nennenswerten Steigerung der Umsatzrate.

Kontrollinkubationen ohne Cofaktor zeigten keine detektierbaren Mengen an gebildetem Benzamidin.

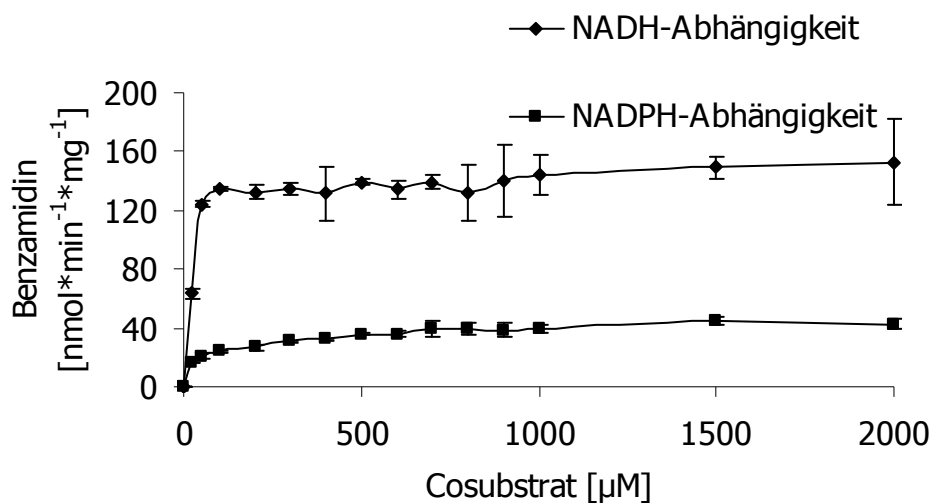


Abb. 4.5: Cosubstratabhängigkeit und -art der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 4 μg Protein, 0-2 mM Cosubstrat (NADH oder NADPH) und 400 μM Benzamidoxim in 150 μl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 5,9. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.4 Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim mittels Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien

Mittels Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien wurde die Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin unter aeroben und anaeroben Bedingungen getestet. Eine Abhängigkeit war nicht festzustellen (Abb. 4.6)

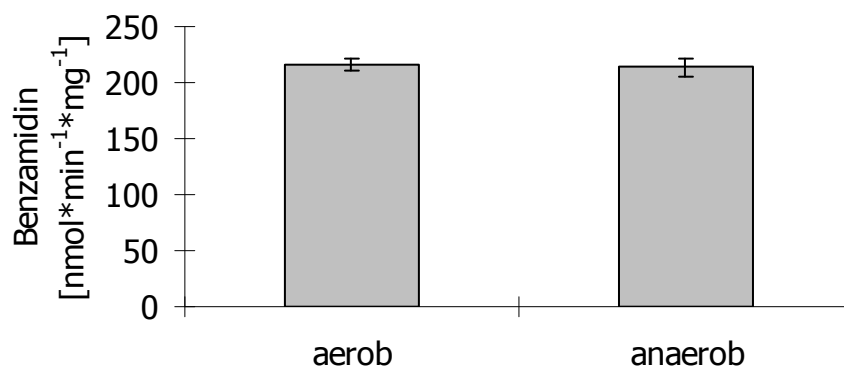


Abb. 4.6: Sauerstoffabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.2 und 4.2.3.1.4 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.5 Hemmstudien

Die Hemmergebnisse der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin mit Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien werden in diesem Kapitel zusammengestellt.

4.3.1.5.1 Kaliumcyanid

Hämhaltige Enzyme werden durch Cyanidionen gehemmt, wenn die Oxidationsstufe des Eisens +3 beträgt. Der Cyanidioneneinfluss auf die Reduktion von Benzamidoxim durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien wurde nach der in

Kapitel 4.2.3.1.5.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei konnte eine Hemmung festgestellt werden (Abb. 4.7). Es blieb eine Restaktivität von etwa 45 % der Ausgangsaktivität erhalten. Die ermittelte IC_{50} ergab $423 \mu\text{M}$.

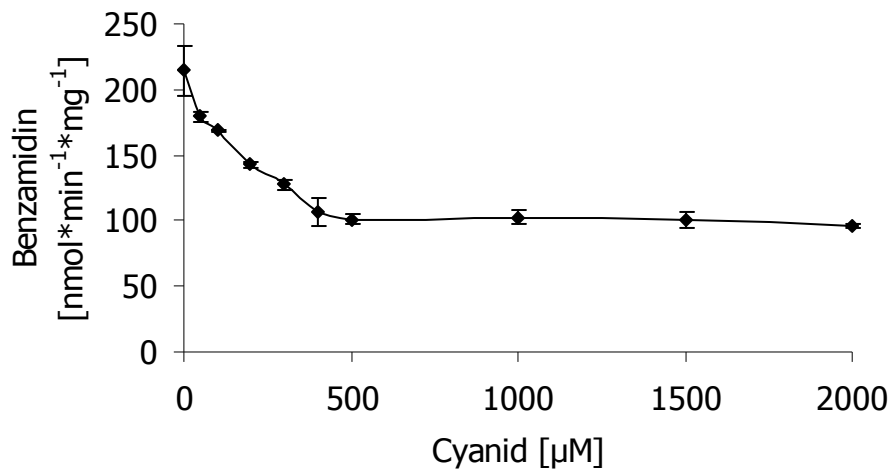


Abb. 4.7: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Kaliumcyanid. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.5.1 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.5.2 Hydroxylamin-HCl

Hydroxylamin-HCl konnte die Reduktion von Benzamidoxim hemmen. Es blieb eine Restaktivität von etwa 9 % der Ausgangsaktivität erhalten (Abb. 4.8). Die ermittelte IC_{50} ergab 95 μM .

Die kompetitive Hemmung wurde bereits von Havemeyer [2006] und Andersson *et al.* [2005] untersucht.

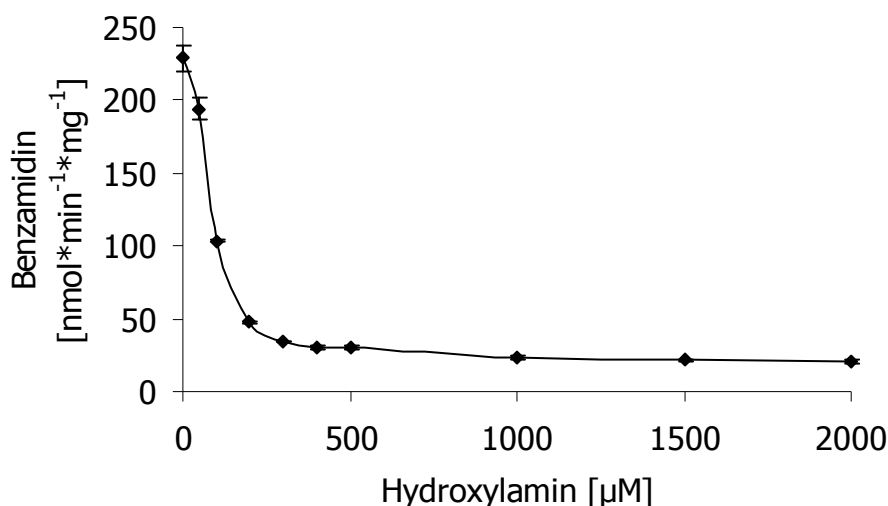


Abb. 4.8: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Hydroxylamin-HCl. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.5.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.5.3 *p*-Hydroxymercuribenzoat

Mit dem selektiven, kompetitiven Inhibitor *p*-Hydroxymercuribenzoat konnte die Beteiligung der NADH Cytochrom b_5 Reduktase an der Reduktion von Benzamidoxim eindeutig gezeigt werden (Abb. 4.9). Ab 10 μM *p*-Hydroxymercuribenzoat war keine Restaktivität mehr detektierbar (Abb. 4.9). Die ermittelte IC_{50} ergab 4 μM .

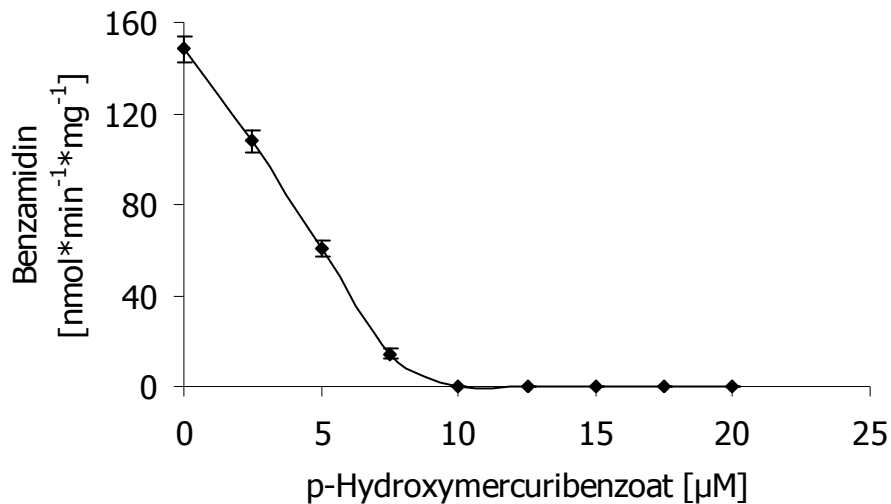


Abb. 4.9: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von *p*-Hydroxymercuribenzoat. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.5.3 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.5.4 Cytochrom c

Ab einer Konzentration von 3000 μM war eine fast vollständige Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität der Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien mittels Cytochrom c zu detektieren (Abb. 4.10). Cytochrom c ist ein potentieller Elektronenakzeptor des Cytochrom b_5 [Bernardi und Azzone, 1981]. Die ermittelte IC_{50} ergab 257 μM .

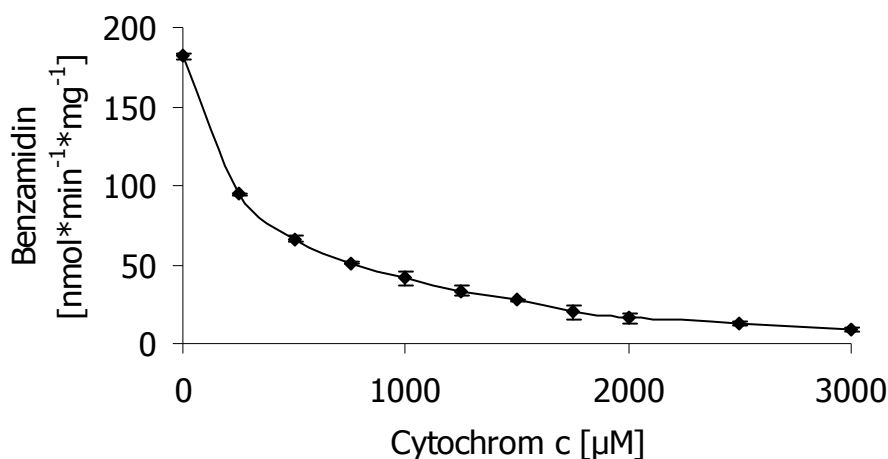


Abb. 4.10: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Cytochrom c. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.5.4 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.5.5 Kohlenmonoxid

Kohlenmonoxid hemmt das Eisen der Oxidationsstufe +2 hämhaltiger Enzyme. Der Kohlenmonoxideinfluss auf die Reduktion von Benzamidoxim durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien wurde nach der in Kapitel 4.2.3.1.5.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei konnte keine Hemmung festgestellt werden (Abb. 4.11).

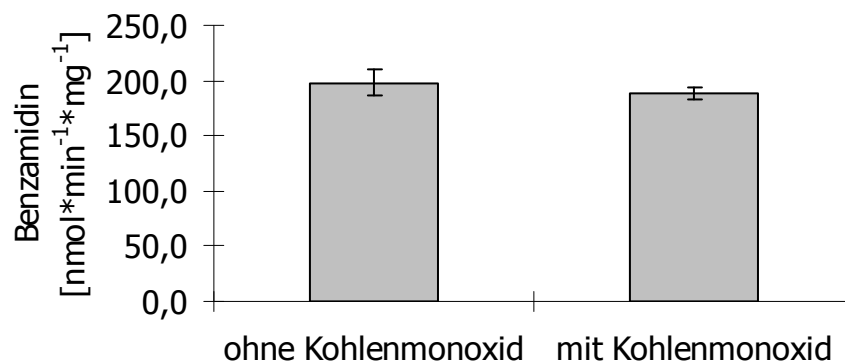


Abb. 4.11: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Kohlenmonoxid. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.5.5 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.1.5.6 Natriumvanadat

Die Beteiligung eines molybdänhaltigen Enzyms an der Reduktion von Benzamidoxim ist möglich. Dieses konnte durch Natriumvanadat, einem hochwirksamen Inhibitor molybdänhaltiger Enzyme, gezeigt werden (Abb. 4.12).

Ab 40 μM Natriumvanadat war keine Restaktivität mehr detektierbar. Die ermittelte IC_{50} Konzentration ergab 14 μM .

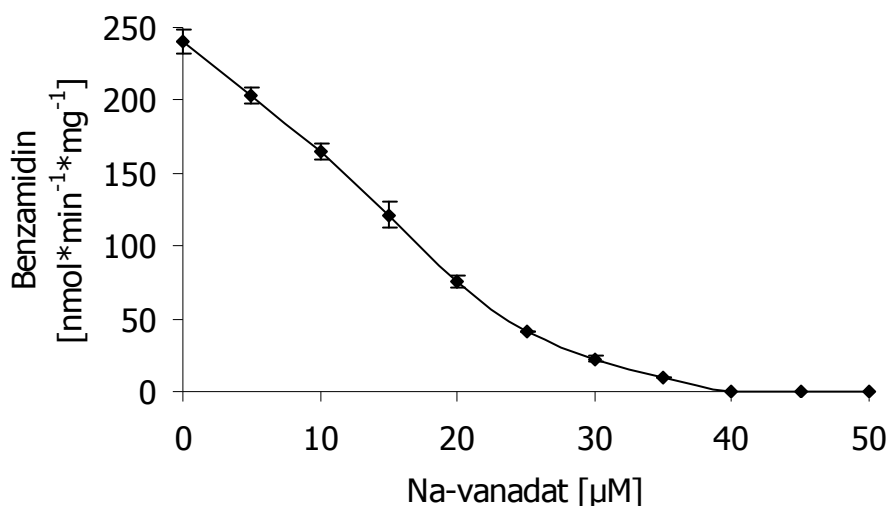


Abb. 4.12: Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien in Gegenwart von Natriumvanadat. Die Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 4.2.3.1.5.6 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 4.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

4.4 Diskussion

In dieser Arbeit sollten Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nach der Swell-Disruption Methode mit anschließender Zweischritt-Dichte-zentrifugation nach de Kroon *et al.* [1999] gewonnen werden. Die erhaltenen Äußeren Membran Vesikel sollten hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität untersucht und beurteilt werden. Anschließend sollte die *N*-reduktive Aktivität in diesen Vesikeln bestätigt und charakterisiert werden.

Die Subfraktionierung von Schweinelebermitochondrien wurde von Havemeyer [2006] anhand verschiedener Methoden beschrieben. Das Hauptkriterium zur Beurteilung der besten Methode war das Ausmaß der Kontamination der Äußeren Membran Vesikel mit innerer Membran. Havemeyer [2006] bezog ihre gewonnenen Daten dabei auf Ergebnisse der Subfraktionierung von Rattenlebermitochondrien. Üblicherweise werden in der Literatur Aufreinigungsfaktoren zwischen 10 und 200 angegeben. Ausnahme bildet die oben genannte Methode von de Kroon *et al.* [1999] mit einem Faktor größer 800. Während Deters [2002] in ihrer Arbeit mit Schweinelebermitochondrien mittels Digitonin-Stripping und anschließender Differentialzentrifugation einen Aufreinigungsfaktor von sechs beschrieben hat, wurde von Havemeyer [2006] für Schweinelebermitochondrien mittels Swell-Disruption Methode mit anschließender Zweischritt-Dichte-zentrifugation ein Aufreinigungsfaktor zwischen 120 und 210 beschrieben.

Daten für die Subfraktionierung von Nierenmitochondrien sind in der Literatur nicht vorhanden. Die Leber stellt hier das dominante Organ für derartige Untersuchungen dar. Daher beziehen sich die in dieser Arbeit ermittelten Daten auf die Ergebnisse von Havemeyer [2006], um innerhalb der Spezies zu bleiben.

Dementsprechend wurden in dieser Arbeit die Äußeren Membran Vesikel enzymatischen Testungen unterzogen (Tab. 4.1-4.4). Dabei wurde ein Aufreinigungsfaktor zwischen 280 und 320 erhalten (Tab. 4.5).

Zusätzlich wurde der Gehalt der mikrosomalen NADPH Cytochrom P450 Reduktase bestimmt (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde eine Anreicherung dieses Enzyms um den Faktor acht im Verhältnis zu den „reinen“ Mitochondrien (Tab. 3.1) festgestellt. Dieses deckt sich mit dem Ergebnis von Havemeyer [2006].

Die NADPH Cytochrom P450 Reduktase wird normalerweise als mikrosomale Verunreinigung der mitochondrialen Subfraktion angesehen. Da die „reinen“

Mitochondrien lediglich zu 3 % mit NADPH Cytochrom P450 Reduktase verunreinigt waren (Tab. 3.1), kann das erhöhte Auftreten dieses Enzyms nicht mit einer neu hinzugekommenen Verunreinigung begründet werden. Vielmehr handelt es sich um eine relative Steigerung des Enzyms im Verhältnis zum Gesamtprotein, da die innere Membran in diesem Arbeitsschritt abgetrennt wurde, welche den größten Teil des Mitochondriums ausmacht. Wie schon in Kapitel 4.1.1 erwähnt, haftet immer Endoplasmatisches Retikulum an den Mitochondrien oder ist sogar mit den Mitochondrien verschmolzen [Ardail *et al.*, 1993]. Schon in den Siebziger Jahren wurden Reinigungen dieses Enzyms aus der äußeren mitochondrialen Membran beschrieben [Comte und Gautheron, 1978; Kulkoski *et al.*, 1979]. Somit scheint die NADPH Cytochrom P450 Reduktase kein exklusives Enzym der Mikrosomen zu sein. Somit ist bei der gezielten Anreicherung der äußeren mitochondrialen Membran eine Anreicherung dieses Enzyms verständlich. Der dabei erzielte Anreicherungsfaktor acht ist zudem vergleichbar mit den Anreicherungsfaktoren der Monoaminoxidase sowie Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase (Tab. 4.2-4) für die Äußeren Membran Vesikel.

Die *N*-reduktive Aktivität der Schweinenierenmitochondrien und der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien ist in Tabelle 4.4 dargestellt. Der Anreicherungsfaktor der Reduktionsrate beträgt 10. Damit ist auch hier eine den anderen Markerenzymen vergleichbare Anreicherung erzielt worden. Zudem kann die Lokalisation des zu isolierenden Enzymsystems erstmalig auf der Äußeren Membran in Schweinenierenmitochondrien bestätigt werden und stimmt mit den bisher gefundenen Daten in Lebermitochondrien überein [Andersson *et al.*, 2005; Havemeyer, 2006].

Eine Übertragbarkeit der Methode von Schweinelebermitochondrien auf Schweinenierenmitochondrien war somit gegeben. Vergleichend zur Gewinnung der Mitochondrien stellte sich auch hier heraus, dass sich die einzelnen Fraktionen in der Zentrifugation nicht so klar voneinander trennten (Kap. 3.5), wie es bei den Schweinelebermitochondrien der Fall war. Da die erhaltenen Aufreinigungsfaktoren wiederum mit denen von Havemeyer [2006] übereinstimmten, wurde die etwas schlechtere Trennung im Zentrifugenglas als organspezifisch angesehen.

Die Charakterisierung der *N*-reduktiven Aktivität der gewonnenen Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien wurde mit Benzamidoxim als Modellsubstanz durchgeführt. Die Äußeren Membran Vesikel sind für diese Reaktion sauerstoffinsensitiv (Abb. 4.6). Zudem bevorzugen sie ein schwach saures

pH-Optimum (Abb. 4.3). Bei der Cosubstratabhängigkeit überwiegt die *N*-reduktive Aktivität bei Einsatz von NADH im Vergleich zu NADPH (Abb. 4.5). Diese Ergebnisse stimmen mit denen der bisher durchgeführten Untersuchungen (Kapitel 1.4; 3.4) überein.

Im niedrigen und hohen pH-Bereich sind die Carboxylgruppen an der Oberfläche des Hämproteins des Cytochrom b_5 jeweils nicht oder zumindest nur erschwert in der Lage, mit der NADH Cytochrom b_5 Reduktase zu interagieren (Kapitel 6.1.1). Im leicht sauren Bereich hingegen findet die Übertragung der Protonen optimal statt. Der Verlauf der Bestimmung des pH-Optimums entspricht der Vorstellung der Interaktion von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase [Strittmatter und Dailey, 1982; Durley und Mathews, 1996].

Der in dieser Arbeit ermittelte K_m -Wert bezogen auf Benzamidoxim für die Äußeren Membran Vesikel betrug $26 \mu\text{M}$ (Kapitel 4.3.1.3.4). Der K_m -Wert ist erstmalig für diese Reaktion in den Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien bestimmt worden. Im Vergleich dazu liegt der K_m -Wert der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinelebermitochondrien bei $70 \mu\text{M}$ und ist damit nur unwesentlich höher. Die katalytische Effizienz, welche sich aus dem Quotienten V_{max} und K_m ergibt, betrug $5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die Äußeren Membran Vesikel der Lebermitochondrien besitzen eine katalytische Effizienz von $4,3 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und sind damit nur unerheblich weniger effizient.

Diese sehr ähnlichen kinetischen Eigenschaften zeugen von einem zumindest vergleichbaren Enzymsystem zur Reduktion von Benzamidoxim. Dabei ist zu bedenken, dass in der Vergangenheit viele gewebeabhängige Unterschiede in Mitochondrien gefunden worden sind. Die ersten Unterschiede wurden histochemisch und mikroskopisch festgestellt [Hackenbrock, 1966; Goyer und Krall, 1969; Ernster und Schatz, 1981]. Mit zunehmender und besserer Technik konnten aber auch in der jüngeren Vergangenheit enzym-, transporter- und reaktionsspezifische Unterschiede in den Mitochondrien unterschiedlicher Gewebe innerhalb einer Spezies festgestellt werden [Rossignol *et al.*, 2000; Karahalil *et al.*, 2002; Raza *et al.*, 2004].

Eine Beteiligung der NADH Cytochrom b_5 Reduktase konnte mit dem selektiven Inhibitor *p*-Hydroxymercuribenzoat [Lostanlen *et al.*, 1978] bestätigt werden (Abb. 4.9). Cytochrom *c* ist ein Elektronenakzeptor des Cytochrom b_5 und wirkt als kompetitiver Hemmstoff. Erstaunlicherweise konnte eine Hemmung mittels Cytochrom *c* erst im hohen mikromolaren Bereich gezeigt werden (Abb. 4.10), obwohl Mitochondrien durch geringste Mengen Cytochrom *c* keine *N*-reduktive

Aktivität mehr besaßen (Abb. 3.10). Cytochrom c ist als Elektronenvermittler zwischen der äußeren und inneren Membran der Mitochondrien tätig [Bernardi und Azzone, 1981]. Dabei ist das Cytochrom c nur locker an die Membran assoziiert. Die elektronenübertragende Domäne des Cytochrom b_5 ist außerhalb der Mitochondrien auf der äußeren Membran lokalisiert [Durley und Mathews, 1996]. In der Untersuchung mit den Mitochondrien war diese Domäne somit frei und gut zugänglich für das exogen zugesetzte Cytochrom c, welches ein Molekulargewicht von circa 12 kDa besitzt.

In diesem Hemmversuch hingegen war die äußere Membran vom Rest des Mitochondriums abgelöst und zu kleinsten Vesikeln zusammengelagert. Cytochrom b_5 war dabei weiterhin durch seinen Membrananker in diesen Vesikeln fest gebunden und konnte somit nicht frei agieren. Eine Möglichkeit zur Erklärung der geringen Hemmwirkung von Cytochrom c ist, dass sich bei der Ausbildung der Äußeren Membran Vesikel die zunächst vorliegende Außenseite der Mitochondrien nach innen kehrt. Damit klappt die elektronenbindende Domäne des Cytochrom b_5 nach innen und ist nicht mehr für ein solch großes Molekül wie das Cytochrom c erreichbar. Eine andere mögliche Erklärung liegt in der Größe der gebildeten Vesikel. Möglicherweise sind die Äußeren Membran Vesikel so klein, dass sie nicht mehr mit Cytochrom c interagieren können.

Die kompetitive Hemmwirkung von Hydroxylamin ist schon in Kapitel 3.4 beschrieben worden. Auch mit den Äußeren Membran Vesikeln konnte eine starke Hemmung der Benzamidoximreduktion durch Hydroxylamin bestätigt werden (Abb. 4.8). Dieses bedeutet, dass in den Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien ein der Hydroxylaminreduktase vergleichbares Enzymsystem vorhanden sein muss.

Zusätzlich zu den Enzymen Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase, welche in der löslichen Form allein dazu in der Lage sind, Benzamidoxim zu reduzieren [Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005], wurde bei den membranständigen Enzymen die Beteiligung einer dritten Komponente beschrieben [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 2005], die die Umsetzungsraten deutlich erhöht.

Die Beteiligung eines Cytochrom P450 Isoenzym wurde bereits beschrieben (Kapitel 2.1.3 und 3.4). In dieser Arbeit konnte in den Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien kein charakteristisches Absorptionsspektrum bei 450 nm detektiert werden. In der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien konnte die Beteiligung des Molybdäncofaktors gezeigt werden [Havemeyer, 2006], Cytochrom P450 war ebenfalls nicht detektierbar.

Cytochrom P450 Isoenzyme werden durch den unspezifischen Hemmstoff Kohlenmonoxid inhibiert. Der Hemmstoff hatte bei der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung keinen Einfluss (Abb. 4.11). Kohlenmonoxid hemmt die Ferroform des im Hämgerüst enthaltenen Eisens. Im postulierten Mechanismus [Clement, 2002] muss aber die Ferriform zur Übertragung der Protonen vorliegen. Die Hemmbarkeit der Ferriform wurde durch den Hemmstoff Kaliumcyanid kontrolliert (Abb. 4.7). Es konnte eine Empfindlichkeit des Enzymsystems für Cyanidionen festgestellt werden. Dabei wurde die Umsatzrate auf 45 % des Anfangswertes reduziert. Die in der Literatur beschriebenen Daten sind sehr unterschiedlich. Diese sind in Kapitel 3.4 ausgeführt. Havemeyer [2006] konnte in den Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinelebermitochondrien eine Aktivierung der Benzamidoxim-Reduktase feststellen. Sie deutet ihr Ergebnis als Cyanidaktivierung. Die schon oben beschriebene geringe Hemmung der Reduktion mittels Cytochrom c und das Ergebnis von Havemeyer [2006] deuten sehr stark auf eine Veränderung der Interaktion der einzelnen an der Reduktion beteiligten Enzyme hin. Die Untersuchung dieser neuen Verhältnisse sollte in weiterführenden Arbeiten zur genauen Erforschung des Mechanismus durchgeführt werden. Elektronmikroskopische Aufnahmen können hier sicherlich hilfreich sein.

Havemeyer [2006] hat in der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien den Molybdäncofaktor als verantwortliches Coenzym für Reduktion von Benzamidoxim gefunden. Aufbau und Funktionsweise sind in Kapitel 6.1.4 beschrieben. Molybdänhaltige Enzyme sind durch Vanadationen hemmbar [Ramadoss, 1980], wobei sie auch andere Enzyme hemmen (Kapitel 3.4).

Eine niedrige Konzentration an Vanadationen führte in den Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien bereits zu einer Hemmung der Benzamidoxim-Reduktase (Abb. 4.12). Die Beteiligung des Molybdäncofaktors am Benzamidoxim reduzierenden Enzymsystem ist somit in den Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien nicht ausgeschlossen. Da aber mehrere Enzyme durch Vanadationen gehemmt werden, ist eine Bestätigung der Verantwortlichkeit zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich.

4.5 Zusammenfassung

Es wurden Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nach der Swell-Disruption Methode mit anschließender Zweischritt-Dichtezentrifugation nach de Kroon *et al.* [1999] gewonnen. Die Übertragbarkeit dieser Methode von Leber auf Niere war dabei größtenteils gegeben. Die gemessenen Marker zeigten im Vergleich zur Leber niedrigere Aktivitäten. Trotzdem wurde eine gute Isolierung der Äußeren Membran Vesikel erzielt worden, was durch die sehr hohen Aufreinigungsfaktoren bestätigt wurde. Die Methode musste deshalb nicht weiter verändert werden.

Typische und literaturbeschriebene Charakteristika der *N*-reduktiven Reaktion konnten in den Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien gezeigt werden. Ein schwach saures Milieu sowie Kohlenmonoxid- und Sauerstoffinsensitivität waren dabei mit den bisherigen Untersuchungen vergleichbar. Die Beteiligung von NADH Cytochrom b_5 Reduktase konnte bestätigt werden. Da Hydroxylamin als kompetitiver Hemmstoff der Benzamidoximreduktion fungiert, wurde eine Gemeinsamkeit zur Hydroxylaminreduktase gezeigt. Die Hemmbarkeit der Reaktion durch Vanadationen lässt die Möglichkeit einer Beteiligung von Molybdäncofaktor zu. Lediglich die geringe Hemmbarkeit mit Cytochrom c ist überraschend und gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen.

Die Michaelis-Menten Kinetik und die katalytische Effizienz für das Substrat Benzamidoxim sind vergleichbar mit den vorliegenden Daten der Leber.

Der nicht messbare Cytochrom P450-Gehalt bei gleichzeitig sehr hoher *N*-reduktiver Aktivität sowie Insensitivität gegenüber Kohlenmonoxid und nur partielle Sensitivität gegenüber Cyanidionen lässt die Beteiligung eines Cytochrom P450 Isoenzym an dieser Reduktion unwahrscheinlich erscheinen.

5 ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER DRITTEN KOMPONENTE AUS ÄUßEREN MEMBRAN VESIKELN

5.1 Einleitung

5.1.1 Gewinnung membranständiger Enzyme

Es gelten die gleichen Bedingungen, die in Kapitel 2.1.2 beschrieben sind.

5.1.2 Bisherige Untersuchungen

In Schweinelebermikrosomen konnte ein Enzymsystem, verantwortlich für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen, isoliert werden. Daran beteiligt sind Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase sowie ein Cytochrom P450 Isoenzym der Subfamilie 2D [Clement *et al.*, 1997].

In Schweinelebermitochondrien konnte auch die Beteiligung von Cytochrom b_5 sowie NADH Cytochrom b_5 Reduktase gezeigt werden [Deters, 2002]. Deters [2002] postulierte eine dritte Komponente, die möglicherweise in der äußeren Membran der Mitochondrien zu finden ist.

Die Isolierung der äußeren mitochondrialen Membran führt zu Vesikeln, die im Folgenden Äußere Membran Vesikel genannt werden. Havemeyer [2006] konnte zeigen, dass das *N*-reduzierende Enzymsystem in den Äußeren Membran Vesikeln der Schweinelebermitochondrien zu finden ist. In ihrer Arbeit wurde die Beteiligung von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase am *N*-reduzierenden Enzymsystem bestätigt. Zudem konnte sie den C-Terminus der Mocosulfurase als dritte beteiligte Komponente identifizieren.

5.1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit war die Übertragbarkeit der Methode zur Gewinnung und Identifizierung der dritten Komponente auf Schweinenierenmitochondrien zu kontrollieren, zu testen und gegebenenfalls zu modifizieren. Des Weiteren sollte die gewonnene Enzymfraktion für die *in vitro* Studien charakterisiert werden. Immunoblot-Analysen sowie massenspektrometrische Analysen sollten zur Identifizierung der dritten Komponente herangezogen werden.

5.2 Methoden

5.2.1 Gewinnung der Enzympräparation

5.2.1.1 Materialien und Geräte

Sofern nicht angegeben, befindet sich eine Übersicht über die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 der vorliegenden Arbeit.

5.2.1.2 Gewinnung der Schweinenierenmitochondrien

Die Gewinnung der Schweinenierenmitochondrien mittels Percoll[®] ist in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben.

5.2.1.3 Gewinnung der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien

Die Gewinnung der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien mittels der Swell-Disruption Methode mit anschließender Zweischnitt-Dichtezentrifugation ist in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben.

5.2.1.4 Gewinnung der dritten Komponente aus Äußeren Membran Vesikeln von Schweinenierenmitochondrien

5.2.1.4.1 Solubilisation

Die Solubilisation der Äußeren Membran Vesikel fand in folgender Lösung statt: 13 mg Äußere Membran Vesikel, 0,9 mM Zwittergent[®] 3-14, 20 mM Tris-Base, 0,1 mM Dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 20 % Glycerol in einem Endvolumen von 20,0 ml mit *Aq. bidest.*. Das Protein/Detergenzverhältnis belief sich dabei auf den Faktor zwei. Die Lösung wurde auf pH 7,4 mittels Phosphorsäure eingestellt. Danach wurde der Ansatz eine Stunde im Eisbad mit einem Magnetkern gerührt. 200 µl des Solubilisats wurden zu Kontrollzwecken entnommen und bei -80 °C gelagert. Das restliche Solubilisat wurde auf die Anionenaustauschchromatographie-Säule aufgetragen (Kapitel 5.2.1.4.2). Eine Zentrifugation zur Abtrennung nicht solubilisierter Proteine fand nicht statt.

5.2.1.4.2 Anionenaustauschchromatographie an DEAE Cellulose

Folgende Pufferlösungen wurden verwendet:

Äquilibrierpuffer, pH 7,4 (4 °C): 20 mM Tris-Base
0,1 mM EDTA
0,1 mM DTT
0,9 mM Zwittergent[®] 3-14
20 % (w/v) Glycerol

Elutionspuffer, pH 7,4 (4 °C): 1 M Natriumchlorid in
Äquilibrierpuffer, pH 7,4

Alle Puffer wurden durch einen Sartorius[®] Membranfilter (0,45 µm) per Vakuumfiltration von Partikeln befreit. Vor der Verwendung wurde der Eluent 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Das erhaltene Solubilisat wurde auf eine DEAE 52-Cellulose SERVACEL[®] Säule (Fa. Serva, 2,5 x 10 cm, 50 ml Gelvolumen) aufgetragen. Zuvor wurde die Säule mit ausreichend Äquilibrierpuffer konditioniert. Nach Auftragen des Solubilisats mit 0,8 ml*min⁻¹ wurde mit weiteren 100 ml Äquilibrierpuffer nachgewaschen. Danach wurde über einen Gradientenformer ein linearer Gradient von 0-1 M Natriumchlorid in einem Volumen von 250 ml erzeugt. Das Eluat wurde in 4 ml Fraktionen aufgefangen. Dabei lief die Pumpe weiterhin mit 0,8 ml*min⁻¹. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C.

Die erhaltenen DEAE-Fraktionen wurden mittels der in Kapitel 5.2.1.4.2.1-13 angegebenen Methoden untersucht. Alle erhaltenen Fraktionen wurden aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

5.2.1.4.2.1 Protein-Verlaufskontrolle

Die Absorption der eluierten Fraktionen wurde bei 280 nm und 417 nm vermessen. Da der Äquilibrierpuffer eine geringe Eigenabsorption aufwies, wurde dieser Wert von den gemessenen Werten abgezogen.

Zudem wurde der Proteingehalt nach der in Kapitel 5.2.2.1 beschriebenen Methode bestimmt.

5.2.1.4.2.2 Cytochrom b_5 -Verlaufskontrolle

Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Cytochrom b_5 Gehalt untersucht. Dabei fand die Cytochrom b_5 -Bestimmung nach der in Kapitel 5.2.2.2 beschriebenen Methode statt.

5.2.1.4.2.3 NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Verlaufskontrolle

Alle Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie wurden der NADH Cytochrom b_5 Reduktase Bestimmung unterzogen. Die Methode ist in Kapitel 5.2.2.3 wiedergegeben.

5.2.1.4.2.4 Monoaminoxidase-Verlaufskontrolle

Zur Bestimmung der Monoaminoxidase-Aktivität wurde die in Kapitel 5.2.2.4 beschriebene Methode verwendet. Alle Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie wurden auf Monoaminoxidase-Aktivität hin untersucht.

5.2.1.4.2.5 Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Verlaufskontrolle

Die Bestimmung der Rotenon-insensitiven Cytochrom c Reduktase-Aktivität wurde nach der Methode in Kapitel 5.2.2.5 durchgeführt. Die Untersuchung fand mit allen gesammelten Fraktionen statt.

5.2.1.4.2.6 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle ohne zusätzliche Enzyme

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet. Das rekonstituierte System bestand aus 10 μ l der entsprechenden DEAE-Fraktion. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben.

5.2.1.4.2.7 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b₅ Reduktase

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet. Das rekonstituierte System bestand aus 10 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion und 0,05 U NADH Cytochrom b₅ Reduktase. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben.

5.2.1.4.2.8 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetztem humanem, rekombinantem Cytochrom b₅

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet. Das rekonstituierte System bestand aus 10 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion und 100 pmol Cytochrom b₅. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben.

5.2.1.4.2.9 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b₅ Reduktase und zugesetztem humanem, rekombinantem Cytochrom b₅

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet. Das rekonstituierte System bestand aus 10 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion, 0,05 U NADH Cytochrom b₅ Reduktase und 100 pmol Cytochrom b₅. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben.

5.2.1.4.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Überprüfung des Proteinverlaufs in den einzelnen Fraktionen wurde mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dargestellt. Die verwendete Methode ist in Kapitel 5.2.2.6 beschrieben.

5.2.1.4.2.11 *nit-1* Rekonstitutions-Assay

Die *nit-1* Rekonstitutionsanalyse diente der Bestimmung der Molybdäncofaktoraktivität. Die Rekonstitution wurde mittels der Nitratreduktaseaktivität der *nit-1* Mutante [Nason *et al.*, 1971] bestimmt und freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Die Methode ist in Kapitel 5.2.2.8 beschrieben.

5.2.1.4.2.12 Sulfitoxidase-Verlaufskontrolle

Zur Bestimmung der Sulfitoxidaseaktivität wurde die in Kapitel 5.2.2.9 beschriebene Methode verwendet. Viele Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie wurden auf Sulfitoxidaseaktivität hin untersucht.

Die Bestimmung wurde freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt.

5.2.1.4.2.13 FormA Analyse

Die FormA Analyse wies spezifisch das Molybdopterin-Grundgerüst nach. Die Bestimmung wurde nach der in Kapitel 5.2.2.10 beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Analyse wurde freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt.

5.2.1.4.2.14 Immunoblot-Analyse

Die Immunoblot-Analyse wurde nach der in Kapitel 5.2.2.11 beschriebenen Methode durchgeführt. Die im *nit-1* Rekonstitutions-Assay positiv getesteten Fraktionen wurden von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) der Immunoblot-Analyse unterzogen.

5.2.1.5 Cytochrom b₅

Humanes, rekombinantes Cytochrom b₅ [Holmans *et al.*, 1994] wurde von der Firma MoBiTec (Göttingen) bezogen.

5.2.1.6 Gewinnung von NADH Cytochrom b₅ Reduktase

Die Gewinnung der NADH Cytochrom b₅ Reduktase aus Schweinelebermikrosomen ist in Kapitel 6.2.1.3 beschrieben.

5.2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparation

5.2.2.1 Proteinbestimmung

Die Methode zur Proteinbestimmung ist in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben.

5.2.2.2 Cytochrom b₅-Gehaltsbestimmung

Cytochrom b₅ wurde anhand des Differenzspektrums von reduzierter und oxidiertes Form von Cytochrom b₅ bestimmt. Die Methode wurde modifiziert durchgeführt nach Estabrook und Werringloer [1978]. Die Bestimmung beruht auf der Reduktion des Cytochrom b₅, die durch eine Absorptionszunahme bei ≈ 426 nm und eine -abnahme bei ≈ 409 nm charakterisiert ist. Die Probe wurde entweder unverdünnt eingesetzt oder mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 verdünnt. Nach Aufnahme des ersten Absorptionsspektrums (400-500 nm) wurde etwa 1 mg Natriumdithionit zugesetzt. Im Abstand von 60 Sekunden wurde das zweite Spektrum der reduzierten Präparation aufgenommen. Durch Subtraktion beider Spektren erhielt man ein Differenzspektrum. Die resultierende Absorptionsdifferenz zwischen dem Absorptionsmaximum bei ≈ 426 nm und dem -minimum bei ≈ 409 nm wurde zur Berechnung des Cytochrom b₅-Gehaltes herangezogen.

Die dithionitvermittelte Reduktion war mit dieser Proteinpräparation bestimmbar, da die Äußeren Membran Vesikel frei von detektierbarem Cytochrom P450 waren (Kapitel 4.3.1.2.4).

Zur Berechnung diente der ermittelte Absorptionskoeffizient $\varepsilon=185 \text{ nM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [Estabrook und Werringloer, 1978].

5.2.2.3 NADH Cytochrom b₅ Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die Methode der NADH Cytochrom b₅ Reduktase-Aktivitätsbestimmung ist in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben.

5.2.2.4 Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung

Die Methode der Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung ist in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben.

5.2.2.5 Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die Methode zur Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung ist in Kapitel 4.2.2.3 beschrieben.

5.2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Methode zur Herstellung und Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist in Kapitel 2.2.2.7 beschrieben.

Silberfärbung:

Zur Färbung wurde ein Bio-Rad Silver Stain Kit (Bio-Rad, München) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

5.2.2.7 Massenspektrometrische Analyse

Die Methode der massenspektrometrischen Analyse ist in Kapitel 2.2.2.8 beschrieben.

5.2.2.8 *nit-1* Rekonstitutions-Analyse

Die Methode der *nit-1* Rekonstitutions-Analyse ist in Kapitel 2.2.2.9 beschrieben.

5.2.2.9 Sulfitoxidase-Verlaufskontrolle

Die Sulfitoxidaseaktivitäts-Bestimmung wurde nach der Methode von Lee *et al.* [2002] freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Zunächst wurde das Protein in einer Lösung aus 0,1 M Tris-HCl und 0,1 mM EDTA, pH 8,5 homogenisiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität in einem 300 µl Ansatz, bestehend aus 0,5 M Tris-HCl, 0,16 mM Natriumdeoxycholinsäure, 2 mM Kaliumcyanid, 0,25 mg Cytochrom c und 1 mM Natriumsulfit bestimmt.

Die Enzymaktivität ist im Folgenden in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die benötigt wird, um die Absorption bei 550 nm und 25 °C um 1,0 zu erhöhen.

5.2.2.10 FormA Analyse

Die Methode der FormA Analyse ist in Kapitel 2.2.2.10 beschrieben.

5.2.2.11 Immunoblot-Analyse

Die Methode der Immunoblot-Analyse ist in Kapitel 2.2.2.11 beschrieben.

5.2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktase

5.2.3.1 Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin

Die *N*-reduktive Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet.

5.2.3.1.1 Synthese von Benzamidoxim

Benzamidoxim wurde nach der Methode von Krüger [1885] aus Benzonitril und Hydroxylamin synthetisiert und nach den üblichen Methoden auf Identität und Reinheit geprüft.

5.2.3.1.2 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die äußere Membran Biotransformationsstudien setzte sich aus 10 µl der jeweiligen DEAE-Fraktion, 100 pmol Cytochrom b_5 , 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 500 µM NADH, 500 µM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 5,9 zusammen.

Zunächst wurden die Enzyme bei 37 °C zwei Minuten vorinkubiert, dann das Benzamidoxim zugegeben und nach weiteren drei Minuten Vorinkubation die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 *g* trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

5.2.3.1.3 HPLC-Analytik

In Anlehnung an die von Friedrich [2003] entwickelte Methode wurde gebildetes Benzamidin mittels HPLC-Analytik bestimmt.

Der Eluent wurde durch einen Sartorius[®] Membranfilter (0,45 µm) per Vakuumfiltration von Partikeln befreit. Vor der Verwendung wurde der Eluent 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

HPLC-Pumpe und Controller: Waters 600 E Multisolvant Delivery System

Detektor: Waters 486 TAD UV

Autosampler: Waters 700 Satellite WISP

Integrator: EZChrom Client Chromatography Software Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA)

Stationäre Phase: LiChroCART 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher[®] 60 RP-select B (5 µm), Vorsäule RP-select B, 4x4 mm (Merck, Darmstadt)

Mobile Phase: 10 mM 1-Octylsulfonat in *Aq. bidest./Acetonitril* 82,5:17,5 (v/v) (pH-Wert nicht eingestellt)

Laufzeit: 28 min

Flussrate: 1 ml*min⁻¹

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: UV, 229 nm

Die Retentionszeiten lagen bei $8,0 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidoxim) und $24,2 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidin).

Die Kalibrierung zur Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Benzamidin erfolgte mit sieben verschiedenen Konzentrationen im Bereich 0-250 µM gelöst in Fließmittel und wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen. Für jede Konzentration wurden 2 Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt vermessen wurden. In diesem Bereich verlief die Kalibrierung linear mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,9998$. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde den Inkubationsansätzen die für die Kalibrierung verwendeten Benzamidin-Konzentrationen zugesetzt. In Abwesenheit des Cosubstrates NADH sowie nach Denaturierung der Proteinpräparation wurden die Proben analog zur Methode 5.2.3.1.2 vermessen. Für jede Konzentrationsstufe wurden 2 Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt vermessen wurden. Benzamidin konnte im angegebenen Konzentrationsbereich (bis 250 µM) quantifiziert werden. Die Wiederfindungsrate betrug 95 ± 5 %.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Gewinnung der Enzymfraktion

Die Gewinnung und Charakterisierung der Schweinenierenmitochondrien ist in Kapitel 3 beschrieben. Die Subfraktionierung mit Charakterisierung von Äußeren Membran Vesikeln ist in Kapitel 4 dargestellt.

Zur Isolierung der dritten Komponente wurde in dieser Arbeit eine chromatographische Auftrennung der Äußeren Membran Vesikel an einem Anionenaustauscher durchgeführt. Um membrangebundene Enzyme mittels Ionenchromatographie trennen zu können, ist eine Herauslösung aus der Membran notwendig (Kapitel 2.1.2). Die Solubilisation wurde mittels Zwittergent® 3-14 durchgeführt.

5.3.1.1 Solubilisation der Äußeren Membran Vesikel

Bei einem Protein-/Detergenzverhältnis von zwei mit Zwittergent® 3-14 lag eine effiziente Solubilisation vor (Daten nicht gezeigt). Dieses entsprach den Ergebnissen von Havemeyer [2006].

Die eingesetzte Detergenzkonzentration hatte keinen Einfluss auf die *N*-reduktive Aktivität. Selbst eine Verminderung der Proteinmenge bei konstanter Detergenzmenge hatte kaum einen inhibitorischen Effekt (unterhalb 5 %).

5.3.1.2 Anionenaustauschchromatographie an DEAE Cellulose

5.3.1.2.1 Protein-Verlaufskontrolle

Äußere Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien wurden nach der Methode von Havemeyer [2006] nach Solubilisation auf die Ionenaustausch-Säule aufgetragen.

Dabei wurde nicht bindendes Protein durch Spülen mit dem zweifachen Säulenvolumen mittels Äquilibrierpuffer eluiert. Die Fraktionen 8-19 bildeten hierbei die nichtbindende Fraktion. Dieses war durch den Absorptionsanstieg bei 280 nm zu verfolgen (Abb. 5.1). Anschließend wurde in einem linearen Gradienten mittels Gradientenmischer der Elutionspuffer zugemischt. Natriumchlorid konnte somit in der Konzentration von 0-1 M stetig zugefügt werden. Die Fraktionen 40-62 bildeten eine zweite Proteinfraction, welche an dem Säulenmaterial gebunden hatte. Die 4 ml

Fraktionen wurden aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Eine Minderung der enzymatischen Aktivität war nach dem Auftauen nicht festzustellen.

Die Elution der Proteine konnte durch die Messung bei 280 nm gut verfolgt werden.

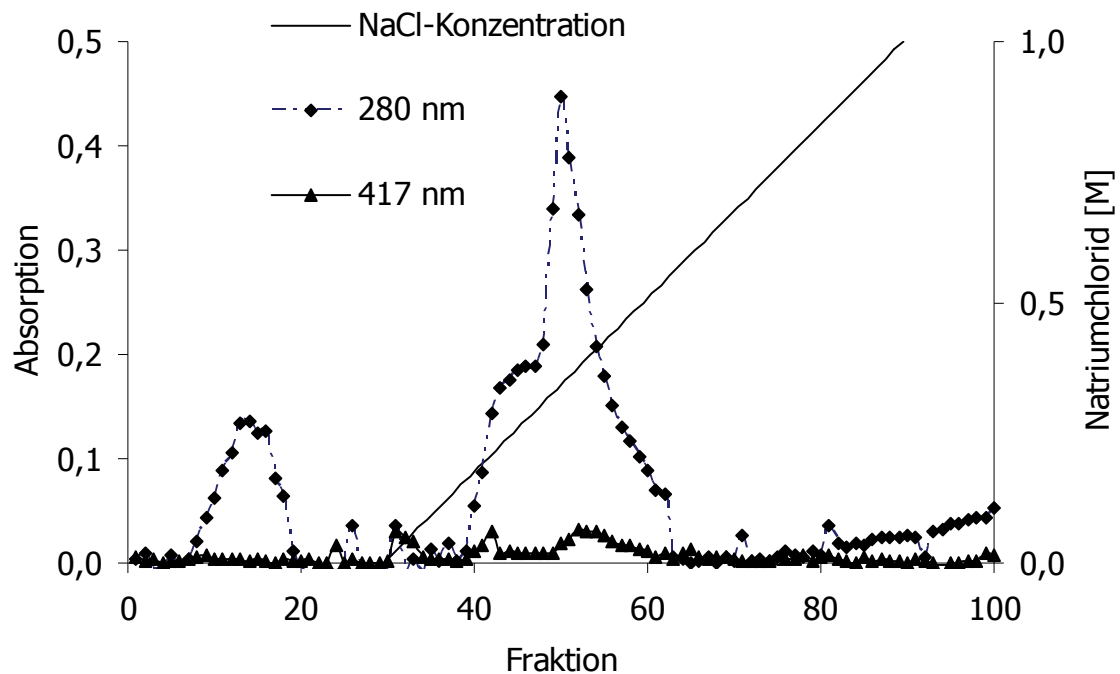


Abb. 5.1: Elutionsprofil der solubilisierten Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode.

5.3.1.2.2 Cytochrom b_5 -Verlaufskontrolle

Von jeweils 200 μl dithionitreduzierter Proteinlösung wurde ein Differenzspektrum aufgenommen und nach der in Kapitel 5.2.1.4.2.2 beschriebenen Methode ausgewertet [Estabrook und Werringloer, 1978]. Nur in den Fraktionen 53 bis 55 konnte Cytochrom b_5 detektiert werden (Abb. 5.2). Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Einzelmessungen.

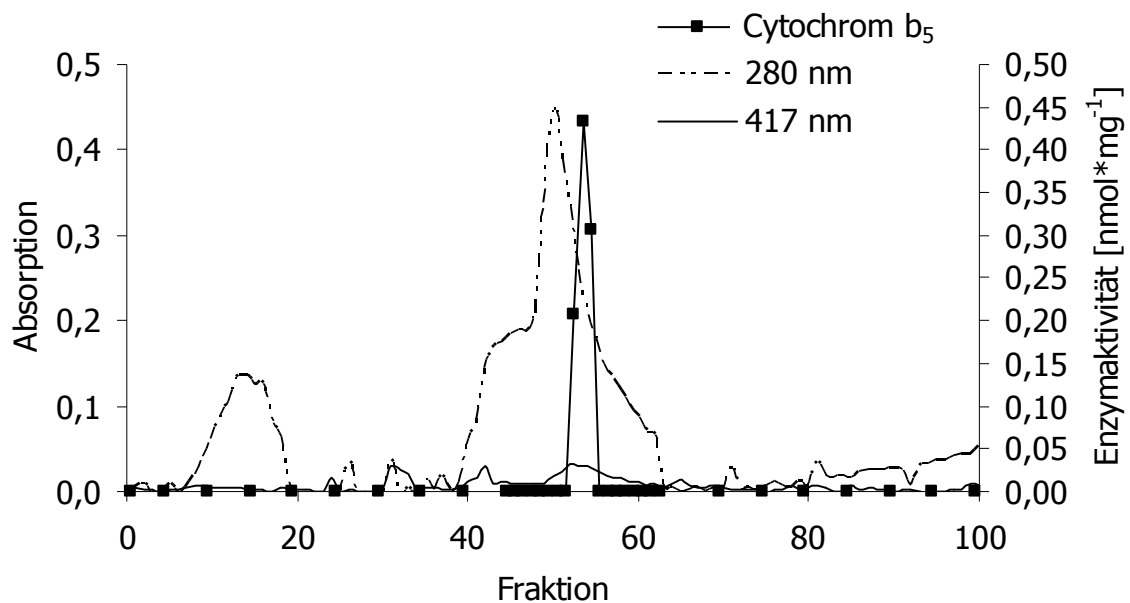


Abb. 5.2: Elutionsprofil von Cytochrom b_5 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode.

5.3.1.2.3 NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Verlaufskontrolle

Jeweils 50 μl der Fraktionen wurden auf NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivität hin untersucht und nach der in Kapitel 5.2.1.4.2.3 beschriebenen Methode ausgewertet [Mihara und Sato, 1978]. Vor allem in den Fraktionen 46-51 konnte NADH Cytochrom b_5 Reduktase detektiert werden (Abb. 5.3). Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Einzelmessungen.

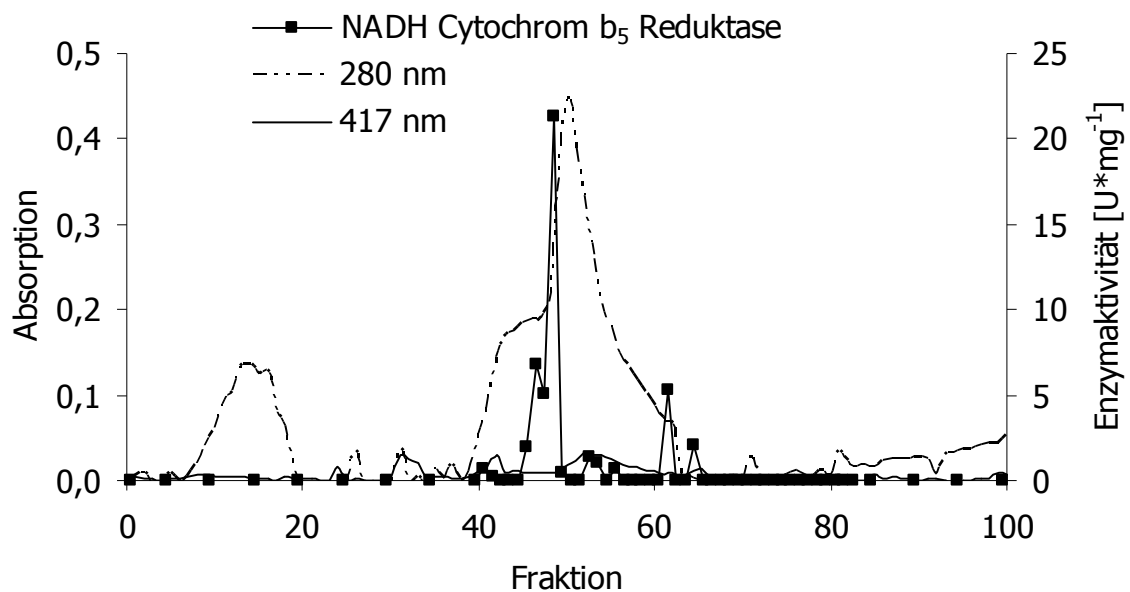


Abb. 5.3: Elutionsprofil der NADH Cytochrom b_5 Reduktase nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode.

5.3.1.2.4 Monoaminoxidase-Verlaufskontrolle

Jeweils 50 µl der Fraktionen wurden auf Monoaminoxidase-Aktivität hin untersucht und nach der in Kapitel 5.2.1.4.2.4 beschriebenen Methode ausgewertet [Kline *et al.*, 1986]. Vor allem in den Fraktionen 41-47 konnte Monoaminoxidase detektiert werden (Abb. 5.4). Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Einzelmessungen.

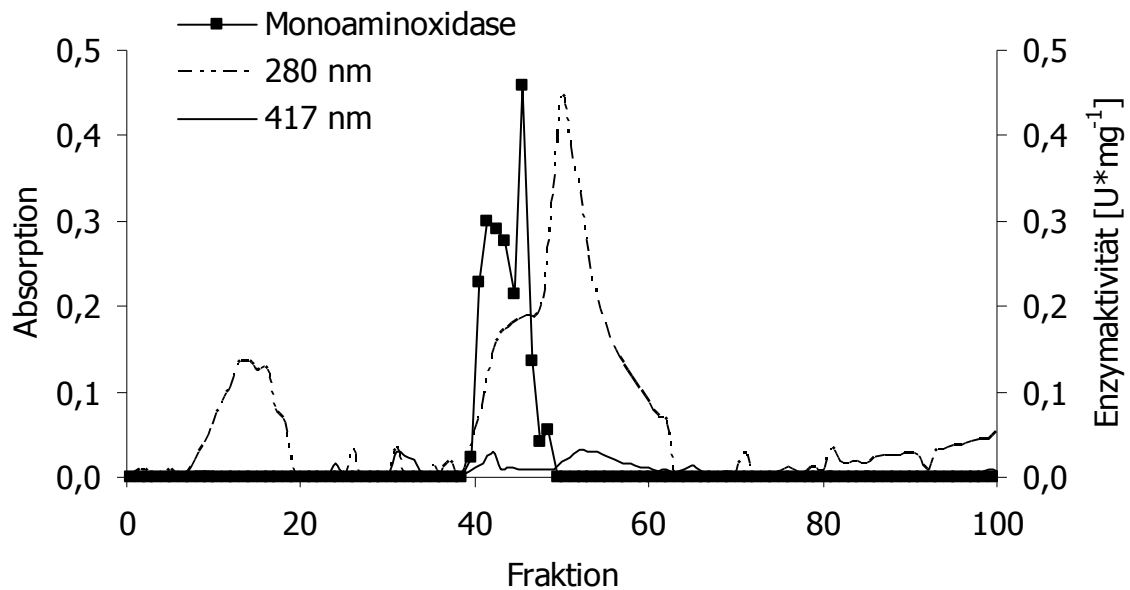


Abb. 5.4: Elutionsprofil der Monoaminoxidase nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode.

5.3.1.2.5 Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Verlaufskontrolle

Jeweils 50 µl der Fraktionen wurden auf Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivität hin untersucht und nach der in Kapitel 5.2.1.4.2.5 beschriebenen Methode ausgewertet [Kamin *et al.*, 1965]. Vor allem in den Fraktionen 7-14, 38-42 und 45-52 konnte Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase detektiert werden (Abb. 5.5). Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Einzelmessungen.

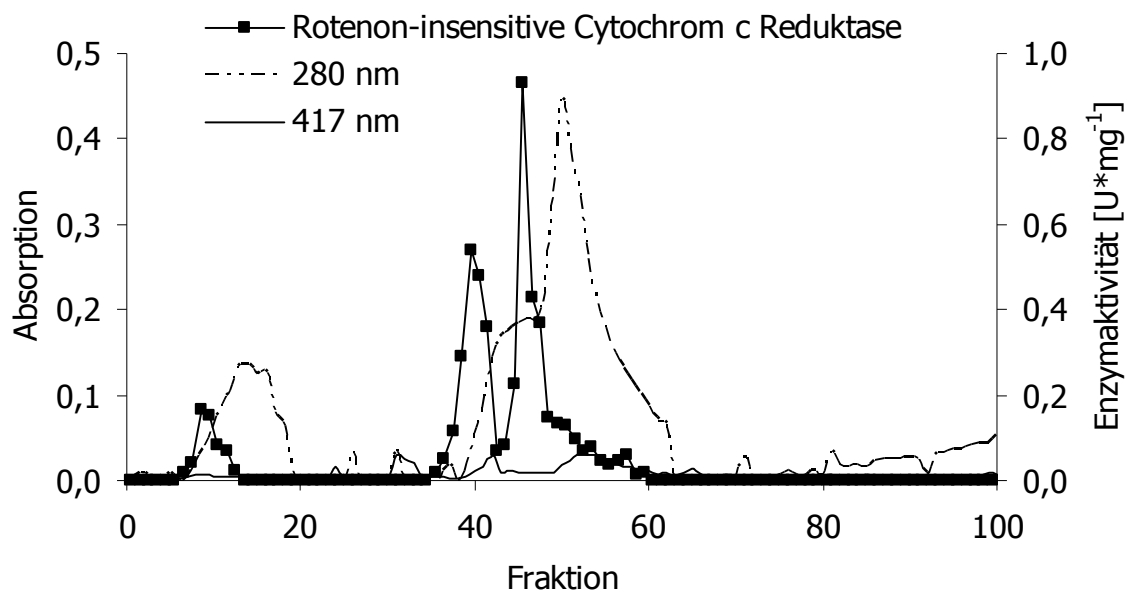


Abb. 5.5: Elutionsprofil der Rotenon-insensitiven Cytochrom c Reduktase nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode.

5.3.1.2.6 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle ohne zusätzliche Enzyme

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Ohne Zugabe weiterer Enzyme außer der jeweiligen DEAE-Fraktion wurde keine Aktivität in den Fraktionen gefunden (Daten nicht gezeigt).

5.3.1.2.7 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter NADH Cytochrom b_5 Reduktase

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Das rekonstituierte System bestand aus 10 μl der entsprechenden DEAE-Fraktion und 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. In den Fraktionen 12-13, 39-44 und 47-54 konnte Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität detektiert werden (Abb. 5.6). Der Proteingehalt der zugesetzten DEAE-Fraktion bildete die Grundlage zur Berechnung der Aktivität. Die Inkubationen sind stets Einzelinkubationen, die doppelt vermessen wurden.

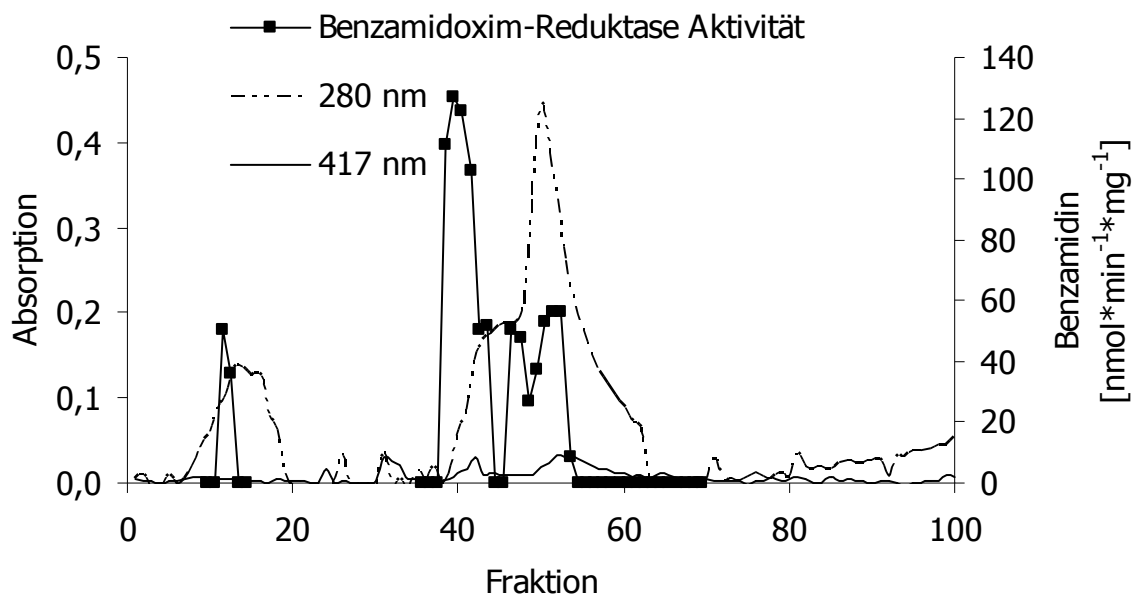


Abb. 5.6: Elutionsprofil der Benzamidoxim-Reduktase mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode. Die Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde.

5.3.1.2.8 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetztem humanem, rekombinantem Cytochrom b₅

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Das rekonstituierte System bestand aus 10 µl der entsprechenden DEAE-Fraktion und 100 pmol Cytochrom b₅. Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. In den Fraktionen 14-15 und 42-53 konnte Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität detektiert werden (Abb. 5.7). Der Proteingehalt der zugesetzten DEAE-Fraktion bildet die Grundlage zur Berechnung der Aktivität. Die Inkubationen sind stets Einzelinkubationen, die doppelt vermessen wurden.

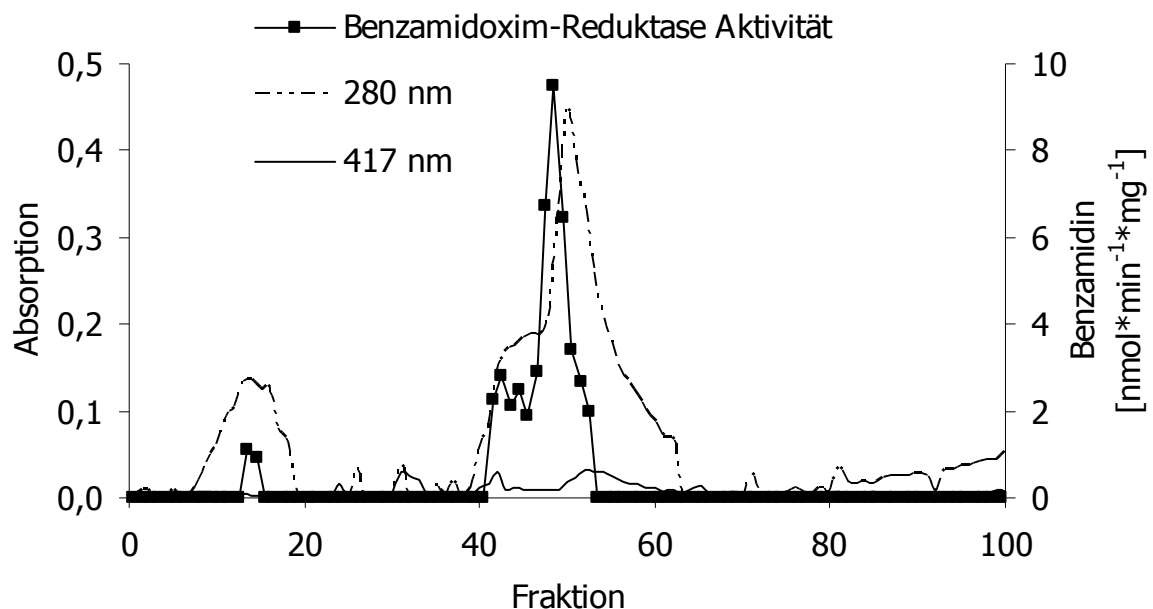


Abb. 5.7: Elutionsprofil der Benzamidoxim-Reduktase mit zugesetztem humanem rekombinantem Cytochrom b₅ nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode. Die Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde.

5.3.1.2.9 Benzamidoxim-Reduktase-Verlaufskontrolle mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase und zugesetztem humanem, rekombinatem Cytochrom b_5

Die *N*-reduktive Aktivität wurde über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Das rekonstituierte System bestand aus 10 μ l der entsprechenden DEAE-Fraktion, 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase und 100 pmol Cytochrom b_5 . Die weitere Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. In den Fraktionen 9-15 und 39-48 konnte Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität detektiert werden (Abb. 5.8). Der Proteingehalt der zugesetzten DEAE-Fraktion bildet die Grundlage zur Berechnung der Aktivität. Die Inkubationen sind stets Einzelinkubationen, die doppelt vermessen wurden.

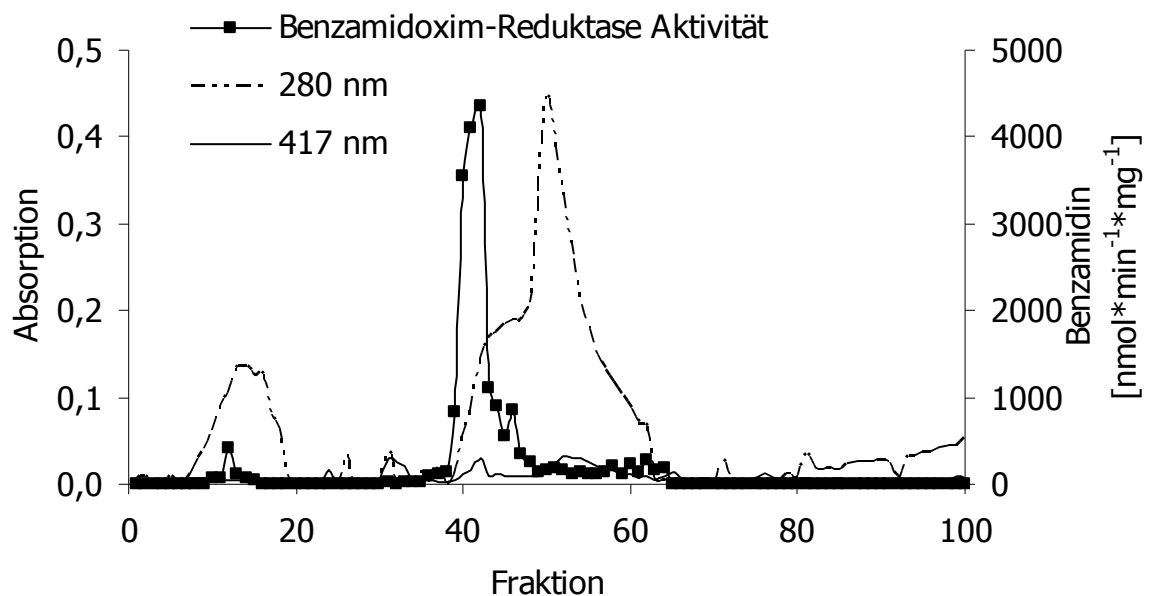


Abb. 5.8: Elutionsprofil der Benzamidoxim-Reduktase mit zugesetzter gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase und zugesetztem humanem rekombinatem Cytochrom b_5 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode. Die Durchführung der Inkubation sowie Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 5.2.3.1.2 angegeben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde.

5.3.1.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist als Proteinverlaufskontrolle durchgeführt worden. Hierbei konnte in den Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie eine deutlich geringere Zahl an Proteinspots gegenüber den Mitochondrien sowie den Äußeren Membran Vesikeln festgestellt werden. In Abbildung 5.9 sind die Fraktionen 37-49 dargestellt.

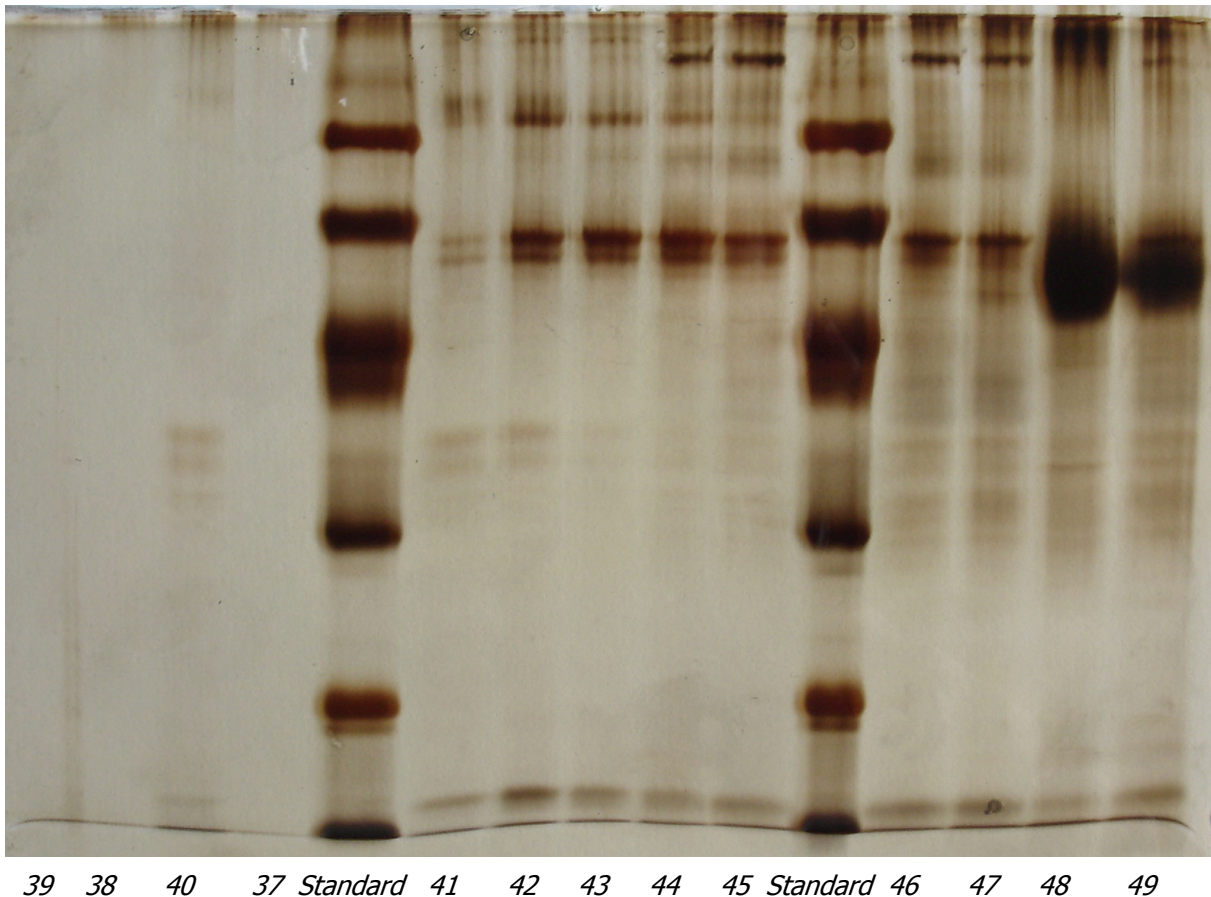
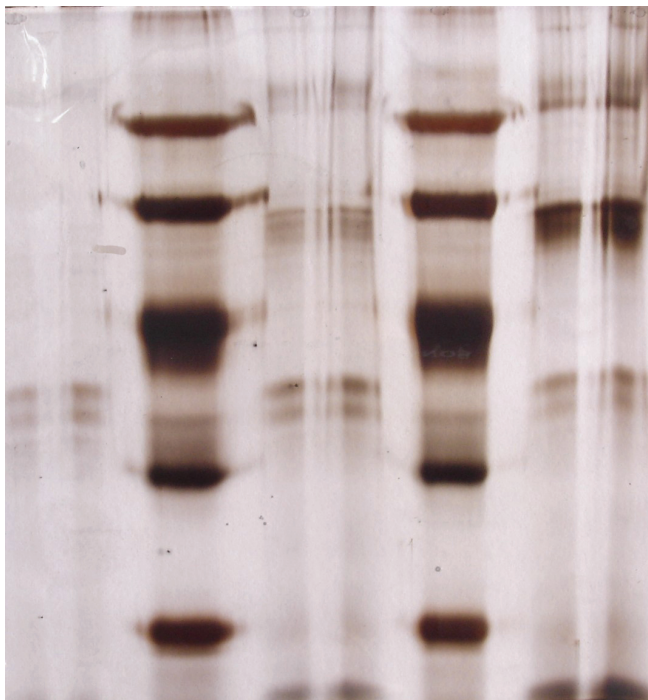


Abb. 5.9: *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-Profil der solubilisierten Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE.* Dargestellt sind die Fraktionen 37-49 sowie zwei Molekulargewichtstandards (97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4 kDa). Das Gel wurde nach der in Kapitel 5.2.2.6 beschriebenen Methode hergestellt sowie aufgearbeitet. Das Gel zeigt die detektierten Banden nach Silberfärbung. Aufgetragen wurden jeweils 0,5 µg der jeweiligen Fraktion.

Zur besseren Erkennbarkeit wurden die Fraktionen 40-42, welche in der Abbildung 5.8 die höchsten Benzamidoxim-Reduktase-Aktivitäten besaßen, in einem weiteren SDS-Gel aufgetragen (Abb. 5.10). Zu erkennen ist, dass die Fraktion 40 nur noch zwei detektierbare Banden im silbergefärbten Gel bei 35 kDa besitzt. Die Fraktionen

41 und 42 hingegen besitzen noch zusätzlich Banden bei 100 kDa, 60 kDa und 16 kDa. Die 35 kDa Doppelbande ist auch in diesen Fraktionen vorhanden.



40 40 Standard 41 41 Standard 42 42

Abb. 5.10: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der solubilisierten Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Die Fraktionen 40-42 sind jeweils doppelt sowie zwei Molekulargewichtstandards (97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4 kDa) dargestellt. Das Gel wurde nach der in Kapitel 5.2.2.6 beschriebenen Methode hergestellt sowie aufgearbeitet. Die detektierten Banden im Gel sind mit Silber angefärbt. Aufgetragen wurden jeweils 0,5 und 1,0 µg der jeweiligen Fraktion.

5.3.1.2.11 *nit-1* Rekonstitutions-Assay

Die *nit-1* Rekonstitutionsanalyse diente der Bestimmung der Molybdäncofaktor-Aktivität. Die Rekonstitution wurde mittels der Nitratreduktaseaktivität der *nit-1* Mutante (*Neurospora crassa*) [Nason *et al.*, 1971] bestimmt und freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Die Methode ist in Kapitel 5.2.2.9 beschrieben. In der *nit-1* Mutante wird kein Molybdäncofaktor gebildet. Deshalb kann die Nitratreduktaseaktivität nur durch extern zugegebenen Molybdäncofaktor rekonstituiert werden. Entstehendes Nitrit wird als Indikator über eine Azokupplung nachgewiesen. Nur in den Fraktionen 8-14 und 40-65 konnte eine *nit-1* Aktivität detektiert werden (Abb. 5.11). Dabei wurde in den Fraktionen 8-14

eine höhere Aktivität detektiert als in den Fraktionen 40-65. Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

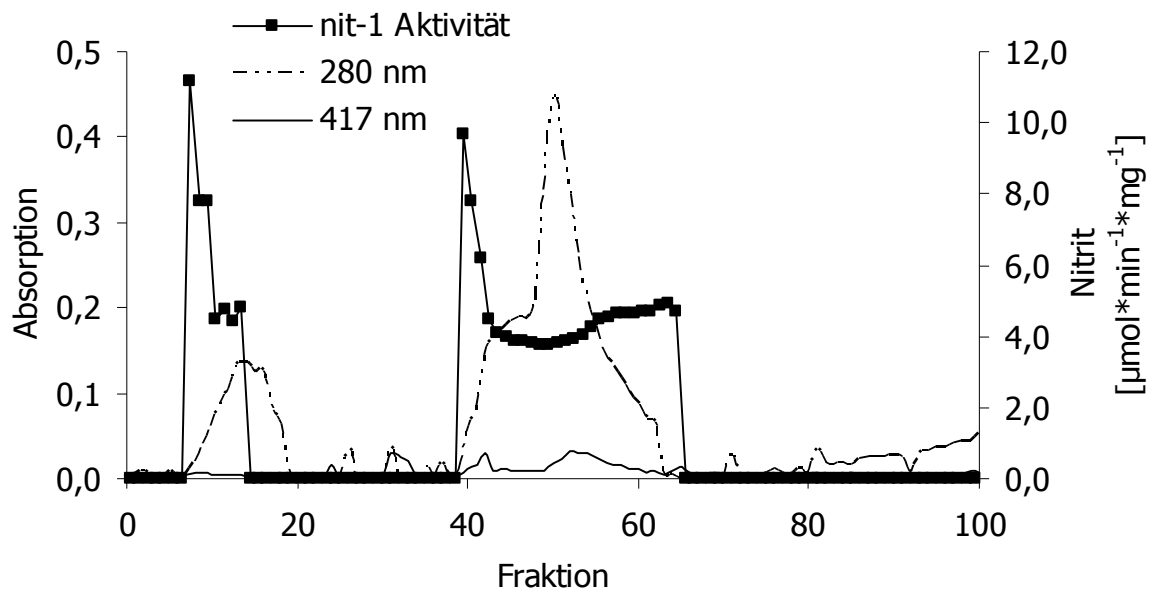


Abb. 5.11: Elutionsprofil der nit-1 Aktivität nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode.

Im Vergleich dazu sind in Tabelle 5.1 die *nit-1* Aktivitäten in Mitochondrien und der Äußeren Membran Vesikel dargestellt.

Tab. 5.1: nit-1 Aktivität von Schweinenierenmitochondrien, den daraus gewonnenen Äußeren Membran Vesikeln sowie Fraktion 41

Fraktion	<i>nit-1</i> Aktivität [Nitrit*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Anreicherungsfaktor
Mitochondrien	0,040	1
Äußere Membran Vesikel	0,177	4,4
Fraktion 41	1,767	44

Gebildetes Nitrit wurde über den gebildeten Azofarbstoff quantifiziert. Die ermittelten Daten sind Mittelwerte aus mindestens zwei Einzelmessungen.

5.3.1.2.12 Sulfitoxidase-Verlaufskontrolle

Die Messung der Sulfitoxidaseaktivität wurde nach der in Kapitel 5.2.2.9 beschriebenen Methode freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Vor allem in den Fraktionen 52-60 konnte Sulfitoxidase detektiert werden (Abb. 5.12). Die Enzymaktivität wurde auf den in den jeweiligen Fraktionen vorliegenden Proteingehalt bezogen. Die Messungen sind stets Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

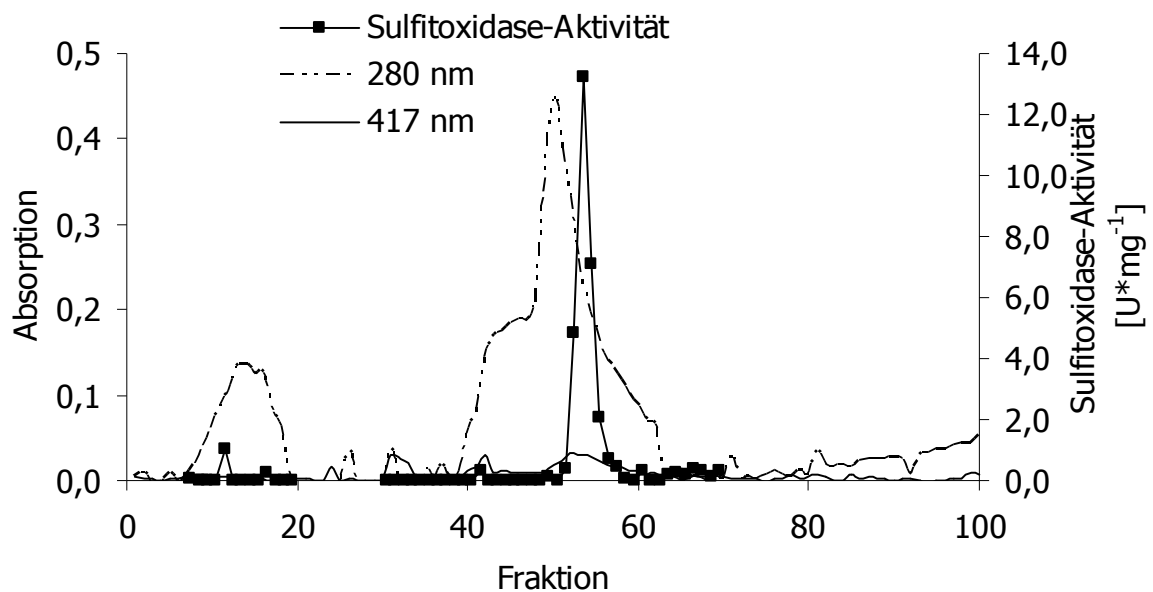


Abb. 5.12: Elutionsprofil der Sulfitoxidase-Aktivität der solubilisierten Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Äußere Membran Vesikel wurden nach der in Kapitel 5.2.1.4.1 beschriebenen Methode solubilisiert. Auftrag und Elution erfolgten nach der in Kapitel 5.2.1.4.2 beschriebenen Methode.

5.3.1.2.13 FormA Analyse

Die FormA Analyse wurde nach der in Kapitel 5.2.2.10 beschriebenen Methode freundlicherweise von Tanja Otte (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Hierbei wurden nicht alle Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie untersucht, sondern nur die besonders aktiven Fraktionen im *nit-1* Rekonstitutions-Assay. Zusätzlich wurden die Mitochondrien sowie Äußeren Membran Vesikel untersucht. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 5.2 dargestellt.

Tab. 5.2: FormA Analyse von Schweinenierenmitochondrien, den daraus gewonnenen Äußeren Membran Vesikeln sowie DEAE-Fractionen 8 und 41

Fraktion	FormA [pmol*mg ⁻¹]	Anreicherungsfaktor
Mitochondrien	684	1
Äußere Membran Vesikel	2103	3
Fraktion 8	4702	7
Fraktion 41	32380	47

Die ermittelten Daten sind Mittelwerte aus mindestens zwei Einzelmessungen.

5.3.1.2.14 Immunoblot-Analyse

Der gereinigte und gegen den rekombinanten C-Terminus der Mocosulfurase ABA3 aus *A. thaliana* gerichtete Antikörper erkannte spezifisch das identifizierte Enzym Moco Sulfurase C-Terminus domain containing 2 in den Fraktionen 9-12 sowie 41-47 (Abb. 5.13-14).

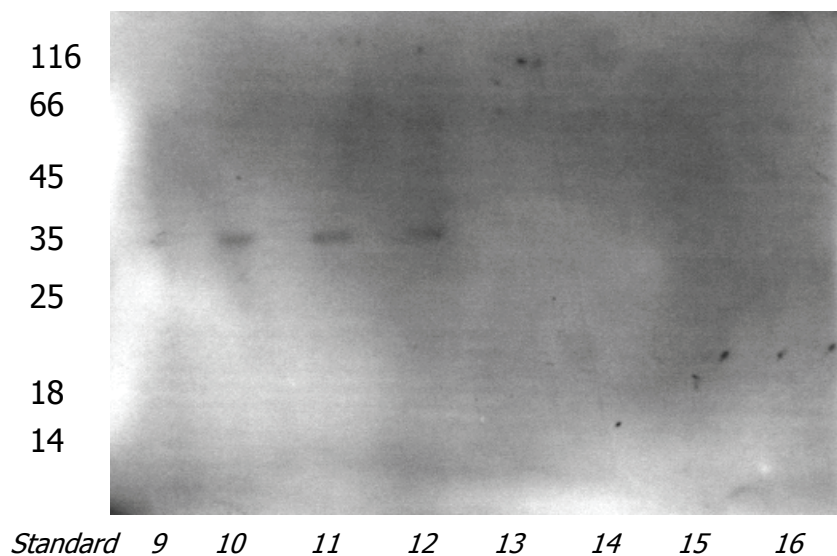


Abb. 5.13: Western Blot der solubilisierten Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Dargestellt sind die Fraktionen 9-16 sowie ein Molekulargewichtstandard (116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18 kDa, 14 kDa). Eine C-terminale Domäne der humanen Mocosulfurase (CT) als Positivkontrolle ist vorhanden, wurde jedoch wegen zu starker Färbung in dieser Abbildung nicht gezeigt.

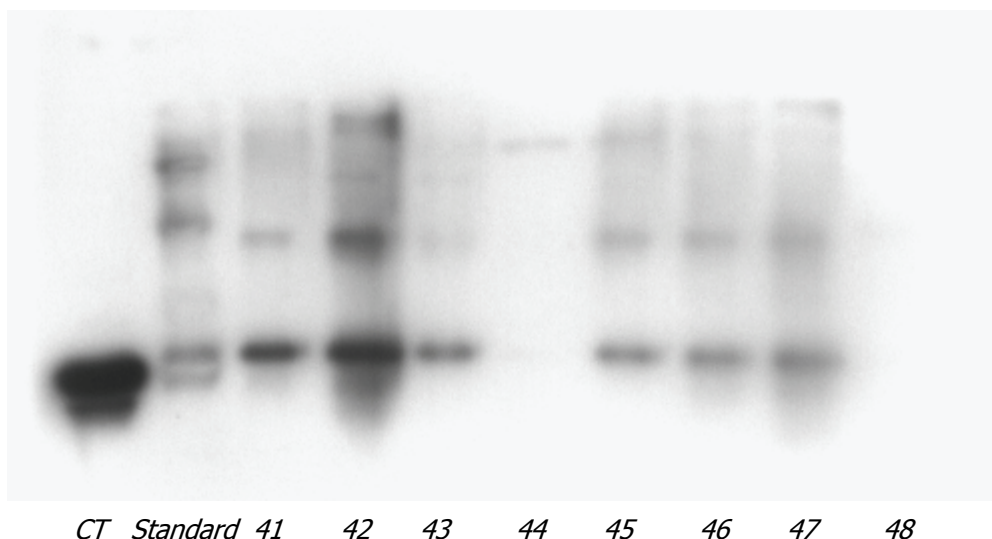


Abb. 5.14: Western Blot der solubilisierten Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE. Dargestellt sind die Fraktionen 41-48, ein Molekulargewichtstandards (116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa) und eine C-terminale Domäne der humanen Mocosulfurase (CT) als Positivkontrolle.

5.3.1.3 Charakterisierung der *N*-reduktiven Aktivität der Benzamidoxim-reduzierenden Proteinfraktion

Auf die Optimierung der Inkubationsbedingungen wurde zunächst verzichtet und anlehnend an die Inkubationsbedingungen von Havemeyer [2006], Clement *et al.* [1997] sowie Clement und Lopian [2003] mit kleinen Änderungen inkubiert. Im Zuge weiterer Untersuchungen wurde eine Optimierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 6.3.2 zu finden. Die nach der Methode von Havemeyer [2006] gewonnenen Fraktionen zur Reduktion von Benzamidoxim wurden nach der in Kapitel 5.2.3.1.2 beschriebenen Vorschrift inkubiert. Alle erhaltenen Ergebnisse wurden nach der in Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Ohne Zusatz der Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 oder NADH Cytochrom b_5 Reduktase war keine Reduktion detektierbar (Kapitel 5.3.1.2.6). Unter Zusatz von gereinigter NADH Cytochrom b_5 Reduktase konnten Umsetzungsraten im Bereich von bis zu $130 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ gebildetem Benzamidin erzielt werden (Abb. 5.6). Unter Zusatz von humanem rekombinantem Cytochrom b_5 wurden Umsetzungsraten von bis zu $10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ gebildetem Benzamidin erreicht (Abb. 5.7). Das fehlende Volumen in den Inkubationsansätzen durch nicht zugesetzte Enzyme wurde jeweils durch Kaliumphosphatpuffer ergänzt.

Bei Zusatz der beiden Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase konnten unter den gewählten Bedingungen Umsatzraten im Bereich von etwa $4500 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ gebildetem Benzamidin erreicht werden (Abb. 5.8).

In Tabelle 5.3 sind die erhaltenen Daten nochmals als Übersicht für die Fraktion 41 dargestellt.

Tab. 5.3: N-reduktive Aktivität der Benzamidoxim-reduzierenden Proteinfraktion unter Variation der Enzyme

Inkubationsansatz der Fraktion 41	N-reduktive Aktivität [nmol Benzamidin \cdot min $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$]
ohne zugesetzte Enzyme	nicht detektierbar
nur NADH Cytochrom b_5 Reduktase zugesetzt	122,1 \pm 0,1
nur Cytochrom b_5 zugesetzt	2,1 \pm 0,2
Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase zugesetzt	4106,2 \pm 58,3

Der Inkubationsansatz setzte sich aus 10 μ l Fraktion 41 (0,49 μ g Protein), 1000 μ M NADH, 500 μ M Benzamidoxim in 150 μ l eines 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5,9 zusammen. Die zusätzlichen Enzyme wurden in folgenden Mengen zugesetzt: 50 pmol Cytochrom b_5 und 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase. Die Inkubation wurde nach der in Kapitel 5.2.3.1.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Gebildetes Benzamidin wurde mit der in Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde.

Zusätzlich wurden noch einzelne Komponenten des Inkubationsansatzes weggelassen um weitere Abhängigkeiten darzustellen (Tab. 5.4).

Tab. 5.4: N-reduktive Aktivität der Benzamidoxim-reduzierenden Proteinfraktion unter Variation des Inkubationsansatzes

Inkubationsansatz	N-reduktive Aktivität [nmol Benzamidin*min ⁻¹ *mg ⁻¹]
ohne Fraktion 41	2,6 ± 0,6
ohne NADH	nicht detektierbar

Der Inkubationsansatz setzte sich aus 50 pmol Cytochrom *b₅* und 0,05 U NADH Cytochrom *b₅* Reduktase, 500 µM Benzamidoxim in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5,9 zusammen. Zusätzlich wurden im ersten Ansatz 1000 µM NADH und im zweiten Ansatz 10 µl Fraktion 41 (0,49 µg Protein) zugegeben. Die Inkubation wurde nach der in Kapitel 5.2.3.1.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Gebildetes Benzamidin wurde mit der in Kapitel 5.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde.

In Tabelle 5.5 sind die N-reduktiven Aktivitäten und der Anreicherungsfaktor für die Benzamidoximreduktion in Mitochondrien, den Äußeren Membran Vesikeln sowie der Fraktion 41 dargestellt.

Tab. 5.5: Spezifische Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität von Schweinenieren-mitochondrien, den daraus gewonnenen Äußeren Membran Vesikeln sowie Fraktion 41

Fraktion	N-reduktive Aktivität [nmol Benzamidin*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Anreicherungsfaktor
Mitochondrien	17	1
Äußere Membran Vesikel	180	11
Fraktion 41	4106	242

Die N-reduktive Aktivität der Mitochondrien ist ein Mittelwert aus den Aktivitätsbestimmungen von fünf Mitochondrienchargen. Die N-reduktive Aktivität der Äußeren Membran Vesikel ist ein Mittelwert aus den Aktivitätsbestimmungen von vier Äußeren Membran Vesikel Chargen. Beide dargestellten Aktivitäten beziehen sich auf das eingesetzte Gesamtprotein. Die N-reduktive Aktivität der Fraktion 41 ist eine Einzelbestimmung. Die dargestellte Aktivität bezieht sich auf die eingesetzte Proteinmenge der Fraktion 41.

5.3.1.4 Massenspektrometrische Analyse

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden (Fraktion 40-42) wurden ausgeschnitten und der ESI-Analyse zugeführt. Die Proben wurden über Nacht durch Trypsin hydrolysiert. Nach Einstellen eines sauren pH-Wertes wurden die Peptide des

Hydrolyse-Überstandes per nano-HPLC getrennt und mit ESI in der Q-TOF MS/MS analysiert. Zuvor wurde das Massenspektrometer mit Renin kalibriert.

Die so erhaltenen Peptidfragmente wurden mit Fragmenten einer elektronischen Datenbank verglichen. Dabei wurden die in Tabelle 5.6 aufgeführten Enzyme mit hoher Wahrscheinlichkeit zugeordnet.

Tab. 5.6: Sequenzanalyse der Proteinbanden aus Fraktion 41 und 42

100 kDa Bande
Dipeptidylpeptidase IV
60 kDa Doppel-Bande
Monoaminoxidase B
Monoaminoxidase A
35 kDa Doppel-Bande
MOCO Sulfurase C-terminal domain containing 2
Hypothetisches Protein
16 kDa Bande
Hypothetisches Protein LOC531444

Wie in Abbildung 5.10 ersichtlich ist, war in Fraktion 40 lediglich die 35 kDa Doppelbande zu sehen. In den Fraktionen 41 und 42 konnten zusätzlich noch die in Tabelle 5.6 aufgeführten Banden detektiert werden. Da die Fraktionen 40-42 aber etwa vergleichbare Aktivitäten in ihren Benzamidoxim-reduzierenden Eigenschaften besaßen (Abb. 5.8), konnte die Aktivitätssteigerung gegenüber dem Inkubationsansatz ohne der zugesetzten 3. Komponente nur auf die detektierte 35 kDa Doppelbande zurückgeführt werden.

Die Anreicherung der Dipeptidylpeptidase IV war in Abbildung 5.9 gut sichtbar. Die stärkste Detektion fand in den Fraktionen 42-44 statt, korrelierte jedoch nicht mit den Benzamidoxim-reduzierenden Fraktionen (Abb. 5.8). Dieses Protein konnte somit als verantwortliches Enzym ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für die Monoaminoxidase sowie für das hypothetische Protein der 16 kDa Bande.

Die beiden aus der 35 kDa Doppelbande detektierten Enzyme waren auf Grund eines Sequenz-Alignments als identische Enzyme anzusehen. In beiden Fällen ist es als MOCO Sulfurase C-terminal domain containing 2 erkannt worden.

5.4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Übertragbarkeit der Methode zur Gewinnung und Identifizierung der dritten Komponente [Havemeyer, 2006] auf Schweinenierenmitochondrien kontrolliert, getestet und gegebenenfalls modifiziert werden. Im Weiteren sollte die gewonnene Enzymfraktion für die *in vitro* Studien charakterisiert werden. Immunoblot-Analysen sowie massenspektrometrische Analysen sollten zur Identifizierung der dritten Komponente herangezogen werden.

Die Gewinnung der Schweinenierenmitochondrien wurde in Kapitel 3 dieser Arbeit beschrieben und diskutiert. Die Subfraktionierung dieser Mitochondrien führte zur gezielten Gewinnung der Äußeren Membran Vesikel der Mitochondrien (Kapitel 4). Wie schon Havemeyer [2006] beschrieb, war in diesem Schritt mit großen Ausbeuteverlusten zu rechnen. Dieses wurde auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt (Daten nicht gezeigt). Dem gegenüber stand allerdings der hohe Anreicherungsfaktor der Benzamidoxim-Reduktase Aktivität (Tab. 5.5). Die Lagerungsfähigkeit der Äußeren Membran Vesikel bei -80 °C ohne Verlust der Aktivität wurde von Havemeyer [2006] beschrieben. Durch mehrmaliges Gewinnen dieser Äußeren Membran Vesikel konnte die erforderliche Proteinmenge gewonnen werden, die zur weiteren Anreicherung des gesuchten Enzyms benötigt wurde.

Da das gesuchte Enzymsystem in der äußeren Membran verankert ist, mussten für die weitere Arbeit diese membrangebundenen Enzyme solubilisiert werden. In umfangreichen Untersuchungen konnte Havemeyer [2006] das Sulfobetainderivat Zwittergent[®] 3-14 als das am besten geeignete Detergenz für diesen Arbeitsschritt zeigen. Dabei optimierte sie sowohl die zu verwendende Detergenzmenge als auch das Verhältnis zwischen Protein und Detergenz. Diese Daten konnten zur Solubilisation der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien übernommen werden. Es wurde auch in dieser Arbeit eine effektive Extraktion der Enzyme aus der Membran erreicht, wobei Zwittergent[®] 3-14 in der eingesetzten Konzentration keinen störenden Einfluss auf die *N*-reduktive Aktivität ausübte (Daten nicht gezeigt). Dieses lässt sich am ehesten mit der Struktur des Detergenzes erklären. Der zwitterionische, amphiphile Aufbau ähnelt dem des Phosphatidylcholins und Lecithins [Gonenne und Ernst, 1978] und imitiert somit die natürlich vorkommende Membran am ehesten.

Im nächsten Schritt wurde eine säulenchromatographische Auftrennung des Solubilisats an dem Anionenaustauschmaterial DEAE durchgeführt. Wie schon in Kapitel 2.1.2 beschrieben, gehört die Ionenaustauschchromatographie zu den wichtigsten Methoden der Proteinreinigung und -gewinnung [Pingoud und Urbanke, 1997].

Bei einem physiologischen pH-Wert konnte die Bindung der für die *N*-reduktive Aktivität verantwortlichen Enzyme erreicht werden. Eine Verlaufskontrolle der eluierten Enzyme wurde bei 280 nm sowie 417 nm durchgeführt (Abb. 5.1). Die Fraktionen 8-19 stellten dabei eine nichtbindende Fraktion dar. Zur Elution der bindenden Enzyme wurde ab Fraktion 31 ein linearer Natriumchloridgradient angeschlossen, der die bindenden Enzyme sukzessive vom Säulenmaterial durch Verdrängung von den Bindungsstellen eluierte (Abb. 5.1). In den Fraktionen 39-62 konnte bei den gemessenen Wellenlängen Protein unterschiedlicher Menge detektiert werden. Der Verlauf der Messung bei 280 nm sowie die nachgewiesene Proteinmenge korrelierten dabei (Daten nicht gezeigt).

Der Elutionsverlauf des Enzyms Cytochrom b_5 ist in Abbildung 5.2 gezeigt. Dabei konnte lediglich in den Fraktionen 53 bis 55 das Enzym detektiert werden. Zur Bestimmung wurde die unverdünnte Pufferlösung eingesetzt. Der positive Nachweis korreliert dabei mit der 417 nm Detektion (Abb. 5.2), da Cytochrom b_5 ein hämhaltiges Enzym ist (Kapitel 6.1.1).

Als weiteres an der Reduktion beteiligtes Enzym wurde der Elutionsverlauf der NADH Cytochrom b_5 Reduktase kontrolliert (Abb. 5.3). In den Fraktionen 46-51 konnte das Enzym nach der Methode von Mihara und Sato [1978] detektiert werden. Damit trennten sich die beiden beteiligten Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase mittels der säulenchromatographischen Auftrennung voneinander ab.

Zusätzlich wurden die in der bisherigen Reinigung bestimmten Markerenzyme der äußeren mitochondrialen Membran, Monoaminoxidase und Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase, im Elutionsprofil bestimmt (Abb. 5.4 und 5.5). Während die Monoaminoxidase konzentriert in den Fraktionen 41-47 bestimmbar war, verteilte sich die Rotenon-insensitive Cytochrom c Reduktase über die Fraktionen 7-14, 38-42 und 45-52. Der positive Nachweis der Proteine bestätigt die bisherigen Ergebnisse (Kapitel 4.3.1.2.2 und 4.3.1.2.3).

Die Verwendung des Detergenzes Zwittergent® 3-14 ermöglichte eine direkte Testung auf die *N*-reduktive Aktivität der Fraktionen ohne aufwändige Detergenzentfernung [Clement *et al.*, 1997]. Die Inkubation der einzelnen Fraktionen im Standardinkubationsansatz (Kapitel 5.2.3.1.2) ohne Zusatz anderer Enzyme zeigte in keiner Fraktion eine *N*-reduktive Aktivität (Kapitel 5.3.1.2.6).

Nach Zusatz der aus Schweinelebermikrosomen gereinigten NADH Cytochrom b_5 Reduktase konnten in den Fraktionen 12-13, 39-44 und 47-54 eine benzamidoximreduzierende Aktivität festgestellt werden (Abb. 5.6). Wurde im Gegenzug rekombinant gewonnenes humanes Cytochrom b_5 eingesetzt, so konnte in den Fraktionen 14-15 und 42-53 benzamidoximreduzierende Aktivität detektiert werden (Abb. 5.7). Diese Aktivität lag aber im Vergleich zur zugesetzten NADH Cytochrom b_5 Reduktase bei nur etwa 8 %.

Nach Zugabe beider Elektronentransportproteine zu den Fraktionen der DEAE-Säule konnte in den Fraktionen 10-15 und 39-48 eine Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität detektiert werden (Abb. 5.8). Hierbei waren vor allem die Fraktionen 40-42 hoch aktiv. Die Fraktionen 49-54 zeigten zwar auch noch reduktive Eigenschaften, doch war diese im Vergleich zu den anderen Fraktionen sehr gering. Sie korrelierten mit den Aktivitäten, die die NADH Cytochrom b_5 Reduktase auch allein erzielen konnte (Abb. 5.6).

Die Fraktionen 40-42 wurden bei etwa 0,2 M Natriumchlorid von der Säule eluiert und stimmen damit mit den aus der Leber gewonnenen Daten überein [Havemeyer, 2006]. Diese Fraktionen waren frei von Cytochrom b_5 (Abb. 5.2) und der NADH Cytochrom b_5 Reduktase (Abb. 5.3).

Eine zweite Benzamidoxim-reduktaseaktive Fraktion wurde in dem nichtgebundenen Anteil (Fraktion 10-15) gefunden, doch war die Aktivität hier wesentlich geringer als in den Fraktionen 40-42 (Abb. 5.8). Havemeyer [2006] konnte mit höherem Salzgradienten eine weitere aktive Fraktion zur Reduktion von Benzamidoxim von der Säule eluieren. Eine solche Fraktion war in der Auftrennung der Äußeren Membran Vesikel aus Schweinenierenmitochondrien nicht zu detektieren und zeigt somit einen klaren Unterschied zur Enzymgewinnung aus der Leber. Hiermit lässt sich auch erklären, warum Havemeyer [2006] mit Kaliumcyanid eine Aktivierung der Benzamidoxim-Reduktase in ihren Äußeren Membran Vesikeln erzielen konnte, während der Effekt bei den Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinenierenmitochondrien (Abb. 4.7) ausblieb. Havemeyer [2006] vermutete eine weitere, durch Kaliumcyanid aktivierbare, benzamidoximreduzierende Komponente in den Äußeren Membran Vesikeln aus Schweinelebermitochondrien, die aber in der Niere nicht entdeckt werden konnte. Da alle Fraktionen der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, dem *nit-1* Rekonstitutions-Assay sowie der

Immunoblot-Analyse unterzogen werden sollten, wurden keine Fraktionen gepoolt, sondern getrennt voneinander aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Die Abbildung 5.10 zeigt die drei aktiven, elektrophoretisch reinen Fraktionen 40-42. Der Aufreinigungsfaktor, ausgehend von den Mitochondrien bis zum rekonstituierten System mit diesen hochreinen Fraktionen betrug 242 (Tab. 5.5). Um zu der hochreinen Fraktion zu gelangen, mussten Nierenmitochondrien gewonnen werden. Diese stellten einen Pool aus acht Nieren dar. Im nächsten Schritt wurden die Äußeren Membran Vesikel aus dem Mitochondrienpool gewonnen. Um genügend Ausgangsmaterial zur Durchführung der Anionenaustauschchromatographie zu haben, wurden mehrere Äußere Membran Vesikel-Chargen wiederum gepoolt. Somit ist der Aufreinigungsfaktor auf Mittelwerte der jeweils gewonnenen Chargen bezogen und nicht individuell auf eine einzelne Niere zurückzuführen.

Die Kontrollinkubationen mit der zugesetzten, aus Schweineleber gewonnenen NADH Cytochrom b_5 Reduktase, zeigten für die Fraktionen 40-42 eine Aktivität von etwa 120 nmol Benzamidin*min⁻¹*mg⁻¹. Bei Zusatz beider Elektronentransportproteine wurden etwa 4100 nmol Benzamidin*min⁻¹*mg⁻¹ erreicht (Tab. 5.3). Die etwa 3 %ige Benzamidoxim-Reduktase-Eigenaktivität der gereinigten NADH Cytochrom b_5 Reduktase ist vermutlich auf eine Kontamination dieses Enzyms mit Cytochrom b_5 zurückzuführen, denn die Umsetzungsraten bei Zusatz beider Enzyme zeigten deutlich, dass nur im Dreikomponentensystem maximale Umsetzungsraten erzielt werden konnten. Havemeyer [2006] konnte zudem mit rekombinanter humaner NADH Cytochrom b_5 Reduktase zeigen, dass hiermit allein keine Umsetzung erzielt werden konnte, sondern der Zusatz von Cytochrom b_5 benötigt wurde.

Da die Fraktionen 40-42 nur durch Zusatz von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase ihre maximale Reduktionsrate erreichten, bestätigten sich die bisher beschriebenen Ergebnisse über *N*-reduktive membrangebundene Enzymsysteme [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Havemeyer, 2006], nach welchen es sich hierbei um ein Dreikomponentensystem handelt.

Das SDS-Gel der Fraktionen 37-49 (Abb. 5.9) zeigt die Aufreinigung der Proteine. Da die Fraktionen 40-42 besonders aktiv waren, wurden diese in Abb. 5.10 nochmals dargestellt. Die Fraktionen wurden jeweils doppelt mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen aufgetragen. In der zunächst angefertigten Coomassie-Blau-Färbung konnte keine Bande sichtbar gemacht werden. Erst die sich anschließende Silberfärbung ergab das abgebildete Foto. In Fraktion 40 war lediglich die 35 kDa Doppelbande zu erkennen, während in den Fraktionen 41 und 42 noch zusätzliche Proteine auftraten. Die in Fraktion 41 gefärbten Banden wurden der

massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.6 dargestellt.

Die bei etwa 100 kDa auftretende Proteinbande detektierte mit hoher Wahrscheinlichkeit die Dipeptidylpeptidase IV. In Abbildung 5.9 ist gut sichtbar, dass die stärkste Detektion in den Fraktionen 42-44 stattfand und stimmt somit nicht mit den Benzamidoxim-reduzierenden Fraktionen überein (Abb. 5.8).

Die Dipeptidylpeptidase IV ist eine ubiquitäre und multifunktionelle, prolinspezifische Serinprotease. Im Blut ist sie für die Inaktivierung der gastrointestinalen Peptidhormone GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) und GIP (gastric inhibitory polypeptide) verantwortlich. Beide Hormone stimulieren in strikter Abhängigkeit von der Blutglukosekonzentration die Insulinausschüttung aus dem Pankreas. Da der Proteinverlauf nicht mit der Benzamidoxim-Reduktase übereinstimmte, wurde dieses Enzym als das verantwortliche ausgeschlossen.

Havemeyer [2006] hatte ebenfalls in ihrer Fraktion Monoaminoxidase detektieren können. Durch Inkubation mit rekombinanter Monoaminoxidase bzw. zur Benzamidoximreduktion zugesetzte Monoaminoxidase-Inhibitoren konnte sie die Beteiligung allerdings ausschließen.

Über das hypothetische Protein in der 16 kDa Bande sind bisher kaum Daten vorhanden. Es handelt sich dabei um ein in Mitochondrien des Rinderhirns entdecktes Enzym, welches am Fettsäure-Stoffwechsel beteiligt sein soll [Colca *et al.*, 2004]. Reaktionsmechanismen oder spezielle Funktionen sind von diesem Enzym noch nicht bekannt.

Wie in Abbildung 5.10 ersichtlich, ist in Fraktion 40 lediglich die 35 kDa Doppelbande zu sehen. In Fraktion 41 und 42 konnten zusätzlich noch die in Tabelle 5.6 aufgeführten Banden detektiert werden. Da die Fraktionen 40-42 aber etwa vergleichbare Aktivitäten in ihrer Benzamidoxim-reduzierenden Eigenschaft besaßen (Abb. 5.8), konnte die Aktivitätssteigerung gegenüber dem Inkubationsansatz ohne die zugesetzte 3. Komponente nur auf die detektierte 35 kDa Doppelbande zurückgeführt werden.

Die Aminosäuresequenz des hypothetischen Proteins der 35 kDa Doppelbande ist theoretisch berechnet. Im Sequenz-Alignment ergab es eine hohe Homologie zu MOCO Sulfurase C-terminal domain containing 2, so dass es sich hierbei wahrscheinlich um das gleiche Protein handelt (Daten nicht gezeigt). Die gefundenen Teilsequenzen sind identisch mit dem menschlichen und dem homologen hypothetischen Enzym aus dem Affen. Da das Genom des Schweins noch nicht vollständig bekannt ist, jedoch in vielen Fällen hohe Homologien zum Menschen

vorhanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um ein identisches Enzym handelt.

Dieses Ergebnis ist identisch mit dem von Havemeyer [2006] detektierten Ergebnis in der Schweineleber. Sie hatte hierzu Inkubationen mit dem rekombinanten C-Terminus der humanen und pflanzlichen (*A. thaliana*) Mocosulfurase zur Reduktion von Benzamidoxim durchgeführt. Beide rekombinanten Enzyme waren in der Lage, Benzamidoxim zum korrespondierenden Benzamidin zu reduzieren.

Damit konnte erstmalig die Expression dieses Enzyms in Nierenzellen von Säugetieren nachgewiesen werden.

Im *nit-1* Rekonstitutions-Assay konnte der Molybdäncofaktor nachgewiesen werden (Abb. 5.11). Dabei wurde in den Fraktionen 8-14 und 40-65 eine *nit-1* Aktivität detektiert. Die hohe Aktivität der Fraktionen 8-14 korrelierte aber nicht mit der Aktivität der Benzamidoxim-Reduktase. Die Fraktionen 40-44 zeigten wiederum starke *nit-1* Aktivität, welche mit der Benzamidoxim-Reduktase übereinstimmt. In weiteren Fraktionen korrelierte der Molybdäncofaktornachweis nicht mehr mit der Reduktaseaktivität.

Die nicht vorhandene Aktivität in den Fraktionen 8-14 bei gleichzeitiger Aktivität der Fraktionen 40-44 lässt sich mit dem Vorkommen des Molybdäncofaktors in zwei unterschiedlichen Subtypen erklären (Abb. 6.2). Es ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt, welcher Subtyp für die Benzamidoxim-Reduktase Aktivität verantwortlich ist. So kann in den Fraktionen 8-14 der eine Molybdäncofaktorsubtyp eluiert worden sein, der für die *N*-Reduktivität nicht verantwortlich ist, und in den Fraktionen 40-44 ein anderer Molybdäncofaktorsubtyp, der Benzamidoxim zu Benzamidin reduziert. Gegenstand zukünftiger Arbeiten sollte sein, diesen Mechanismus aufzuklären.

Die nachgewiesene Molybdäncofaktor-Aktivität in den Fraktionen 40-65 konnte teilweise mit der Benzamidoxim-Reduktase korreliert werden. Ab Fraktion 49 stieg allerdings die nachgewiesene Menge an Molybdäncofaktor-Aktivität wieder an. Mit diesem Anstieg ist auch Sulfitoxidase im erhöhten Maße nachweisbar (Abb. 5.12). Die tierische Sulfitoxidase ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert (Kapitel 6.1.4). Es handelt sich um ein Molybdoenzym, welches in seiner C-terminalen Domäne den Molybdäncofaktor bindet und in der N-terminalen Domäne Cytochrom b_5 trägt. Somit ist der positive *nit-1* Nachweis verständlich. Zudem kann damit die Sulfitoxidase als verantwortliches Molybdoenzym ausgeschlossen werden, da die nachgewiesene Sulfitoxidase-Aktivität in den Fraktionen 52-60 nicht mit den Fraktionen 40-42 übereinstimmt, in denen die Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität

hauptsächlich nachgewiesen wurde. Außerdem korreliert der positive Nachweis der Sulfitoxidase mit dem Nachweis des Cytochrom b_5 (Abb. 5.2). Da die Sulfitoxidase Cytochrom b_5 am N-terminalen Ende gebunden hat, ergänzen sich diese Ergebnisse. Die mitochondriale Sulfitoxidase wurde bereits zu Beginn der Siebziger Jahre nachgewiesen [Ito, 1971]. Zudem wurde ein Molybdäncofaktor in verschiedenen Organen der Ratte beschrieben [Johnson *et al.*, 1977]. Auffällig ist der starke Unterschied im Molybdäncofaktornachweis zwischen Niere und Leber in der genannten Arbeit, wonach die Niere nur eine 10 %ige Menge an Molybdäncofaktor gegenüber der Leber besitzt. Bezogen auf die Benzamidoxim-Reduktase sind die Aktivitäten der gewonnenen Mitochondrien aus Leber und Niere etwa gleich. Ob es sich somit um das gleiche Molybdoenzym handelt, welches zum einen in dieser Arbeit entdeckt wurde zum anderen von Johnson *et al.* [1977], ist fraglich.

In den Kapiteln 3.3.1.6.6 und 4.3.1.5.6 wurde schon Natriumvanadat als potenter Hemmstoff der Benzamidoxim-Reduktase beschrieben. Dabei ist das Salz kein selektiver Molybdäncofaktorinhibitor, dennoch ist eine Hemmung molybdocofaktor-abhängiger Reaktionen typisch [Ramadoss, 1980].

Die Anreicherung der *nit-1* Aktivität (Tab. 5.1) als Molybdäncofaktornachweis und die Anreicherung der FormA-Analyse (Tab. 5.2) korrelieren miteinander. Vergleichend konnte die *N*-reduktive Aktivität (Tab. 5.5) im Gewinnungsschritt von den Mitochondrien zur äußeren mitochondrialen Membran mit dem Faktor 2,5 stärker angereichert werden und im nächsten Schritt nach der Anionenaustauschchromatographie noch einmal um den Faktor 2. Dieses Ergebnis deutet stark darauf hin, dass das gleiche Enzym angereichert wurde.

Der gegen den rekombinanten C-Terminus der Mocosulfurase gerichtete Antikörper erkannte im Western Blot in den Benzamidoxim-Reduktase aktiven Fraktionen das 35 kDa Protein (Abb. 5.13 und 5.14). Die unterschiedliche Stärke der Anfärbung der Banden ist mit der unterschiedlich aufgetragenen Proteinmenge zu begründen, da aus den Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie jeweils das gleiche Volumen für den Western Blot verwendet wurde. Auffällig sind die Detektionen von Banden mit doppeltem und dreifachem Molekulargewicht zur 35 kDa Bande. Dieses Phänomen wurde für andere Enzyme schon vorher beschrieben [Mziaut *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005]. Da es sich bei dem entdeckten Molybdäncofaktor um ein membranständiges Enzym handelt, wäre auch eine Zusammenlagerung der Proteine denkbar und verständlich.

Die Zusammensetzung des Enzymsystems bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und Molybdäncofaktor zur Reduktion von Benzamidoxim ist

bei der Nitratreduktase wiederzufinden [Campbell, 1999], die in autotrophen Organismen vorkommt (Kapitel 6.1.4). Es ist eine NAD(P)H abhängige Reduktase, welche Elektronen von NADH Cytochrom b_5 Reduktase über Cytochrom b_5 auf den katalytisch aktiven Molybdäncofaktor überträgt [Campbell, 1999]. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in den Nieren von Säugetieren ein solches Enzymsystem beschrieben.

Ein genauer Mechanismus der katalysierten Reaktion sollte Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

5.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Methode zur Gewinnung der dritten Komponente zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen auf Schweinenierenmitochondrien übertragen. Die erhaltenen Daten zeigen eindeutig, dass die Methode übertragbar ist. Sie stellt damit eine schnelle Methode dar, die es erlaubt, Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase von der sehr aktiven *N*-reduktiven Enzymfraktion abzutrennen. Dabei ist diese Komponente nicht als die allein aktive Fraktion anzusehen, sondern die Kombination mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase machen das stark *N*-reduktiv wirksame Enzymsystem aus. Im Gegensatz zur Leber konnte in dieser Arbeit aber nur ein aktives, reduzierendes Enzymsystem detektiert werden.

Ziel war es, diese dritte Komponente zu identifizieren. Es handelt sich um ein 35 kDa großes Protein, welches den Molybdäncofaktor enthält. Da mehrere molybdäncofaktorabhängige Enzyme beschrieben sind, ist die komplette Sequenz noch nicht bekannt. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Sulfitoxidase nicht das verantwortliche Enzyme sein kann. Zudem wurde Molybdäncofaktoraktivität in Fraktionen gefunden, die nicht Benzamidoxim reduzieren. Möglicherweise sind nicht beide der zwei unterschiedlichen Molybdäncofaktorsubtypen dazu in der Lage, Benzamidoxim zu reduzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal das verantwortliche Enzymsystem zur Reduktion von Benzamidoxim aus porcinen Nieren komplett identifiziert werden. Zudem wurde damit erstmalig ein molybdäncofaktorabhängiges Enzymsystem in den Nieren aus einem Säugetier beschrieben. Die Zusammensetzung ist der in autotrophen Organismen vorkommenden Nitratreduktase ähnlich.

6 REDUKTION VON BENZAMIDOXIM MIT DEM ZWEI- UND DREIKOMPONENTENSYSTEM

6.1 Einleitung

6.1.1 Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ ist ein ambiphiles Protein, welches an vielen Oxidations- und Reduktionsreaktionen partizipiert [Strittmatter *et al.*, 1972]. In Hepatozyten sind zwei homologe, membranständige Isoformen des Cytochrom b₅ bekannt [Altuve *et al.*, 2001]. Die eine Isoform ist auf dem Endoplasmatischen Retikulum [Strittmatter *et al.*, 1972], die andere Isoform auf der äußeren Membran der Mitochondrien [D'Arrigo *et al.*, 1993] lokalisiert. Daneben ist unter anderem in der Schweineniere ein lösliches Cytochrom b₅ isoliert worden, welches die gleichen spektralen Eigenschaften besitzt wie das mikrosomale [Mangum *et al.*, 1970]. Es findet sich vor allem in den Erythrocyten.

Cytochrom b₅ gehört zur Gruppe der Hämproteine. Definitionsgemäß ist das Hämgerüst, bestehend aus dem Eisen-Zentralatom und Protoporphyrin IX, in Cytochromen der b-Klasse nicht-kovalent gebunden [Mathews und Czerwinski, 1976]. Es handelt sich um ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 16 kDa [Spatz und Strittmatter, 1971].

Mitochondriale und mikrosomale Isoformen haben in der Röntgenstrukturanalyse einen nahezu identischen Aufbau [Altuve *et al.*, 2001]. Ambiphiles Cytochrom b₅ ist ein monomeres Polypeptid aus 133 Aminosäuren. Es ist aus drei funktionell verschiedenen Teilen aufgebaut [Durley und Mathews, 1996; Altuve *et al.*, 2001]. Die hydrophile, cytosolisch exponierte N-terminale Domäne (≈ 100 Aminosäuren) enthält das Hämgerüst und nimmt an der Elektronenübertragungsreaktion teil. Die N-terminale Aminosäure ist bei den meisten Spezies durch Acetylierung blockiert [Abe *et al.*, 1985]. Die mittlere, hydrophobe Domäne (≈ 20 Aminosäuren) stellt den Membrananker dar und ist in die Lipiddoppelschicht eingebettet. Die hydrophile, C-terminale Domäne (≈ 10 Aminosäuren) ist in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums bzw. zum Intermembranraum der Mitochondrien gerichtet.

Eine Propionylseitenkette des Häms ist aus der Oberfläche von Cytochrom b₅ herausgerichtet, während das Häm selbst fast vollständig vom umgebenden Medium abgeschirmt ist. Diese Seitenkette ist von weiteren Carboxylgruppen umringt und kann mit der NADH Cytochrom b₅ Reduktase interagieren [Strittmatter und Dailey, 1982; Durley und Mathews, 1996]. Diese Abschirmung des Hämgerüsts erklärt auch

die geringe Bindungsfähigkeit von Liganden wie Kohlenmonoxid und Cyanid im Vergleich zu anderen Hämproteinen wie Hämoglobin.

Die membranständigen Cytochrom b_5 Proteine haben ein annähernd identisches Molekulargewicht [Ito, 1980] und zeigen aufgrund der hochkonservierten hämbindenden Domäne [Lederer *et al.*, 1983] die gleichen spektroskopischen Eigenschaften [Rivera *et al.*, 1992]. Es wurden beschrieben, dass das Hämgerüst über einen Histidinrest gebunden wird [Strittmatter, 1960]. Dieses wurde später durch Röntgenstrukturanalysen bestätigt [Mathews *et al.*, 1971 und 1979].

Die mikrosomale sowie die lösliche Form des Cytochrom b_5 werden wahrscheinlich durch das gleiche Gen kodiert. Die lösliche Form muss demnach noch posttranslatorisch modifiziert werden [Slaughter *et al.*, 1982; Borgese *et al.*, 1993]. Während mikrosomales und lösliches Cytochrom b_5 die gleiche katalytisch aktive N-terminale Domäne besitzen [Slaughter *et al.*, 1982], unterscheidet sich davon die N-terminale Domäne des mitochondrialen Cytochrom b_5 in seiner Aminosäuresequenz. Die katalytisch aktive Domäne des mitochondrialen Enzyms hat eine 60 %ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz im Vergleich zum mikrosomalen und löslichen Enzym [Lederer *et al.*, 1983].

Weiterhin unterscheidet sich das mitochondriale Cytochrom b_5 in seinen biophysikalischen Eigenschaften von dem mikrosomalen und löslichen Cytochrom b_5 . Ersteres zeigt eine höhere Stabilität gegenüber thermischer und chemischer Denaturierung [Altuve *et al.*, 2004] und weist ein um etwa 100 mV negatives Redoxpotential aufgrund einer stärkeren Häm-Polypeptid-Interaktion auf [Cowley *et al.*, 2004].

6.1.2 NADH Cytochrom b_5 Reduktase

Elektronen des Cosubstrates NADH können nicht direkt auf Cytochrom b_5 übertragen werden. Als Elektronenüberträger des Zweielektronendonators NADH und des Einelektronenakzeptors Cytochrom b_5 dient die NADH Cytochrom b_5 Reduktase, ein Flavoprotein, welches Elektronen sukzessiv auf einen Elektronenakzeptor übertragen kann [Mathews und Czerwinski, 1976]. Es enthält pro Molekül ein Molekül nicht-kovalent gebundenes Flavinadenindinukleotid [Mathews und Czerwinski, 1976].

NADH Cytochrom b_5 Reduktase ist in den unterschiedlichen subzellulären Fraktionen molekular identisch [Borgese und Longhi, 1990] und wird durch ein Gen kodiert [Pietrini *et al.*, 1992; Borgese *et al.*, 1993]. Die Aminosäuresequenz der löslichen Reduktase ist fast vollständig identisch mit der C-terminalen Domäne der membrangebundenen Form [Yubisui *et al.*, 1987].

Das amphiphile Molekül wurde durch Behandlung der Mikrosomen mit Detergentien gewonnen [Mihara und Sato, 1972; Spatz und Strittmatter, 1973]. Durch die Einführung der Bioaffinitätschromatographie mit 5'-ADP Agarose waren hochreine Präparationen des Flavoproteins mit guten Ausbeuten erhältlich [Schafer und Hultquist, 1980], so dass Untersuchungen der Struktur durchgeführt werden konnten.

NADH Cytochrom b_5 Reduktase konnte in enzymatischen Testverfahren sowie in immunochemischen Nachweisen vor allem in der äußeren mitochondrialen Membran nachgewiesen werden. In kleinerer Konzentration wurde das Enzym auch im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen. Schließlich konnte das Enzym auch in Lysosomen, Plasmamembranen sowie in der Membran des Golgiapparates nachgewiesen werden [Borgese und Pietrini, 1986]. Die membrangebundene Form der NADH Cytochrom b_5 Reduktase hat ein Molekulargewicht von etwa 34,5 kDa [Ozols *et al.*, 1985]. Daneben existiert noch eine lösliche Form der NADH Cytochrom b_5 Reduktase. Diese kommt in den zirkulierenden Erythrocyten vor und katalysiert die Reduktion von Methämoglobin [Hultquist und Passon, 1971].

Das Enzym ist aus etwa 300 Aminosäuren aufgebaut [Ozols *et al.*, 1985]. Im Gegensatz zu Cytochrom b_5 ist die N-terminale Domäne (≈ 24 Aminosäuren) in die Membran eingelagert, während die cytosolisch exponierte C-terminale Domäne (≈ 275 Aminosäuren) katalytisch aktiv ist [Ozols *et al.*, 1984; Borgese *et al.*, 1993]. Das katalytisch aktive Fragment des Enzyms setzt sich aus dem N-terminalen flavinadeninindinukleotidbindenden und dem C-terminalen NADH-bindenden Teil zusammen [Strittmatter, 1971; Kimura *et al.*, 2003].

Eine Kristallisation der NADH Cytochrom b_5 Reduktase gelang aus Schweineleber [Miki *et al.*, 1987], wobei eine Röntgenstrukturanalyse bis heute noch nicht existiert, da die erhaltenen Kristalle für die Analyse zu klein sind.

Mittels Antikörperstudien konnte die Ähnlichkeit der mikrosomalen und mitochondrialen NADH Cytochrom b_5 Reduktase gezeigt werden [Takesue und Omura, 1970]. Außerdem konnten die Autoren nachweisen, dass das mitochondriale Enzym die Reduktion von mikrosomalem Cytochrom b_5 katalysieren kann. Die molekulare Identität des in der äußeren Mitochondrienmembran und des in Mikrosomen vorkommenden Flavoproteins wurde durch enzymatische und immunochemische Studien belegt [Kuwahara *et al.*, 1978; Borgese und Piertrini, 1986].

6.1.3 Zusammenspiel zwischen Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase

Untersuchungen zum Verlauf der Elektronenübertragung, sowohl vom Elektronendonator auf die Reduktase sowie von der Reduktase auf das entsprechende Hämprotein Cytochrom b_5 , wurden schon in den Fünfziger Jahren durchgeführt [Strittmatter, 1958 und 1959]. Auch wenn hierzu kürzlich Mechanismen postuliert wurden, so unterscheiden sich diese kaum von denen, die sehr viel früher publiziert wurden [Hara und Minakami, 1971; Kimura *et al.*, 2003].

Im ersten Schritt der Elektronenübertragung von NADH auf Cytochrom b_5 bindet das Cosubstrat an der oxidierten Form der NADH Cytochrom b_5 Reduktase. Das Cosubstrat bindet dabei mit der Phosphatgruppe an einen Lysinrest (Lys¹¹⁰, Ochsenleber) des Flavoproteins [Strittmatter 1958; Strittmatter *et al.*, 1992a].

Über eine reaktive Zwischenstufe erfolgt die Reduktion des Enzyms bei gleichzeitiger Oxidation des Nukleotids.

Entgegen älterer Annahmen, dass sich zu diesem Zeitpunkt das Nukleotid NAD^+ abspaltet [Hara und Minakami, 1971], geht man heute davon aus, dass das Nukleotid NAD^+ bis zum Schluss der Elektronenübertragungen gebunden bleibt [Kimura *et al.*, 2003]. Es findet somit zunächst die Übertragung eines Elektrons vom zweifach elektronenreduzierten Enzymkomplex auf das Eisen-Zentralatom des Cytochrom b_5 statt. Dieses wird dadurch von der dreiwertigen Form zur zweiwertigen Form reduziert. Der Enzymkomplex aus NADH Cytochrom b_5 Reduktase und NAD^+ geht dabei in eine neutrale Semichinonform über.

Diese neutrale Semichinonform wandelt sich unter Abgabe eines Protons relativ schnell in das anionische Semichinon um.

Im nächsten Schritt wird das zweite Elektron transferiert und unter Bindung von NADH entsteht ein oxidiertes, ternärer Komplex aus NADH Cytochrom b_5 Reduktase, NAD^+ und Cosubstrat.

Im letzten Schritt wird das NAD^+ abgespalten und die NADH Cytochrom b_5 Reduktase steht einem neuen katalytischen Zyklus zur Verfügung.

Da Cytochrom b_5 nur ein Elektron in einem Schritt empfangen kann, verläuft der oben beschriebene Zyklus über zwei nacheinander ablaufende Einzelübertragungen der Elektronen [Iyanagi *et al.*, 1984].

Ein Elektronentransfer findet zwischen den beiden Enzymen über eine komplementäre Ladungspaarung der Lysinreste (Lys⁴¹, Lys¹²⁵, Lys¹⁶³, Ochsenleber) der NADH Cytochrom b_5 Reduktase mit der Carboxylgruppe des katalytischen

Zentrums des Cytochrom b_5 über stereospezifische Interaktion statt [Strittmatter *et al.*, 1990; Strittmatter *et al.*, 1992b]. Dabei sind beide Enzyme zufällig und unabhängig voneinander in der Membran verteilt. Der schnelle Elektronentransfer auf das Eisen des Hämproteins ist den hydrophoben Domänen beider Enzyme zu verdanken. Sie sorgen für eine spezifische Orientierung [Enoch *et al.*, 1977; Ozols *et al.*, 1985]. Dennoch ist die Kollision der katalytisch aktiven Fragmente zufällig [Rogers und Strittmatter, 1974; Tonegawa *et al.*, 2005].

Die Bedeutung dieses Elektronenübertragungssystems ist in den Zellorganellen bisher in unterschiedlichem Ausmaß untersucht worden. Die Arbeiten zum mikrosomalen System sind unüberschaubar aufgrund einer Vielzahl von Publikationen. Lange beschrieben ist die Übertragung der Elektronen von NADH auf die terminalen Enzyme Steroloxidase der Cholesterolsynthese [Reddy *et al.*, 1977; Fukushima *et al.*, 1981] und der Stearyl-CoA-Desaturase beim Fettsäurestoffwechsel [Strittmatter *et al.*, 1974; Keyes *et al.*, 1979]. Neben physiologischen Funktionen ist die Elektronenübertragung auf Cytochrom P450 Isoenzyme beschrieben [Hildebrandt und Estabrook, 1971; Mokashi *et al.*, 2003].

Das mitochondriale Cytochrom b_5 ist dagegen bisher sehr wenig charakterisiert worden. In Kombination mit Cytochrom c sorgen die beiden Enzyme für einen Elektronentransport zwischen innerer und äußerer Membran [Bernardi und Azzone, 1981]. Zudem wird eine Beteiligung an der Stimulation der Androgensynthese in den Leydig-Zellen [Ogishima *et al.*, 2003] sowie der Reduktion von Ascorbatradikalen in Nebennierenmark und Leber [Ito *et al.*, 1981] vermutet.

Die Beteiligung der Elektronentransporter am *N*-reduktiven Enzymsystem wurde bereits ausführlich in Kapitel 1.4 beschrieben. Die löslichen Enzyme sind offenbar auch allein in der Lage, *N*-reduktive Prozesse im Fremdstoffmetabolismus durchzuführen [Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005]. Die membranständigen Enzyme hingegen wurden bisher im Fremdstoffmetabolismus in Kombination mit einer dritten Komponente beschrieben [Kadlubar und Ziegler, 1974; Andersson *et al.*, 2005]. Dieses Verhalten entspricht den endogenen Abläufen wie Desaturaseaktivität und Cholesterolsynthese. Im mikrosomalen Metabolismus des Benzamidoxims in der Leber ist ein Cytochrom P450 Isoenzym postuliert worden [Clement *et al.*, 1997]. Für Cytochrom b_5 sind Interaktionen mit Cytochrom P450 Isoenzymen beschrieben worden, wobei Cytochrom b_5 die Cytochrom P450-abhängigen Oxygenierungsreaktionen steigert [Baron *et al.*, 1973; Aoyama *et al.*, 1990]. Daneben kann das mikrosomale Cytochrom b_5 auch als Elektronenakzeptor mit der NADPH Cytochrom

P450 Reduktase agieren [Enoch und Strittmatter, 1979; Dailey und Strittmatter, 1980].

Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase sind jeweils als Fusionsproteine beschrieben. NADH Cytochrom b_5 Reduktase liegt als funktionelle Domäne in der Nitratreduktase autotropher Organismen [Campbell, 1999] vor. In Kombination mit Cytochrom b_5 findet man sie in der humanen cytosolischen NAD(P)H Oxidoreduktase [Zhu *et al.*, 1999] sowie der in Säugetieren befindlichen mikrosomalen NAD(P)H Reduktase [Xie *et al.*, 2004]. Cytochrom b_5 allein findet sich als Fusionsprotein in Kombination mit der mitochondrialen Sulfitoxidase in Säugetieren [Rudolph *et al.*, 2003] sowie mit der Nitratreduktase autotropher Organismen [Campbell, 1999] wieder. Nitratreduktase und Sulfitoxidase enthalten eine weitere Domäne, welche den Molybdäncofaktor binden kann (Kapitel 6.1.4).

6.1.4 Molybdänhaltige Enzyme

Molybdän ist das einzige Übergangsmetall der zweiten Reihe im Periodensystem der Elemente, welches von fast allen lebenden Organismen benötigt wird. Für wenige Arten ist Molybdän nicht essentiell. Diese weichen auf Wolfram aus, welches im Periodensystem direkt unter Molybdän angeordnet ist [Hille, 2002]. Molybdän kommt mit den Oxidationszahlen +II bis +VI vor, wobei die Molybdän(VI)-Verbindungen am beständigsten sind.

Molybdän ist nur im Komplex mit Molybdopterin, dem Molybdäncofaktor, biologisch aktiv. Einzige Ausnahme hiervon bildet die bakterielle Nitrogenase, welche einen Eisen-Molybdän-Schwefel-Cluster enthält. [Kisker *et al.*, 1997; Hille, 2005]. Molybdopterin ist ein inaktiver Cofaktor (Abb. 6.1). Die typischen Oxidationszahlen des im Molybdopterin gebundenen Molybdäns sind +IV bis +VI [Mendel und Bittner, 2006].

Molybdoenzyme hingegen sind bisher in allen untersuchten Organismen außer in *Saccharomyces cerevisiae* gefunden worden. Sie sind am Stoffwechsel vieler Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelverbindungen beteiligt [Hille, 2005; Kisker *et al.*, 1997]. In Prokaryoten sind bisher mehr als 50 Molybdoenzyme beschrieben, in Eukaryoten bisher nur sechs [Hille, 1996; Mendel und Bittner, 2006].

Die Bildung des Molybdäncofaktors verläuft in Eukaryoten ähnlich der Bildung in Prokaryoten, da der Weg hochkonserviert ist [Mendel und Bittner, 2006]. Zunächst wird aus Guanosintriphosphat das Pterinderivat PrecursorZ gebildet. Durch

Sauerstoff-Schwefel-Tausch entsteht dann das Molybdopterin (Abb. 6.1). Bevor schließlich durch Einfügen des Molybdäns der Molybdäncofaktor entstehen kann, muss das Molybdopterin zunächst adenyliert werden.

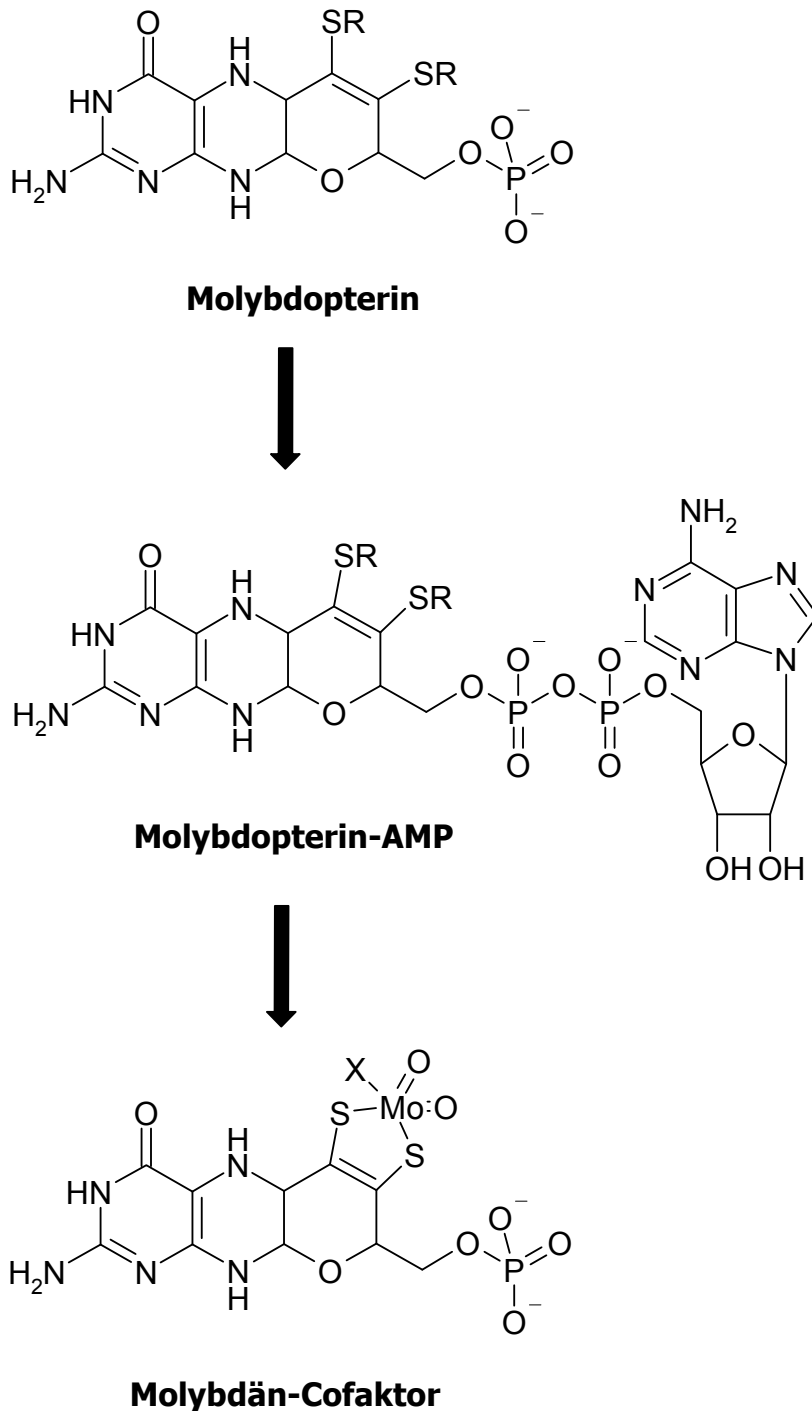


Abb. 6.1: Bildung des Molybdäncofaktors [nach Mendel und Bittner, 2006]. Für Molybdopterin und Molybdopterin-AMP sind die Liganden der Dithiolat-Schwefel mit „R“ gekennzeichnet, da nicht bekannt ist, wann Kupfer an das Dithiol gebunden vorliegt. Der Molybdän-Cofaktor-Ligand „X“ kennzeichnet einen zusätzlichen Liganden, wobei nicht bekannt ist, wie viele Liganden das Molybdän tatsächlich besitzt [Mendel und Bittner, 2006].

Nach Einfügen des Molybdäns wird Adenosinmonophosphat wieder abgespalten. Zwischenzeitlich wird an die Thiolgruppen Kupfer angelagert, wie neueste Kristallstrukturen zeigen. Funktion und Bedeutung hiervon sind noch nicht bekannt. Der Molybdäncofaktor wird möglicherweise mittels Molybdäncofaktor-Carrier-Proteine in die entsprechenden Targetenzyme eingebaut [Mendel und Bittner, 2006].

Neben dem Molybdäncofaktor besitzen eukaryotische Molybdoenzyme mindestens ein weiteres Redoxzentrum. Einzige Ausnahme hiervon bildet die pflanzliche Sulfitoxidase [Mendel und Bittner, 2006]. Sulfitoxidase bildet zusammen mit Xanthindehydrogenase, Aldehydoxidase und Nitratreduktase die wichtigsten Molybdoenzyme.

Die Nitratreduktase ist nur in autotrophen Organismen zu finden [Campbell, 1999]. Dort verkörpert es das Schlüsselenzym der anorganischen Nitrat-Anpassung. Es sind mehrere Formen der Nitratreduktase entdeckt worden. So existieren NADH-, NADPH- und bispezifische Formen [Campbell, 1999].

Die Nitratreduktase ist ein homodimeres Enzym, was bedeutet, dass die beiden Monomere identisch sind. Ein Monomer besteht dabei aus einer N-terminalen Molybdäncofaktor-, einer Cytochrom b_5 - und einer C-terminalen NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Domäne [Campbell, 1999].

Die Aldehydoxidase katalysiert die Bildung von Carbonsäuren aus Aldehyden [Rajagopalan *et al.*, 1962]. Die hohe Sequenzhomologie zur Xanthindehydrogenase lässt vermuten, dass sie wahrscheinlich aus dieser entstanden ist [Rodriguez-Trelles *et al.*, 2003].

Die Xanthindehydrogenase ist ebenfalls ein Homodimer. Ein Monomer besteht dabei aus zwei [2Fe-2S]-Cluster-Domänen, sowie einer flavinbindenden und einer molybdäncofaktor-Domäne [Kisker *et al.*, 1997]. In Säugetieren existieren zwei Formen des Enzyms. Die normalerweise vorkommende Dehydrogenasevariante kann Elektronen sowohl auf NAD^+ als auch auf molekularen Sauerstoff übertragen. Mittels Oxidation oder proteolytischer Spaltung kann das Enzym auch in der Oxidasevariante auftreten. In dieser Form ist die Übertragung der Elektronen nur auf molekularen Sauerstoff möglich [Stirpe und Della Corte, 1969; Hille und Nishino, 1995].

Die Sulfitoxidase katalysiert den Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren [Kisker *et al.*, 1997]. Das tierische Enzym ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert [Cohen *et al.*, 1972] und ist ebenfalls ein Homodimer. Der N-Terminus trägt das Hämprotein Cytochrom b_5 während der C-Terminus den Molybdäncofaktor beinhaltet [Kisker *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 2003].

Der gebildete Molybdäncofaktor wird in Tieren, den Menschen eingeschlossen, in zwei Subtypen unterteilt. Diese lassen sich nach den Bindungspartnern am Molybdän unterscheiden (s. Abb. 6.2).

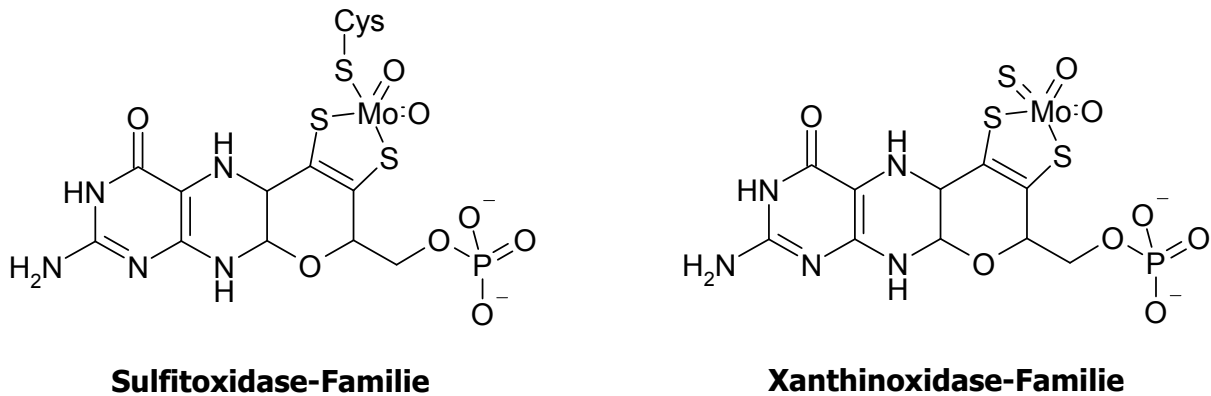


Abb. 6.2: Eukaryotische Molybdäncofaktor-Familien [nach Mendel und Bittner, 2006]

Wie der Abbildung 6.2 zu entnehmen ist, gibt es zwei eukaryotische Molybdäncofaktorfamilien. Zur Sulfitoxidasefamilie zählen die Sulfitoxidase und die Nitratreduktase. Durch Bindung an das Apoenzym werden die beiden Enzyme aktiviert [Mendel und Bittner, 2006].

Zur Xanthinoxidasefamilie gehören die Xanthindehydrogenase und die Aldehydoxidase. Schon die hohe Sequenzhomologie lässt auf die Familienzugehörigkeit schließen. Beide Enzyme benötigen zur katalytischen Aktivität nach Einbau des Molybdäncofaktors einen terminalen Schwefel. Die Mocosulfurase ist das für diese Übertragung verantwortliche Enzym [Mendel und Bittner, 2006]. Aus *A. thaliana* konnte das hierfür verantwortliche Protein ABA3 identifiziert werden [Bittner *et al.*, 2001]. Wahrscheinlich verhilft die C-terminale Domäne des homodimeren Enzyms, welches zwei Domänen pro Untereinheit besitzt, zur Interaktion mit den Zielproteinen Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase [Bittner *et al.*, 2001]. Bis heute ist der genaue Aktivierungsmechanismus der Zielproteine mittels ABA3 noch nicht geklärt [Mendel und Bittner, 2006].

6.1.5 Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen mit molybdänhaltigen Enzymen

Die cytosolischen, molybdänhaltigen Enzyme Xanthindehydrogenase und Aldehydoxidase spielen eine relevante Rolle im oxidativen Fremdstoffmetabolismus [Beedham, 1997]. Aber auch die Reduktion funktioneller Gruppen am Stickstoff ist

oft beschrieben. Im Falle der Oxime und Amidoxime konnte die Beteiligung der Aldehydoxidase am anaeroben, cytosolischen, reduktiven Prozess von Benzamidoxim, Salicylaldoxim und Acetophenonoxim gezeigt werden [Tatsumi und Ishigai, 1987]. Das Amidinohydrzonderivat Guanoxabenz wird durch die Xanthinoxidase reduziert [Dambrova *et al.*, 1998]. Ebenfalls ist die Xanthinoxidase an der Reduktion von Hydroxylaminen [Stöhrer, 1968; Clement und Kunze, 1992] beteiligt. Zur Reduktion von Hydroxamsäuren sowie *N*-hydroxyliertem Urethan hingegen wird die Aldehydoxidase benötigt [Sugihara *et al.*, 1983a; Sugihara *et al.*, 1983b; Sugihara und Tatsumi, 1986; Kitamura *et al.*, 1994].

Alle beschriebenen Reduktionen benötigen einen Elektronendonator. Aldehydoxidasen können dabei auf die Elektronen von Aldehyden sowie *N*-Methylnicotinamid und 2-Hydroxypyrimidin zurückgreifen [Sugihara *et al.*, 1983a; Sugihara und Tatsumi, 1986; Kitamura *et al.*, 1994]. Xanthindehydrogenasen nutzen in der Regel Xanthin und NADH [Dambrova *et al.*, 1998; Clement und Kunze, 1992]. Eine Sauerstoffabhängigkeit dieser Reaktionen ist nicht klar erkennbar. Manche Reduktionen finden aerob statt [Dambrova *et al.*, 1998; Clement und Kunze, 1992; Dick *et al.*, 2005, 2006]. Die meisten Reaktionen hingegen sind als anaerob beschrieben [Stöhrer 1968; Sugihara *et al.*, 1983a; Sugihara und Tatsumi, 1986; Kitamura *et al.*, 1994].

6.1.6 Bisherige Untersuchungen

Die löslichen Enzyme Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase sind offenbar auch allein in der Lage *N*-reduktive Prozesse im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus durchzuführen [Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005]. Die membranständigen Enzyme hingegen sind bisher im Fremdstoffmetabolismus in Kombination mit einer dritten Komponente beschrieben [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.* 1997; Andersson *et al.*, 2005]. Die Historie der Untersuchungen *N*-hydroxylierter Verbindungen ist in Kapitel 1.4 dargestellt.

Während einzelne Daten zur Untersuchung des Zweikomponentensystems für die Reduktion von *N*-Hydroxy-Melagatran vorliegen [bisher nicht veröffentlicht], sind die Daten für die in dieser Arbeit genutzten Modellsubstanz Benzamidoxim nur in einem sehr geringen Umfang vorhanden.

6.1.7 Zielsetzung

Ausgehend von Schweinenierenmitochondrien wurde in dieser Arbeit eine Komponente zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen isoliert. Das isolierte Protein *Moco Sulfurase C-terminal domain containing 2* ist nicht allein dazu in der Lage, die Reduktion durchzuführen. Vielmehr scheint es als Art enzymatischer Aktivator auf die an der Reduktion beteiligten Enzyme Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase zu wirken. Die beiden membranständigen Enzyme sind auch allein in geringem Maße zur Reduktion befähigt.

Es sollten im Rahmen dieser Arbeit die *N*-reduktive Aktivität des Zwei- und des Dreikomponentensystems untersucht und verglichen werden. Im Zweikomponentensystem war die Abhängigkeit der beiden membranständigen Enzyme zu untersuchen, um ein optimales Verhältnis der Enzyme für diese Reaktion zu bestimmen.

Gleiche Untersuchungen sollten im Dreikomponentensystem stattfinden, um Übereinstimmungen oder Unterschiede in der Reduktion festzustellen. Dazu mussten Abhängigkeiten der einzelnen Enzyme untereinander erstellt werden.

6.2 Methoden

6.2.1 Gewinnung der Enzympräparationen

6.2.1.1 Materialien und Geräte

Sofern nicht angegeben, befindet sich eine Übersicht über die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 der vorliegenden Arbeit.

6.2.1.2 Gewinnung von Schweinelebermikrosomen

Die Schweinelebern zur Gewinnung der Mikrosomen stammten von einem ortsnahen Schlachter aus Einzelschlachtungen. Die Tiere wurden per Elektroschock getötet, durch Öffnen der Halsschlagader ausbluten lassen und anschließend einem Brühbad unterworfen. Danach wurden den Schweinen die Lebern entnommen und in einem 4 °C kaltem Transportpuffer (20 mM Kaliumphosphat, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7,4) zum Labor transportiert. Pro Aufarbeitung wurden 1-2 Lebern sowohl weiblicher Tiere als auch männlicher Kastrate verwendet.

Die folgenden Reinigungsschritte fanden bei 4 °C oder unter Eiskühlung statt. Eine ausreichende Perfusion der Lebern wurde mit 50 mM Phosphatpuffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7,4) durchgeführt. Durch Entfärben der dunkelroten Lebern war eine gute Perfusion zu erkennen. Die klein geschnittenen Leberstücke wurden so lange mit 50 mM Phosphatpuffer gespült, bis das Waschwasser nahezu farblos blieb. Die gut gespülten Leberstücke wurden durch einen handelsüblichen Fleischwolf gegeben. Die so erhaltene Masse wurde mit gleichem Volumen an 20 mM Phosphatpuffer (250 mM Saccharose, pH 7,4) gemischt und zweimal durch einen Durchflusshomogenisator gegeben [Ziegler und Pettit, 1966]. In den folgenden Schritten wurde nur noch der letztgenannte EDTA-freie Puffer verwendet, da das zu verarbeitende Material zu diesem Zeitpunkt blutfrei war. Der Verlust an Volumen durch das Homogenisieren wurde durch Auffüllen mit Puffer wieder hergestellt. Anschließend wurde das entstandene Leberhomogenat mit Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

Das Homogenat wurde 30 Minuten bei 9.000 *g* (Rotor JA 10) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde zur Abtrennung von Fettsäuren durch Verbandmull kolliert. Die vereinigten Überstände wurden für 60 Minuten bei 100.000 *g* (Rotor 45 Ti) der Ultrazentrifugation unterzogen. Der cytosolische Überstand konnte aliquotiert und bei -80°C eingefroren werden. Das erhaltene Pellet wurde mit Puffer

in einem Teflon-Glas-Homogenisator resuspendiert und zur weiteren Aufreinigung erneut 60 Minuten bei 100.000 *g* ultrazentrifugiert. Das entstandene mikrosomale Pellet wurde wieder in Puffer resuspendiert, mit Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7,4 eingestellt, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

6.2.1.3 Isolierung von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase

6.2.1.3.1 Solubilisation

Die Solubilisation wurde mit dem nichtionischen Detergenz Thesit[®] durchgeführt. Es ergab sich folgende Zusammensetzung des Solubilisationsansatzes: Schweinelebermikrosomen wurden mit Solubilisationspuffer (10 mM Kaliumphosphat, 2 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol, 1 M Natriumchlorid, 40 % (w/v) Glycerol, 0,4 % (w/v) Thesit[®], pH 7,4) in gleichen Teilen miteinander verdünnt. Der Ansatz wurde eine Stunde im Eisbad mit einem Flügelrührer gerührt und anschließend eine Stunde bei 100.000 *g* (Rotor 45 Ti) zentrifugiert, um die solubilisierten Proteine abzutrennen. Der erhaltene Überstand wurde durch Verbandmull koliert und mit 10 %iger Natriumcholatlösung auf einen Gehalt von 0,5 % (w/v) Natriumcholat eingestellt.

6.2.1.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie erfolgte an Octyl-Sepharose CL-4B[®] (Fa. Pharmacia, 3,5 x 29 cm, Gelvolumen 270 ml) in Anlehnung an die Methode von Kling *et al.* [1985]. Nach Auftragen des Solubilisats erfolgte die Elution durch einen positiven Stufengradienten der Detergenzkonzentration sowie einen negativen Stufengradienten der Ionenstärke. Die Flussrate betrug 0,83 ml*min⁻¹ und das Volumen der aufgefangenen Fraktionen jeweils 15 ml.

Mittels eines Durchflussphotometers wurde die Elution bei 280 nm (NADH Cytochrom b_5 Reduktase) verfolgt. Ein zusätzliches Elutionsprofil wurde durch Vermessen der einzelnen Fraktionen bei 417 nm (Cytochrom b_5) erstellt. Außerdem wurden spezielle Aktivitätstests auf Cytochrom b_5 , Cytochrom b_5 Reduktase, Cytochrom P450 Enzyme, NADPH Cytochrom P450 Reduktase durchgeführt (Kapitel 2.2.2.2-5). Alle aktiven Fraktionen wurden in Pools vereinigt und mittels Amicon-Zellen eingeeengt, umgepuffert und bei -80°C eingefroren.

6.2.1.3.3 Gewinnung von Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ wurde nach der Methode von Lomb [1995], der weiterentwickelten Vorschrift von Taniguchi *et al.* [1984], isoliert. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Cytochrom b₅ war im Arbeitskreis vorhanden und wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Humanes rekombinantes Cytochrom b₅ [Holmans *et al.*, 1994] wurde von der Firma MoBiTec (Göttingen) bezogen.

6.2.1.3.4 Gewinnung von NADH Cytochrom b₅ Reduktase

6.2.1.3.4.1 Präparative HPLC an Fractogel[®] EMD TMAE 650 (S)

NADH Cytochrom b₅ Reduktase wurde modifiziert nach Clement *et al.* [1997] aus Schweinelebermikrosomen gereinigt.

Die aus Kapitel 6.2.1.3.2. erhaltene NADH Cytochrom b₅ Reduktase Fraktion, in der sich auch die dritte Komponente befand, wurde mit Hilfe präparativer HPLC durch Anionenaustausch an Fractogel[®] EMD TMAE 650 (S) weiter aufgereinigt. Hieraus ergaben sich zwei Proteinfractionen. In einer Fraktion war die dritte Komponente enthalten, die andere Fraktion enthielt NADH Cytochrom b₅ Reduktase. Beide Fraktionen wurden mittels Amicon-Zellen eingeeengt, umgepuffert und bei -80°C eingefroren.

6.2.1.3.4.2 Bioaffinitätschromatographie an 5'-AMP-Sepharose[®]

Die unter Kapitel 6.2.1.3.4.1 aufgearbeitete NADH Cytochrom b₅ Reduktase Fraktion wurde auf eine 5'-AMP-Sepharose[®]-Säule (Fa. Pharmacia, 2,5 x 8 cm, Gelvolumen 40 ml) gegeben. Die Säule wurde zuvor ausreichend mit Äquilibrierpuffer (10 mM Kaliumphosphat, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 20 % (w/v) Glycerol, 0,02 % (w/v) Triton X-100, pH 7,4) konditioniert. Alle Arbeiten fanden mit einem Fluss von 0,167 ml*min⁻¹ statt. Nach Auftrag der Proteinlösung wurde etwa ein Säulenvolumen mit Äquilibrierpuffer gespült. Alle Verunreinigungen und unspezifisch gebundenen Proteine wurden damit von der Säule gespült.

Anschließend erfolgte die Elution der NADH Cytochrom b₅ Reduktase mit dem Elutionspuffer (100 mM Kaliumphosphat, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 20 % (w/v) Glycerol, 0,02 % (w/v) Triton X-100, 0,5 mM NADH, pH 7,4). Dieser Schritt erfolgte bei einem Fluss von 0,25 ml*min⁻¹ über 2 Stunden.

Das Eluat wurde in Fraktionen von 4 ml Größe aufgefangen und auf seine Reduktase-Aktivität untersucht. Alle aktiven Fraktionen wurden gepoolt und mittels Amicon-Zellen eingengt, umgepuffert und bei -80°C eingefroren.

6.2.1.4 Umpufferung und Detergenzentfernung

Um in den Puffern enthaltene niedermolekulare Bestandteile aus den Enzympräparationen zu entfernen, wurden diese über eine Sephadex[®] G-25 (NAP[™]25) gegeben und mit einem Neutralpuffer (10 mM Kaliumphosphat, 20 % Glycerol (w/v), pH 7,4) wieder eluiert.

Das Eluat wurde mit ca. 1,0 ml Calbiosorb[®]-Adsorber (EMD Biosciences, San Diego, CA, USA) versetzt und mit Hilfe eines Überkopfschüttlers vorsichtig geschüttelt. Nach Sedimentation des Adsorptionsmaterials wurde die Enzympräparation wieder abpipettiert. Zur vollständigen Entfernung der Detergentien musste dieser Vorgang mehrfach wiederholt werden.

6.2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Enzympräparationen

6.2.2.1 Proteinbestimmung

Die Methode zur Proteinbestimmung ist in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben.

6.2.2.2 NADH Cytochrom b₅-Aktivitätsbestimmung

Die Methode der NADH Cytochrom b₅ Reduktase-Aktivitätsbestimmung ist in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben.

6.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Methode zur Herstellung und Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist in Kapitel 2.2.2.7 beschrieben.

Silberfärbung:

Zur Färbung wurde ein Bio-Rad Silver Stain Kit (Bio-Rad, München) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

6.2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Benzamidoxim-Reduktion durch Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase

6.2.3.1 Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin

Die *N*-reduktive Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit über die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde hierbei als Modellsubstanz verwendet.

6.2.3.1.1 Synthese von Benzamidoxim

Benzamidoxim wurde nach der Methode von Krüger [1885] aus Benzonitril und Hydroxylamin synthetisiert und nach den üblichen Methoden auf Identität und Reinheit geprüft.

6.2.3.1.2 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz für die mikrosomalen Biotransformationsstudien setzte sich aus unterschiedlichen Mengen Cytochrom b₅ sowie Cytochrom b₅ Reduktase, 1000 µM NADH, 500 µM Benzamidoxim, 40 µM DLPC in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3 zusammen.

Zunächst wurden die Enzyme bei 37 °C zwei Minuten vorinkubiert, dann das Benzamidoxim zugegeben und nach weiteren drei Minuten Vorinkubation die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und danach für mindestens 60 Minuten bei -20 °C eingefroren. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 *g* trennte das denaturierte Protein ab. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der unter Kapitel 2.2.3.1.3 beschriebenen Analytik quantifiziert.

Ansätze mit dem gereinigten C-Terminus der Mocosulfurase wurden zur Vergleichbarkeit unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Es wurden im Dreikomponentensystem unterschiedliche Mengen des C-Terminus der Mocosulfurase eingesetzt.

6.2.3.1.3 HPLC-Analytik

In Anlehnung an die von Wolf [noch nicht veröffentlicht] entwickelte Methode wurde gebildetes Benzamidin im Zweikomponentensystem mittels HPLC-Analytik bestimmt. Der Eluent wurde durch einen Sartorius[®] Membranfilter (0,45 µm) per Vakuumfiltration von Partikeln befreit. Vor der Verwendung wurde der Eluent 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

HPLC-Pumpe und Controller: Waters 600

Detektor: Waters 2487 UV

Autosampler: Waters 717 plus

Integrator: EZChrom Client Chromatography Software Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA)

Stationäre Phase: LiChroCART 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher[®] 60 RP-select B (5 µm), Vorsäule RP-select B, 4x4 mm (Merck, Darmstadt)

Mobile Phase: 10 mM 1-Octylsulfonat in *Aq. bidest.*/Acetonitril 82,5:17,5 (v/v) (pH-Wert nicht eingestellt)

Laufzeit: 28 min

Flussrate: 1 ml*min⁻¹

Injektionsvolumen: 40 µl

Detektion: UV, 201 nm

Die Retentionszeiten lagen bei 7,0 ± 0,2 Minuten (Benzamidoxim) und 24,2 ± 0,2 Minuten (Benzamidin).

Die Kalibrierung zur Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Benzamidin erfolgte mit vier verschiedenen Konzentrationen im Bereich 0-500 nM in Fließmittel gelöst und wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen. Für jede Konzentration wurden 2 Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt

vermessen wurden. In diesem Bereich verlief die Kalibrierung linear mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9999$. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde den Inkubationsansätzen die für die Kalibrierung verwendeten Benzamidin-Konzentrationen zugesetzt. In Abwesenheit des Cosubstrates NADH sowie nach Denaturierung der Proteinpräparation wurden die Zusammensetzung, Inkubationsbedingung und Aufarbeitung entsprechend der unter 6.2.3.1.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Für jede Konzentrationsstufe wurden 2 Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt vermessen wurden. Benzamidin konnte im angegebenen Konzentrationsbereich (bis 500 nM) quantifiziert werden. Die Wiederfindungsrate betrug $97\pm 9\%$.

In Anlehnung an die von Friedrich [2003] entwickelte Methode wurde gebildetes Benzamidin im Dreikomponentensystem mittels HPLC-Analytik bestimmt.

Der Eluent wurde durch einen Sartorius[®] Membranfilter (0,45 μm) per Vakuumfiltration von Partikeln befreit. Vor der Verwendung wurde der Eluent 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

HPLC-Pumpe und Controller: Waters 600 E Multisolvent Delivery System

Detektor: Waters 486 TAD UV

Autosampler: Waters 700 Satellite WISP

Integrator: EZChrom Client Chromatography Software Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA)

Stationäre Phase: LiChroCART 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher[®] 60 RP-select B (5 μm), Vorsäule RP-select B, 4x4 mm (Merck, Darmstadt)

Mobile Phase: 10 mM 1-Octylsulfonat in *Aq. bidest.*/Acetonitril 82,5:17,5 (v/v) (pH-Wert nicht eingestellt)

Laufzeit: 28 min

Flussrate: 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: UV, 229 nm

Die Retentionszeiten lagen bei $7,0 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidoxim) und $24,2 \pm 0,2$ Minuten (Benzamidin).

Die Kalibrierung zur Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Benzamidin erfolgte mit sieben verschiedenen Konzentrationen im Bereich 0-250 µM in Fließmittel gelöst und wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen. Für jede Konzentration wurden 2 Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt vermessen wurden. In diesem Bereich verlief die Kalibrierung linear mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9998$. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde den Inkubationsansätzen die für die Kalibrierung verwendeten Benzamidin-Konzentrationen zugesetzt. In Abwesenheit des Cosubstrates NADH sowie nach Denaturierung der Proteinpräparation wurden die Proben analog zur Methode 6.2.3.1.2 vermessen. Für jede Konzentrationsstufe wurden 2 Ansätze parallel pipettiert, die jeweils doppelt vermessen wurden. Benzamidin konnte im angegebenen Konzentrationsbereich (bis 250 µM) quantifiziert werden. Die Wiederfindungsrate betrug 95 ± 5 %.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Charakterisierung und Inkubationsoptimierung des Zweikomponentensystems

6.3.1.1 Inkubationszeit

Es wurde eine Abhängigkeit der Inkubationszeit mit zwei unterschiedlichen Verhältnissen der Enzyme Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase zueinander durchgeführt. Hiermit konnte festgestellt werden, ob die Inkubationszeit abhängig von dem Enzymverhältnis war. Gleichzeitig konnte eine optimale, enzymverhältnisunabhängige Inkubationszeit für die folgenden Studien bestimmt werden. Die Inkubationszeit für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin verlief über einen Zeitraum bis 30 Minuten linear. Wurde noch länger inkubiert, so nahm die Reaktionsgeschwindigkeit ab (Abb. 6.1). Gebildetes Benzamidin war mit der empfindlicheren HPLC-Methode (Kap. 6.2.3.1.3) bei 201 nm quantifizierbar.

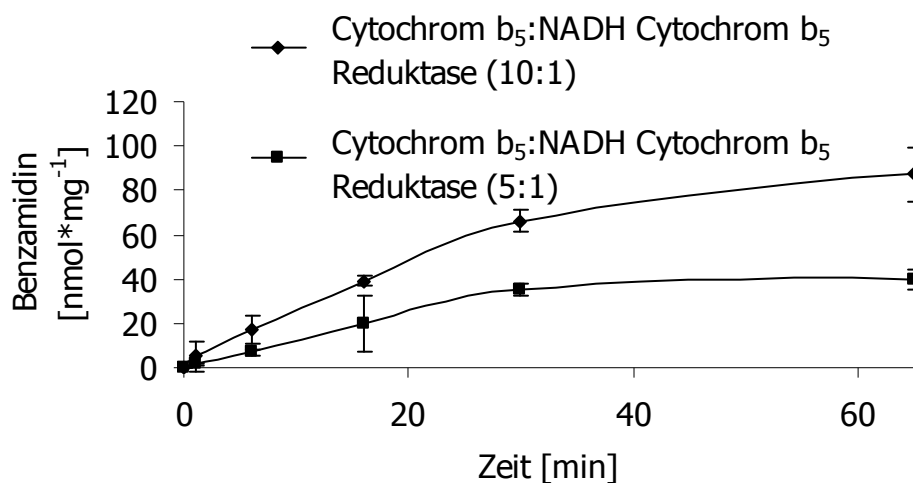


Abb. 6.1: Zeitabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Zweikomponentensystem. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 85 bzw. 170 pmol Cytochrom b_5 , 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 1 mM NADH und 0,5 mM Benzamidoxim, 40 μ M DLPC in 150 μ l eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3. Die Inkubationszeit betrug 0-65 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 6.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 6.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden. Die Daten beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte Proteinmenge.

6.3.1.2 Verhältnisabhängigkeit der zwei Proteine bei konstantem Proteingehalt

Es wurde eine Abhängigkeit der Proteine zueinander mit unterschiedlichen Verhältnissen durchgeführt. Hierbei wurde der Gehalt an NADH Cytochrom b_5 Reduktase in dem gleichen Maße erniedrigt, in welchem Cytochrom b_5 erhöht wurde. Dieses bedeutete einen konstanten Proteingehalt. Es konnte bis zu einem Verhältnis der eingesetzten Enzyme von 10:1 zu Gunsten des Cytochrom b_5 eine Steigerung der Umsatzrate festgestellt werden, danach fiel sie wieder langsam ab (Abb. 6.2).

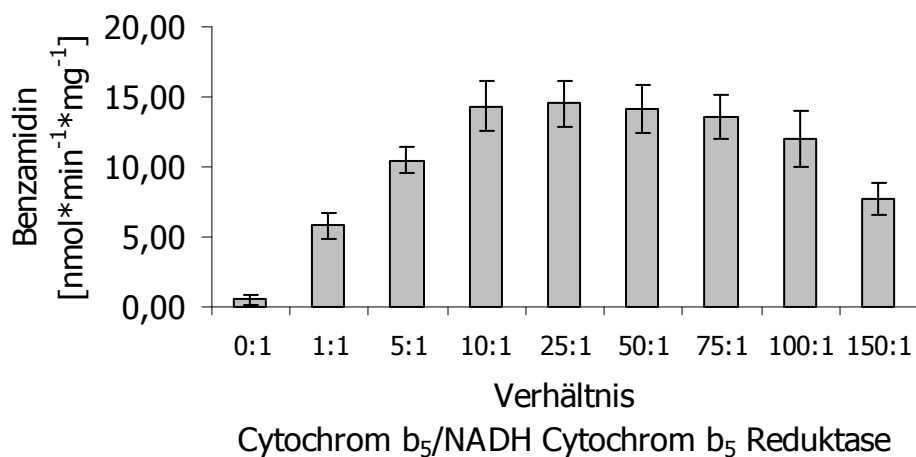


Abb. 6.2: Verhältnisabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Zweikomponentensystem. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0-200 pmol Cytochrom b_5 , 0,3-0,004 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 1 mM NADH und 500 μ M Benzamidoxim, 40 μ M DLPC in 150 μ l eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 6.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 6.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden. Die Daten beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte Proteinmenge.

6.3.1.3 Substratabhängigkeit

Die Substratabhängigkeit des Benzamidoxims war nahezu linear (Abb. 6.3). Die gebildete Benzamidinmenge konnte bei erhöhter Zugabe von Benzamidoxim immer weiter gesteigert werden.

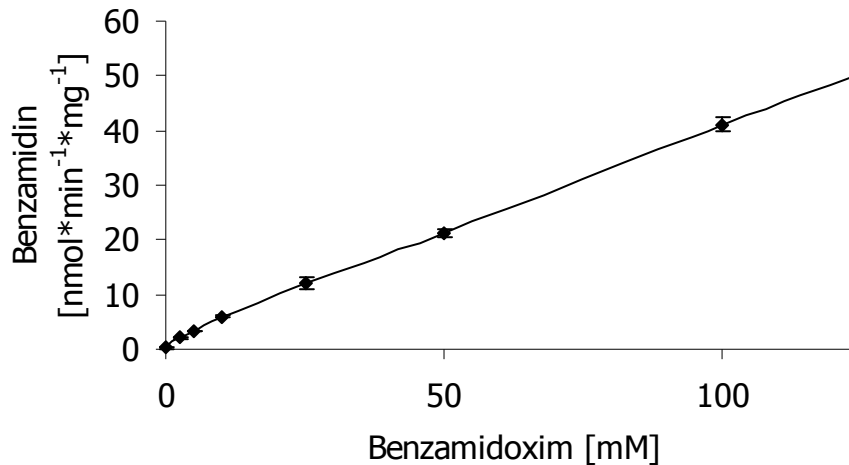


Abb. 6.3: Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Zweikomponentensystem. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 170 pmol Cytochrom b_5 , 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 1 mM NADH und 0-150 mM Benzamidoxim, 40 μ M DLPC in 150 μ l eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 6.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 6.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden. Die Daten beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte Proteinmenge.

6.3.2 Charakterisierung und Inkubationsoptimierung des Dreikomponentensystems

6.3.2.1 Inkubationszeit

Es wurde eine Abhängigkeit der Inkubationszeit mit den zwei Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase sowie dem gereinigten Moco-bindenden Enzym durchgeführt. Die Inkubationszeit für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin verlief über einen Zeitraum bis 30 Minuten linear. Wurde noch länger inkubiert, so nahm die Reaktionsgeschwindigkeit ab (Abb. 6.4). Gebildetes Benzamidin war bereits nach wenigen Minuten mit der weniger empfindlicheren HPLC-Methode (Kap. 6.2.3.1.3) bei 229 nm quantifizierbar.

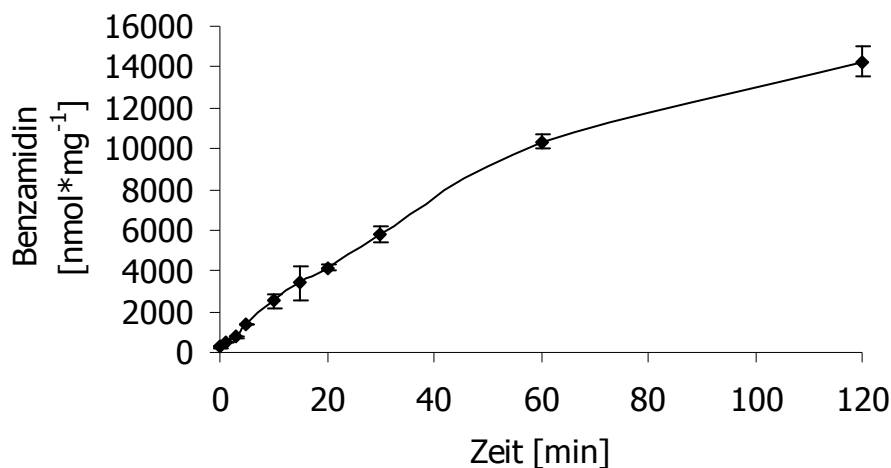


Abb. 6.4: Zeitabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Dreikomponentensystem. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 34 pmol Cytochrom b_5 , 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 10 μ l DEAE-Fraktion, 1 mM NADH und 0,5 mM Benzamidoxim, 40 μ M DLPC in 150 μ l eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3. Die Inkubationszeit betrug 0-120 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 6.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 6.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde. Die Daten beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte Proteinmenge.

6.3.2.2 Verhältnisabhängigkeit der zwei Elektronentransportproteine bei konstantem Proteingehalt sowie konstanter Zugabe des gereinigten Moco-bindenden Enzyms

Es wurde eine Abhängigkeit der zwei Elektronentransportproteine zueinander mit unterschiedlichen Verhältnissen durchgeführt. Hierbei wurde der Gehalt an NADH Cytochrom b_5 Reduktase in dem gleichen Maße erniedrigt, in welchem Cytochrom b_5 erhöht wurde, so dass ein konstanten Proteingehalt erhalten wurde. Zusätzlich ist das gereinigte Moco-bindende Enzym in konstanter Menge zugesetzt worden. Es konnte ein 1:1 Verhältnis der eingesetzten Elektronentransportproteine als das optimale Verhältnis festgestellt werden, danach fiel die Umsetzungsrate wieder ab (Abb. 6.5).

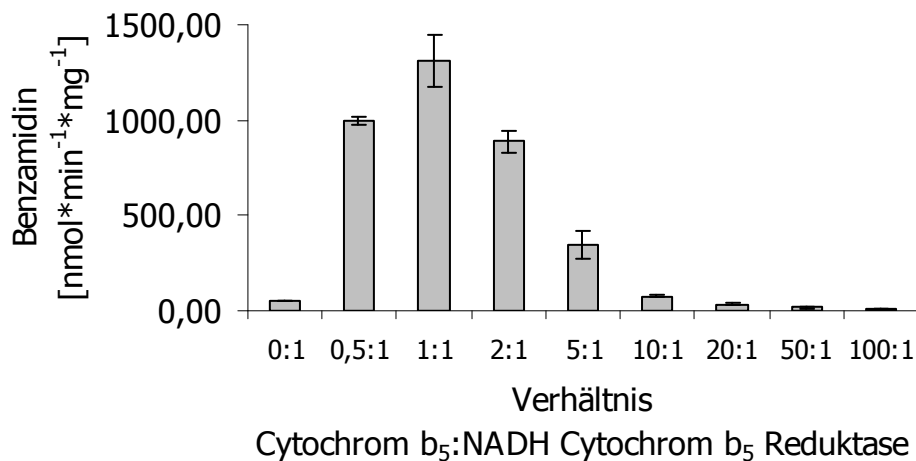


Abb. 6.5: Verhältnisabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Dreikomponentensystem. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0-200 pmol Cytochrom b_5 , 0,3-0,004 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 10 μ l DEAE-Fraktion, 1 mM NADH und 0,5 mM Benzamidoxim, 40 μ M DLPC in 150 μ l eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 6,3. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 6.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 6.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde. Die Daten beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte Proteinmenge.

6.3.2.3 pH-Wert

Die pH-Wertabhängigkeit ergab in einem Bereich von pH 4,0 bis pH 8,0 ein Optimum bei pH 5,7, wobei sich der Bereich zwischen pH 5,5 und pH 6,0 nicht signifikant unterschied (Abb. 6.6).

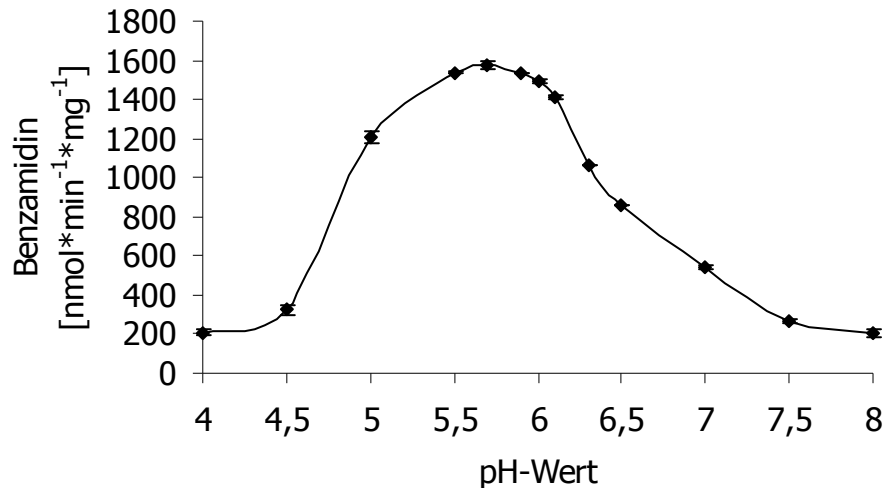


Abb. 6.6: pH-Wertabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Dreikomponentensystem. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 50 pmol Cytochrom b_5 , 0,15 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 10 μ l DEAE-Fraktion, 1 mM NADH und 0,5 mM Benzamidoxim, 40 μ M DLPC in 150 μ l eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 4,0-8,0. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 6.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 6.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde. Die Daten beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte Proteinmenge.

6.3.2.4 Substratabhängigkeit

Die Substratabhängigkeit des Benzamidoxims folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 6.7). Im Lineweaver-Burk-Plot betrug die Substratkonzentration bei halbmaximaler Sättigung (K_m) 0,5 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) $3,1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die sich daraus ergebende katalytische Effizienz lag bei $5,9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

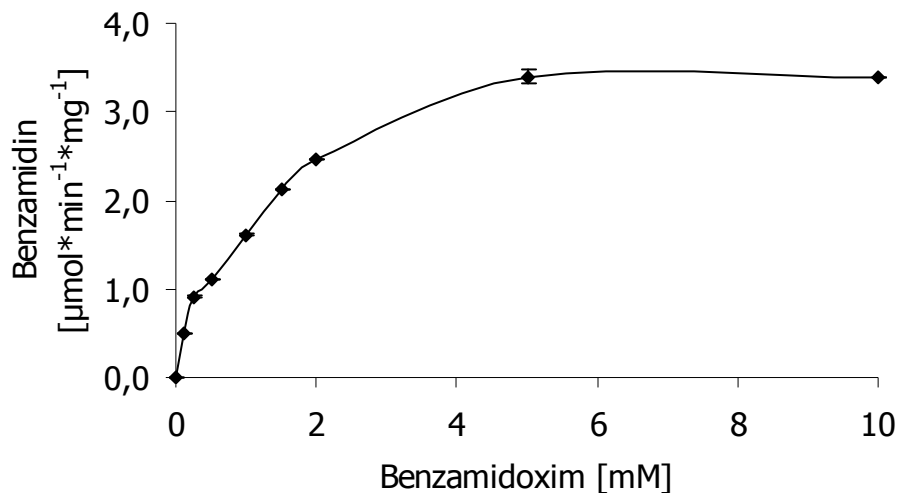


Abb. 6.7: Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Dreikomponentensystem. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 50 pmol Cytochrom b_5 , 0,15 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 10 μl DEAE-Fraktion, 1 mM NADH und 0-10 mM Benzamidoxim, 40 μM DLPC in 150 μl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 5,7. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 6.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 6.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde. Die Daten beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte Proteinmenge.

6.3.2.5 Cosubstratabhängigkeit

Die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin benötigte die Zugabe eines Cosubstrates. NADH wurde hierbei gegenüber NADPH bevorzugt (Abb. 6.8). Ab einer NADH-Konzentration von 1,5 mM sowie 5,0 mM im Fall des NADPH kam es zu keiner nennenswerten Steigerung der Umsatzrate. Im Lineweaver-Burk-Plot betrug die Cosubstratkonzentration bei halbmaximaler Sättigung (K_m) 1,5 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) $6,3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ für NADH. Die sich daraus ergebende katalytische Effizienz lag bei $4,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die Cosubstratkonzentration betrug für NADPH bei halbmaximaler Sättigung (K_m) 1,4 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) $2,0 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die sich daraus ergebende katalytische Effizienz lag bei $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Kontrollinkubationen ohne Cofaktor zeigten keine detektierbaren Mengen an gebildetem Benzamidin.

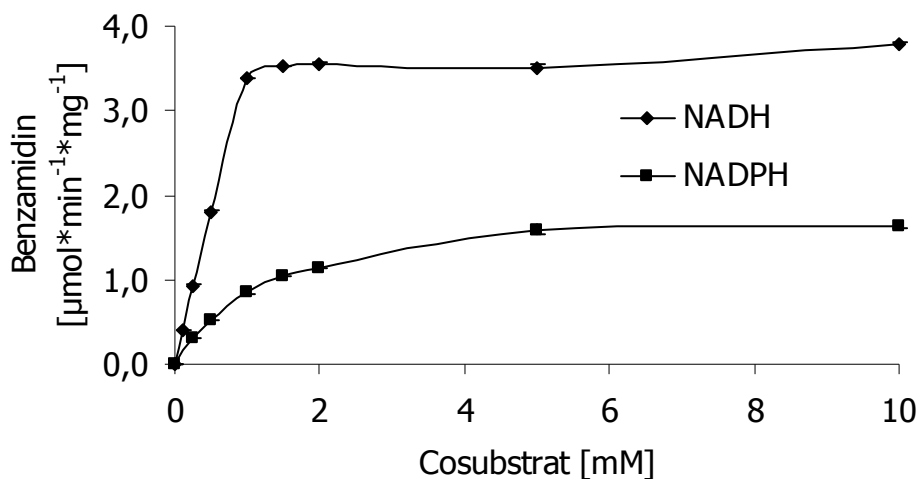


Abb. 6.8: Cosubstratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Dreikomponentensystem. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 50 pmol Cytochrom b_5 , 0,15 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 10 μl DEAE-Fraktion, 0-10 mM NADH bzw. 0-10 mM NADPH, 5 mM Benzamidoxim und 40 μM DLPC in 150 μl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 5,7. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 6.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 6.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde. Die Daten beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte Proteinmenge.

6.3.2.6 Verhältnisabhängigkeit des gereinigten Moco-bindenden Enzyms zum konstanten 1:1 Verhältnis der zwei Elektronentransportproteine

Für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin wurde das gereinigte Moco-bindende Enzym in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Reaktion ist steigerbar durch Zugabe des Moco-bindenden Enzyms, jedoch nähert sich die Aktivität einem Grenzwert an (Abb. 6.9).

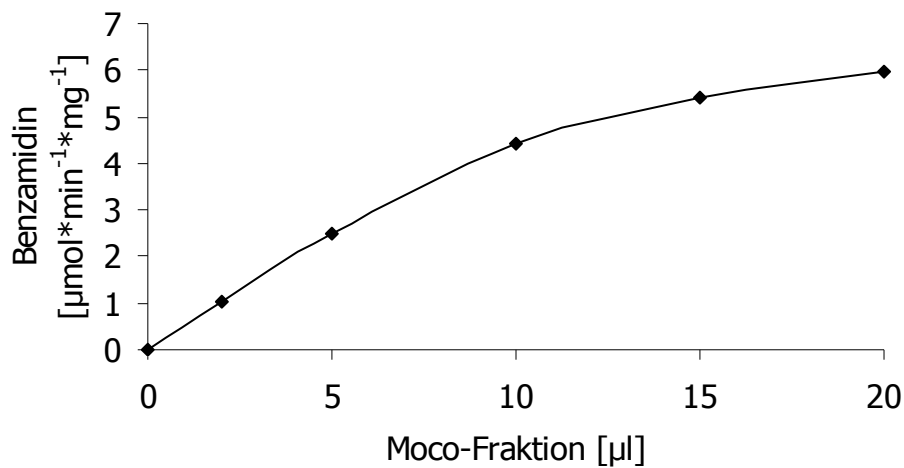


Abb. 6.9 Verhältnisabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Dreikomponentensystem. Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 50 pmol Cytochrom *b₅*, 0,15 U NADH Cytochrom *b₅* Reduktase, 0-20 µl DEAE-Fraktion, 2 mM NADH, 5 mM Benzamidoxim und 40 µM DLPC in 150 µl eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers pH 5,7. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze sind in Kapitel 6.2.3.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins fand mit der in Kapitel 6.2.3.1.3 beschriebenen HPLC-Analytik statt. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem Reaktionsansatz, welcher doppelt vermessen wurde. Die Daten beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte Proteinmenge.

6.4 Diskussion

In den Lebermikrosomen diverser Spezies ist die Beteiligung der beiden Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase beschrieben und gilt als gesichert [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 2005]. Gleiches konnte ebenfalls für die Lebermitochondrien des Schweins gezeigt werden [Havemeyer *et al.*, 2006]. In dieser Arbeit wurde die Beteiligung der beiden Enzyme Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase mittels der Inhibitoren Cytochrom c und p -Hydroxymercuribenzoat für die Nierenmikrosomen und -mitochondrien aus dem Schwein bestätigt (Kapitel 2.3.7.4.3-4 und 3.3.1.6.3-4).

Es sollte der Einfluss des Häm/Flavin-Verhältnisses im Zwei- und Dreikomponentensystem für die Benzamidoxim-Reduktase untersucht werden. Beschrieben ist ein physiologisches Verhältnis der beiden membranständigen Enzyme zueinander mit einem etwa zehnfachen Überschuss des Hämproteins im Vergleich zum Flavoprotein im Endoplasmatischen Retikulum [Rogers und Strittmatter, 1974; Kadlubar und Ziegler, 1974; Yang und Ceederbaum, 1996]. Für die beiden löslichen Enzyme wurde ein ähnliches Verhältnis bei der Reduktion von Hydroxylaminen und Amidoximen gefunden, welches zwischen acht- und zehnfachem Überschuss des Hämproteins liegt [Kurian *et al.*, 2004]. Yubisui und Takeshita [1980] ermittelten eine Korrelation zwischen Flavingehalt und der Enzymaktivität der NADH Cytochrom b_5 Reduktase, bei der 1 U lösliche NADH Cytochrom b_5 Reduktase etwa 340 pmol Flavin entspricht.

Die beiden Elektronentransportproteine wurden in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen zusammen inkubiert und ihre N -reduktive Aktivität bestimmt (Abb. 6.2). Die Bestimmung des gebildeten Benzamidins wurde mit einer sehr empfindlichen Methode (Kapitel 6.2.3.1.3) bestimmt. Durch die Messung bei 201 nm konnte die Bestimmungsgrenze gegenüber der Messung bei 229 nm um den Faktor 100 gesenkt werden. Dabei wurde ab einem Verhältnis von zehn Teilen Häm zu einem Teil Flavin eine kaum noch nennenswerte Erhöhung der Reduktion erzielt. Dieses Ergebnis entspricht den beschriebenen Daten für Mikrosomen [Rogers und Strittmatter, 1974; Kadlubar und Ziegler, 1974; Yang und Ceederbaum, 1996; Kurian *et al.*, 2004]. Eine darüber hinausgehende deutliche Erhöhung des Hämanteils zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das gebildete Benzamidin. Bei dieser Untersuchung wurde der Proteingehalt konstant gehalten, was bedeutete, dass die sukzessive Erhöhung des Häms eine gleichzeitige Erniedrigung des Flavins mit sich brachte.

Daten über das Cytochrom b_5 /NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Verhältnis in der äußeren mitochondrialen Membran von Nieren sind bisher nicht beschrieben. In der äußeren mitochondrialen Membran der Rattenleber konnte im Gegensatz zum endoplasmatischen Retikulum der Rattenleber etwa fünfmal soviel an NADH Cytochrom b_5 Reduktase detektiert werden [Borgese und Pietrini, 1986]. Im Gegenzug wurden aber nur 50 % des detektierbaren Cytochrom b_5 Gehalts in der äußeren mitochondrialen Membran gegenüber den Rattenlebermikrosomen bestimmt [D'Arrigo *et al.*, 1993]. Werden diese Daten miteinander verknüpft, so ergibt sich für die äußere mitochondriale Membran ein 1:1 Verhältnis. Somit scheinen sich die tatsächlichen Verhältnisse in der äußeren mitochondrialen Membran von denen im endoplasmatischen Retikulum zu unterscheiden und eher einem gleichwertigen Verhältnis näher zu kommen.

Die Substratabhängigkeit verlief im Zweikomponentensystem im Bereich von 0-125 mM Benzamidoxim linear. Hierbei wurde das vorher optimierte 10:1 Verhältnis zwischen Häm und Flavin eingesetzt (Abb. 6.3). Die Reaktion ist somit nicht sättigbar. Eine lineare Abhängigkeit spricht normalerweise nicht für eine enzymkatalysierte Reaktion. Kurian *et al.* [2004] und Saulter *et al.* [2005] prognostizierten die Abhängigkeit der Reduktion von diesem Zweikomponentensystem mit löslichen Enzymen im 10:1 Verhältnis zugunsten des Cytochrom b_5 . In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen ausschließlich mit membrangebundenen Enzymen gearbeitet. Die Daten sind somit nicht in allen Einzelheiten vergleichbar. Mitochondrien und Mikrosomen, die als Modelle die physiologische Situation besser simulieren können, zeigten eine Michaelis-Menten Kinetik. Da diese Kinetik im Zweikomponentensystem nicht erzielt werden konnte, ist die Übertragbarkeit dieses *in vitro* Modells auf die *in vivo* Verhältnisse anzuzweifeln.

Das Dreikomponentensystem bestehend aus Cytochrom b_5 , seiner Reduktase und dem gereinigten Moco-bindenden Enzym zeigt in der Abhängigkeit der Inkubationszeit in den ersten 30 Minuten eine Linearität, danach konnte die pro Zeit gebildete Benzamidinmenge nicht mehr wesentlich gesteigert werden (Abb. 6.4).

In der Untersuchung des Dreikomponentensystems bezüglich der Verhältnisabhängigkeit der Enzyme Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase zueinander wurden diese in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen inkubiert und ihre *N*-reduktive Aktivität bestimmt (Abb. 6.5). Die Zunahme von Cytochrom b_5 wurde durch Abnahme seiner Reduktase ausgeglichen, so dass der Proteingehalt konstant gehalten werden konnte. Zudem wurde eine konstante Menge des in dieser Arbeit gereinigten Moco-bindenden Enzyms zugesetzt. Hierbei konnte zwischen Cytochrom b_5 und seiner Reduktase ein 1:1 Verhältnis als optimal ermittelt werden.

Die deutliche Steigerung der gebildeten Benzamidinmenge zeigte die Überlegenheit des Dreikomponentensystems gegenüber dem Zwei-komponentensystem.

Eine mögliche Erklärung für die starke Hemmung des Dreikomponentensystems bei erhöhter Cytochrom b_5 Zugabe ist in der Konkurrenz zwischen dem Drei- und Zweikomponentensystem zur Reduktion von Benzamidoxim zu finden. Das Zweikomponentensystem scheint das Dreikomponentensystem zu entkoppeln. Die sehr hohe Wechselzahl des Cytochrom b_5 mit seiner Reduktase (etwa $900 \text{ Cytochrom } b_5 \cdot \text{s}^{-1}$) [Shirabe *et al.*, 1992] ist bei erhöhter Cytochrom b_5 Menge nicht mehr in der Lage, noch Elektronen auf das in dieser Arbeit gereinigte Moco-bindende Enzym zu übertragen. Das optimierte 1:1 Verhältnis zwischen dem Cytochrom b_5 und seiner Reduktase scheint dem physiologischen Verhältnis der äußeren mitochondrialen Membran auch eher zu entsprechen.

Das pH-Optimum wurde für das Dreikomponentensystem bei 5,7 gefunden, wobei der Bereich zwischen pH 5,5 und pH 6,0 nicht signifikant unterschiedlich war (Abb. 6.6). Oberhalb von pH 6,0 sowie unterhalb von pH 5,5 verringerte sich die Umsatzrate sehr stark. Das Ergebnis entsprach den Daten, die vorher für die Mitochondrien sowie für die äußere mitochondriale Membran gefunden wurden (Abb. 3.3 sowie 4.3) und deutet daraufhin, dass es sich wahrscheinlich jeweils um das gleiche Enzymsystem handelt. Lediglich der optimale pH-Wert selbst verschob sich in den jeweiligen Reinigungsstufen weiter in den sauren Bereich, was für die mikrosomale Benzamidoxim-Reduktase in der Schweineleber auch schon festgestellt wurde [Lomb, 1995].

Die Substratabhängigkeit des Dreikomponentensystems folgte im Gegensatz zum Zweikomponentensystem einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 6.7). Der K_m -Wert des in dieser Arbeit optimierten Enzymsystems lag bei 0,5 mM, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung lag bei $V_{\max} = 3,1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die sich daraus ergebende katalytische Effizienz lag bei $5,9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Der Cosubstratvergleich zeigte eine deutlich höhere Umsatzrate von Benzamidoxim zu Benzamidin mit NADH im Vergleich zu NADPH (Abb. 6.8). Der K_m -Wert für das Cosubstrat NADH lag bei 1,5 mM, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung $V_{\max} = 6,3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und die sich daraus ergebende katalytische Effizienz bei $4,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Der K_m -Wert für das Cosubstrat NADPH lag bei 1,4 mM, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung $V_{\max} = 2,0 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und die sich daraus ergebende katalytische Effizienz bei $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Wie sich schon für die Mitochondrien sowie für die äußere mitochondriale Membran zeigte, wurde die Sättigung des Systems mit NADH sehr viel schneller erhalten, als im Vergleich zu NADPH (Abb. 3.5, 4.5). Auch diese ähnlichen Eigenschaften unterstützen die These, dass in den drei

unterschiedlichen Reinigungsstufen jeweils das gleiche Enzymsystem für die Reduktion von Benzamidoxim verantwortlich war.

Das System aus Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase wurde noch mit der Zugabe des in dieser Arbeit gereinigten Moco-bindenden Enzyms optimiert (Abb. 6.9). Die Reaktion ist steigerbar durch Zugabe des Moco-bindenden Enzyms, jedoch nähert sich die Aktivität einem Grenzwert an. Weitere Experimente zur Untersuchung der sättigbaren Reaktion sollten zur Aufklärung des Mechanismus durchgeführt werden.

6.5 Zusammenfassung

Es wurde das Zweikomponentensystem bestehend aus Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase mit dem Dreikomponentensystem bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und dem in dieser Arbeit gereinigten Moco-bindenden Enzym hinsichtlich ihrer Fähigkeiten zur Reduktion von Benzamidoxim verglichen.

Das Zweikomponentensystem ist in der Lage, Benzamidoxim zu Benzamidin zu reduzieren. Ein optimiertes System der zwei Enzyme zueinander bestand aus zehn Teilen Cytochrom b_5 zu einem Teil seiner Reduktase. Dieses Verhältnis wurde in Mikrosomen sowie für die löslichen Enzyme ebenfalls gefunden. In der äußeren mitochondrialen Membran scheint aber dieses Verhältnis nicht physiologisch zu sein. Interessanterweise war für dieses System die Reduktion von Benzamidoxim nicht sättigbar, sondern verlief linear. Die vorher untersuchten Mitochondrien sowie die äußere mitochondriale Membran folgten hingegen einer Michaelis-Menten Kinetik, so dass die *in vitro-in vivo* Korrelation des Zweikomponentensystems anzuzweifeln ist.

Das Dreikomponentensystem ist ebenfalls in der Lage, Benzamidoxim zu Benzamidin zu reduzieren. Die erzielte Umsatzrate überstieg bei weitem diejenige, die im Zweikomponentensystem erreicht wurde. Außerdem folgte das Dreikomponentensystem einer Michaelis-Menten Kinetik, was für eine enzymatische Umsetzung sprach und damit vergleichbar zu den Daten aus den Mitochondrien sowie der äußeren mitochondrialen Membran war. Eine Optimierung des Cytochrom b_5 und seiner Reduktase führte zu einem 1:1 Verhältnis dieser zwei Enzyme, während das in dieser Arbeit gereinigte Moco-bindende Enzym eher einem katalytischen Einfluss gleich kam, da die Reaktionsgeschwindigkeit zunächst stark gesteigert werden konnte, sich aber einem Maximalwert annäherte. Das 1:1 Verhältnis des Cytochrom b_5 zu seiner Reduktase scheint dem physiologischen Verhältnis näher zu kommen, da verschiedene Arbeiten zeigen konnten, dass der Cytochrom b_5 Gehalt in der äußeren mitochondrialen Membran gegenüber Mikrosomen erniedrigt ist, während die NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivität deutlich erhöht ist. Auch wenn diese Daten aus Untersuchungen mit Rattenleber stammen und Erkenntnisse hierzu in der Niere bisher fehlen, so deuten die Ergebnisse in dieser Arbeit auf ähnliche Verhältnisse hin.

7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den enzymatischen Grundlagen der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen in der Schweineleiere. Als Zellkompartimente wurden Mikrosomen und Mitochondrien verwendet, als Modells substrat Benzamidoxim (Abb. 7.1). Das Modells substrat zeigt ähnliche Charakteristika der Reduktion zum Benzamidin im Vergleich zu den Arzneistoffen Ximelagatran oder Sibrafiban [Clement, 2002], so dass die in dieser Arbeit erhaltenen Daten auf zukünftige Arzneistoffentwicklungen übertragen werden können.

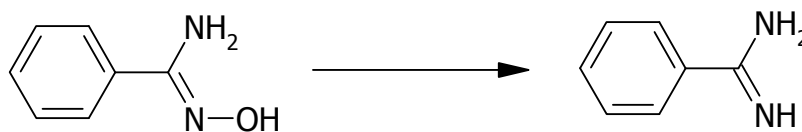


Abb. 7.1: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin

Hemmstudien der renalen Zellkompartimente deuteten auf identische *N*-reduktive Enzymsysteme der Benzamidoxim-Reduktase mit den literaturbeschriebenen Hydroxylaminreduktasen [Bernheim, 1969; Kadlubar und Ziegler, 1974] hin. Dabei wiesen die NADH-abhängigen Benzamidoxim-Reduktasen der Mikrosomen und der Mitochondrien die typischen Charakteristika der hepatischen sauerstoffinsensitiven Benzamidoximreduktion auf [Clement *et al.*, 1988b; Clement *et al.*, 2005b]. Die Beteiligung der Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase sowie einer dritten Komponente, wie sie für das hepatische System schon beschrieben ist [Clement *et al.*, 1997; Havemeyer *et al.*, 2006], konnte für das renale System ebenfalls bestätigt werden.

Trotz dieser Übereinstimmungen gelang eine Übertragung der etablierten Methode zur Gewinnung des mikrosomalen Enzymsystems von der Leber auf die Niere nicht. Die in den Lebermikrosomen postulierte dritte Komponente ist ein Cytochrom P450 Isoenzym der Subfamilie 2D. Dies gab Anlass, die Reinigung an literaturbeschriebene Methoden zur Isolierung von Cytochrom P450 Isoenzymen anzupassen. Dabei wurde eine Cytochrom P450 Fraktion aus den Nierenmikrosomen erhalten, die allerdings nicht in der Lage war, im rekonstituierten System mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase Benzamidoxim zu Benzamidin zu reduzieren.

Mit der *O*-Demethylierung von Dextromethorphan als Markerreaktion für CYP2D konnte gezeigt werden, dass es bei den Nierenmikrosomen im Vergleich zu den

Lebermikrosomen zu einer vierfach geringeren *O*-Demethylierung von Dextromethorphan kommt. Allerdings reduzieren Nierenmikrosomen deutlich besser Benzamidoxim zu Benzamidin als Lebermikrosomen. In der Literatur ist eine mRNA Verteilung des CYP2D6 im Menschen zwischen Niere und Leber von 1:100 aufgeführt [Nishimura *et al.*, 2003]. Spezifische Immunoblotanalysen zum CYP2D Nachweis als Vergleich zwischen Maus und Mensch zeigten ähnliche Verhältnisse [Miksys *et al.*, 2005], welches zwar die niedrigere *O*-Demethylierungsrate der Nierenmikrosomen erklärt, nicht aber die erhöhte Reduktionsrate von Benzamidoxim.

Daher wurde eine neue Reinigung an einem Anionenaustauscher durchgeführt. Die Reinigung war nicht mehr speziell auf die Isolierung von CYP450 Enzymen ausgelegt. In einer Fraktion, welche kein Cytochrom b_5 und keine NADH Cytochrom b_5 Reduktase enthielt, konnte durch Zusatz dieser beiden Elektronentransportproteine die Reduktase-Aktivität rekonstituiert werden. Dieses System zeigte eine etwa 20fach höhere spezifische Aktivität der Benzamidoxim-Reduktase als die ursprünglichen Mikrosomen. Die gereinigte Fraktion enthielt kein detektierbares Cytochrom P450 und war auch nicht in der Lage, Dextromethorphan zu *O*-demethylieren.

In den gewonnenen Mikrosomen wurde als eine mitochondriale Verunreinigung Monoaminoxidase gefunden. Havemeyer *et al.* [2006] isolierten aus der äußeren mitochondrialen Membran der Schweineleber ein Molybdoenzym, welches mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase Benzamidoxim reduzierte. Deshalb wurde die aktive Fraktion der Anionenaustauscherchromatographie auf das von Havemeyer [2006] entdeckte mitochondriale Molybdoenzym aus der Schweineleber untersucht. Mit Immunoblot-Analyse und spezifischen Enzymnachweisen konnte das Molybdoenzym in der aktiven Fraktion nach dem Anionenaustauscher detektiert werden. Auch wenn noch mehrere Enzyme in dieser aktiven Fraktion nachgewiesen werden konnten, so sind die Anreicherungsfaktoren der Benzamidoxim-Reduktase und der Enzymnachweise für das molybdänhaltige Enzym vergleichbar.

Auf Grund der in dieser Arbeit zusammengestellten Daten kann davon ausgegangen werden, dass das mikrosomale CYP2D Enzym der Schweineleber nicht als die verantwortliche dritte Komponente der Schweinenierenmikrosomen in Frage kommt.

Zur weiteren Untersuchung wurden Schweinenierenmitochondrien hoch gereinigt. Aus diesen wurde die äußere mitochondriale Membran gewonnen und die *N*-reduktive Aktivität mittels enzymatischer Testverfahren auf dieser Membran lokalisiert.

Durch eine Anionenaustauschchromatographie konnte eine molybdäncofaktorhaltige Enzymfraktion gewonnen werden, welche kein Cytochrom b_5 und keine NADH

Cytochrom b_5 Reduktase enthielt und erst nach Zugabe der beiden Elektronentransportproteine Benzamidoxim zu reduzieren vermochte. Die Isolierung fand nach der von Havemeyer [2006] entwickelten Methode mit leichten Modifikationen statt und war somit von Leber auf Niere übertragbar. Es wurde eine 240-fache Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität erzielt.

Die Auswertung der massenspektrometrischen Analyse des isolierten Enzyms ergab ein 35 kDa Molybdoprotein, welches zumindest eine verantwortliche dritte Komponente im Enzymsystem der Nierenmitochondrien darstellt. Zusätzliche Hemmstudien zeigten ebenfalls die Anreicherung des Molybdäncofaktors im Verlauf der Reinigung von den Mitochondrien bis hin zur isolierten Fraktion.

Da für die zwei Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase bekannt ist, dass sie Benzamidoxim auch allein reduzieren können [Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005], wurde dieses Zweikomponentensystem mit dem Dreikomponentensystem bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und dem isolierten Molybdoenzym im Hinblick auf die Umsetzungsraten der Reduktion von Benzamidoxim verglichen. Das Zweikomponentensystem bevorzugte dabei ein 10:1 Verhältnis zwischen Häm- und Flavinkomponente, während das Dreikomponentensystem eher einem 1:1 Verhältnis zwischen Cytochrom b_5 und seiner Reduktase gleich kam. Zudem konnte die deutliche Überlegenheit des Dreikomponentensystems gegenüber dem Zweikomponentensystem in Form einer wesentlich erhöhten Reduktionsrate gezeigt werden. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass NADH als Co-Substrat gegenüber NADPH deutlich bevorzugt war.

Damit konnte erstmals ein molybdäncofaktorabhängiges Enzymsystem aus der Niere von Säugetieren isoliert werden, dessen Aufbau und Zusammensetzung der Nitratreduktase autotropher Organismen ähnelt [Campbell, 1999].

Der eindeutige Nachweis des Enzyms in den Schweinenierenmitochondrien bestätigt das Ergebnis des isolierten Enzyms aus den Schweinelebermitochondrien.

Der gleichzeitige Nachweis in den Schweinenierenmikrosomen gibt einen Hinweis auf eine mögliche Co-Expimierung des Enzyms im endoplasmatischen Retikulum. Eine weitere Charakterisierung der Mikrosomen sollte vor allem im Hinblick auf die Verunreinigung mit äußerer mitochondrialer Membran fortgeführt werden.

Im Weiteren sollte das hier isolierte Enzymsystem auf die Reduktionsfähigkeit von aliphatischen und aromatischen Hydroxylaminen, *N*-Hydroxyguanidinen, *N*-Hydroxy-

amidinohydrazonen und Oximen getestet werden. Gerade die Reduktion von Hydroxylaminen ist von großer Bedeutung, da diese häufig ein genotoxisches Potential besitzen und u. a. durch die Reduktion detoxifiziert werden.

Die Ergebnisse zeigen zudem, dass das in dieser Arbeit isolierte Enzym der Niere hinsichtlich der Aktivität dem der Leber ähnlich ist.

Da das isolierte Enzym aus dem Mitochondrium stammt, eröffnen sich aus dieser Tatsache neue Ansätze in der Metabolismusforschung. Bisher sind neben Leber und Niere auch Darm, Gehirn und Fettzellen auf Benzamidoxim-Reduktase hin untersucht worden, allerdings bis auf die Fettzellen nur mikrosomal. Andersson *et al.* [2005] erkannten, dass Fettzellen besonders hohe Reduktionsraten von Benzamidoxim aufwiesen. Da gerade Fettzellen zu einem sehr hohen Stoffwechselumsatz in der Lage sind, ist in ihnen auch eine sehr hohe Zahl von Mitochondrien vorhanden und die hohe Reduktionsrate erscheint verständlich. Zu den Zellen mit den höchsten Mitochondrienzahlen gehören die Eizelle und die Herzmuskelzelle. Eine Untersuchung der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen in diesen Zellen ist sicherlich von großem Interesse, da die Detoxifizierung von genotoxischen Substanzen durch diese Zellen noch nicht bekannt ist.

8 MATERIALIEN UND GERÄTE

8.1 Substanzen und sonstige Materialien

Die verwendeten Chemikalien stammten, soweit nicht anders in der Tabelle aufgeführt, von der Firma Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz).

Alle verwendeten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Reinheit bezogen.

Substanz	Firma
Acetonitril	J.T. Baker, Deventer, Holland
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniak	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Argon	Messer Griesheim GmbH, Krefeld
BCA-Kit zur Proteinbestimmung	Pierce, Rockford, USA
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Cellstar [®] Flaschen, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Coomassie [®] Brilliant blue R 250	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
Cytochrom c	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Eisen(III)Chlorid-Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Eisessig	J.T. Baker, Deventer, Holland
Emulgen [®] 911	Kao Chemicals, Tokio, Japan
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Hydroxylamin-HCl	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumcyanid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Merck KGaA, Darmstadt
Kohlenmonoxid	Messer Griesheim GmbH, Krefeld
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumcholat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumdithionit	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
NADPH	Roche Diagnostics, Mannheim
1-Ocylsulfonat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ortho-Phosphorsäure, 85 %	Merck KGaA, Darmstadt
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Silberfärbe Kit	GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden
Triton [®] X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Zwittergent [®] 3-14	Calbiochem, SanDiego, USA

8.2 Geräte

Gerät	Firma
Econo-Chromatographiesäule 2,5*10 cm	Bio-Rad, München
Einmalküvetten mikro, Zentrumshöhe 15 mm, Volumen 70-550 µl	Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim
Einmalküvetten, 500-1000 µl	Sarstedt, Nürnberg
Fraktionssammler Redi frac	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Gelelektrophoresekammer Modell 2001	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Geltrockner Modell 2003	LKB, Bromma, Schweden
Gradientenformer GM-1	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E, Rotor JA 10 und JA 14	Beckman, München
IKA-Vibrax-VXP	Janke & kunkel GmbH & Co KG, Staufen
ISMATEC Schlauchpumpe für Niederdruckchromatographiesäulen Typ MCP ISM 726	ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld
Jupiter Fleischwolf Typ 885	Jupiter Kitchen Tools GmbH, Schorndorf
Magnetkernrührer MR mini	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Messer-Homogenisator	Eigenbau der Universität Austin, Texas
Millipore Schlauchpumpe für Organperfusion Modell XX8200230	Millipore GmbH, Schwalbach
pH-Messgerät inoLab [®] pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim
Pipetten Reference [®] Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonpistill	B. Braum Biotech International, Melsungen
Schüttelwasserbad GFL 1087	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Spektralphotometer Varian Cary [®] 50 Bio mit Water Peltier System PVB 150	Varian GmbH, Darmstadt
Temperiereinheit für Gelelektrophoresekammer Julabo C/F20	Julabo, Labortechnik GmbH, Seelbach

Tischzentrifuge Hettich Mikro 200	Hettich Zentrifuge, Tuttlingen
Ultraschallbad, Sonorex, Super RK 510H	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45Ti	Beckman, München
Vortexer VF2	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Waage, MC 1, Laboratory LC 620 P	Sartorius, Göttingen
Waage, MC 1, Research CP 225 D	Sartorius, Göttingen
Zweistrahlfotometer Uvikon 930	Kontron, Neufahrn

9 LITERATURVERZEICHNIS

ABE, K.; KIMURA, S.; KIZAWA, R.; ANAN, F. K. UND SUGITA, Y.

Amino acid sequences of cytochrome b5 from human, porcine, and bovine erythrocytes and comparison with liver microsomal cytochrome b5. *J Biochem (Tokyo)* (1985), 97, 1659-1668.

ACARA, M.

Renal Pharmacology-Diuretics. In: *Textbook of pharmacology*. Reynard, A. M., Smith, C. M., WB Saunders: Philadelphia (1992), 554-588.

ACARA, M.; CAMIOLO, S. UND RENNICK, B.

Renal N-oxidation of trimethylamine in the chicken during tubular excretion. *Drug Metab Dispos* (1977), 5, 82-90.

ACARA, M.; GESSNER, T.; GREIZERSTEIN, H. UND TRUDNOWSKI, R.

Renal N-oxidation of meperidine by the perfused kidney of the rat. *Drug Metab Dispos* (1981), 9, 75-79.

ACARA, M. UND RENNICK, B.

Renal tubular transport of choline: modifications caused by intrarenal metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* (1972), 182, 1-13.

ACARA, M. UND RENNICK, B.

Regulation of plasma choline by the renal tubule: bidirectional transport of choline. *Am J Physiol* (1973), 225, 1123-1128.

ACARA, M.; ROCH-RAMEL, F. UND RENNICK, B.

Bidirectional renal tubular transport of free choline: a micropuncture study. *Am J Physiol* (1979), 236, F112-118.

AGARWAL, D. P.; ECKEY, R.; RUDNAY, A. C.; VOLKENS, T. UND GOEDDE, H. W.

"High Km" aldehyde dehydrogenase isozymes in human tissues: constitutive and tumor-associated forms. *Prog Clin Biol Res* (1989), 290, 119-131.

ALBERT, A.; GOLDACRE, R. J. UND PHILLIPS, J.

Strength of heterocyclic bases. *Journal of the Chemical Society* (1948), 2240-2249.

ALTUVE, A.; SILCHENKO, S.; LEE, K. H.; KUCZERA, K.; TERZYAN, S.; ZHANG, X.; BENSON, D. R. UND RIVERA, M.

Probing the differences between rat liver outer mitochondrial membrane cytochrome b5 and microsomal cytochromes b5. *Biochemistry* (2001), 40, 9469-9483.

ALTUVE, A.; WANG, L.; BENSON, D. R. UND RIVERA, M.

Mammalian mitochondrial and microsomal cytochromes b(5) exhibit divergent structural and biophysical characteristics. *Biochem Biophys Res Commun* (2004), 314, 602-609.

AMBROZIAK, W. UND PIETRUSZKO, R.

Metabolic role of aldehyde dehydrogenase. *Adv Exp Med Biol* (1993), 328, 5-15.

ANDERS, M. W.

Metabolism of drugs by the kidney. *Kidney Int* (1980), 18, 636-647.

ANDERS, M. W. UND DEKANT, W.

Aminoacylases. *Adv Pharmacol* (1994), 27, 431-448.

ANDERS, M. W.; LASH, L.; DEKANT, W.; ELFARRA, A. A. UND DOHN, D. R.

Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. *Crit Rev Toxicol* (1988), 18, 311-341.

ANDERSON, M. E. UND MEISTER, A.

Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J Biol Chem* (1980), 255, 9530-9533.

ANDERSSON, S.; HOFMANN, Y.; NORDLING, A.; LI, X. Q.; NIVELIUS, S.; ANDERSSON, T. B.; INGELMAN-SUNDBERG, M. UND JOHANSSON, I.

Characterization and partial purification of the rat and human enzyme systems active in the reduction of N-hydroxymelagatran and benzamidoxime. *Drug Metab Dispos* (2005), 33, 570-578.

AOYAMA, T.; NAGATA, K.; YAMAZOE, Y.; KATO, R.; MATSUNAGA, E.; GELBOIN, H. V. UND GONZALEZ, F. J.

Cytochrome b5 potentiation of cytochrome P-450 catalytic activity demonstrated by a vaccinia virus-mediated in situ reconstitution system. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990), 87, 5425-5429.

ARDAIL, D.; GASNIER, F.; LERME, F.; SIMONOT, C.; LOUISOT, P. UND GATEAU-ROESCH, O.

Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* (1993), 268, 25985-25992.

ARINC, E.; GURAY, T.; SAPLAKOGLU, U. UND ADALI, O.

Purification and characterization of two forms of soluble NADH cytochrome b5 reductases from human erythrocytes. *Comp Biochem Physiol B* (1992), 101, 235-242.

AXELROD, J.

The enzymatic N-methylation of serotonin and other amines. *J Pharmacol Exp Ther* (1962), 138, 28-33.

BACH, A. W.; LAN, N. C.; JOHNSON, D. L.; ABELL, C. W.; BEMBENEK, M. E.; KWAN, S. W.; SEEBURG, P. H. UND SHIH, J. C.

cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988), 85, 4934-4938.

BANERJEE, P.; JOO, J. B.; BUSE, J. T. UND DAWSON, G.

Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. *Chem Phys Lipids* (1995), 77, 65-78.

BANSAL, S. K.; LOVE, J. H. UND GURTOO, H. L.

Resolution of multiple forms of cytochrome P-450 by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1984), 297, 119-127.

BARON, J.; HILDEBRANDT, A. G.; PETERSON, J. A. UND ESTABROOK, R. W.

The role of oxygenated cytochrome P-450 and of cytochrome b5 in hepatic microsomal drug oxidations. *Drug Metab Dispos* (1973), 1, 129-138.

BEATTIE, D. S.

Enzyme localization in the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* (1968), 31, 901-907.

BECKETT, G. J.; HOWIE, A. F.; HUME, R.; MATHAROO, B.; HILEY, C.; JONES, P. UND STRANGE, R. C.

Human glutathione S-transferases: radioimmunoassay studies on the expression of alpha-, mu- and pi-class isoenzymes in developing lung and kidney. *Biochim Biophys Acta* (1990), 1036, 176-182.

BEEBE, L. E.; FORNWALD, L. W.; ALWORTH, W. L.; DRAGNEV, K. H. UND LUBET, R. A.

Effect of dietary Aroclor 1254 exposure on lung and kidney cytochromes P450 in female rats: evidence for P4501A2 expression in kidney. *Chem Biol Interact* (1995), 97, 215-227.

BEEDHAM, C.

The role of non-P450 enzymes in drug oxidation. *Pharm World Sci* (1997), 19, 255-263.

BEHRENS, D.

Reduktion von N-hydroxylierten Verbindungen durch Cytochrom P450 Isoenzyme aus Schweineleber und humaner Leber. Kiel, *Dissertation* (1999).

BENZ, R.

Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* (1994), 1197, 167-196.

BERGER, K.

Vergleichende Charakterisierung zweier CYP2D-Enzyme. Kiel, *Dissertation* (2002).

BERGMAN, T. UND POSTLIND, H.

Characterization of pig kidney microsomal cytochrome P-450 catalysing 25-hydroxylation of vitamin D3 and C27 steroids. *Biochem J* (1990), 270, 345-350.

BERNARDI, P. UND AZZONE, G. F.

Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem* (1981), 256, 7187-7192.

BERNHEIM, M. L.

The hydroxylamine reductase of mitochondria. *Arch Biochem Biophys* (1969), 134, 408-413.

BERNHEIM, M. L.

The reduction of hydroxylamine and some aryl hydroxamates by liver mitochondria from mammals and birds. *Enzymologia* (1972), 43, 167-176.

BERNHEIM, M. L. UND HOCHSTEIN, P.

Reduction of hydroxylamine by rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* (1968), 124, 436-442.

BESSEGHIR, K. UND ROCH-RAMEL, F.

Renal excretion of drugs and other xenobiotics. *Ren Physiol* (1987), 10, 221-241.

BITTNER, F.; OREB, M. UND MENDEL, R. R.

ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* (2001), 276, 40381-40384.

BJORNSSON, T. D.; CALLAGHAN, J. T.; EINOLF, H. J.; FISCHER, V.; GAN, L.; GRIMM, S.; KAO, J.; KING, S. P.; MIWA, G.; NI, L.; KUMAR, G.; MCLEOD, J.; OBACH, S. R.; ROBERTS, S.; ROE, A.; SHAH, A.; SNIKERIS, F.; SULLIVAN, J. T.; TWEEDIE, D.; VEGA, J. M.; WALSH, J. UND WRIGHTON, S. A.

The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a PhRMA perspective. *J Clin Pharmacol* (2003), 43, 443-469.

BLAGBROUGH, I. S.; BYCROFT, B. W.; EVANS, D. C. UND SHAW, P. N.

Inhibition of rat renal C-S lyase: assessment using kidney slice methodology. *Drug Metabol Drug Interact* (1988), 6, 303-316.

BLUM, M.; GRANT, D. M.; MCBRIDE, W.; HEIM, M. UND MEYER, U. A.

Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA Cell Biol* (1990), 9, 193-203.

BLUME, H.

Isolation of highly purified rat liver mitochondria for the study of the biotransformation of drugs. *Arch Pharm (Weinheim)* (1979), 312, 561-572.

BLUME, H. UND OELSCHLAGER, H.

On drug metabolism by mitochondria of rat liver. *Arzneimittelforschung* (1978), 28, 956-960.

BOCK, K. W.; LIPP, H. P. UND BOCK-HENNIG, B. S.

Induction of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics. *Xenobiotica* (1990), 20, 1101-1111.

BOHREN, K. M.; BULLOCK, B.; WERMUTH, B. UND GABBAY, K. H.

The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol Chem* (1989), 264, 9547-9551.

BONSE, G. UND METZLER, M.

Biotransformationen organischer Fremdstoffe. Thieme: Stuttgart, (1978), 43-103.

BORGESE, N.; D'ARRIGO, A.; DE SILVESTRIS, M. UND PIETRINI, G.

NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* (1993), 325, 70-75.

BORGESE, N. UND LONGHI, R.

Both the outer mitochondrial membrane and the microsomal forms of cytochrome b5 reductase contain covalently bound myristic acid. Quantitative analysis on the polyvinylidene difluoride-immobilized proteins. *Biochem J* (1990), 266, 341-347.

BORGESE, N. UND PIETRINI, G.

Distribution of the integral membrane protein NADH-cytochrome b5 reductase in rat liver cells, studied with a quantitative radioimmunoblotting assay. *Biochem J* (1986), 239, 393-403.

BOSRON, W. F. UND PRAIRIE, R. L.

Reduced triphosphopyridine-liked aldehyde reductase. II. Species and tissue distribution. *Arch Biochem Biophys* (1973), 154, 166-172.

BOWSER, R. R.; VERBURG, K. M. UND HENRY, D. P.

Rat histamine N-methyltransferase. Quantification, tissue distribution, purification, and immunologic properties. *J Biol Chem* (1983), 258, 12215-12220.

BOXMA, B.; DE GRAAF, R. M.; VAN DER STAAY, G. W.; VAN ALEN, T. A.; RICARD, G.; GABALDON, T.; VAN HOEK, A. H.; MOON-VAN DER STAAY, S. Y.; KOOPMAN, W. J.; VAN HELLEMOND, J. J.; TIELENS, A. G.; FRIEDRICH, T.; VEENHUIS, M.; HUYNEN, M. A. UND HACKSTEIN, J. H.

An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* (2005), 434, 74-79.

BROWN, R. E.; JARVIS, K. L. UND HYLAND, K. J.

Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* (1989), 180, 136-139.

BRUNNER, G. UND BYGRAVE, F. L.

Microsomal marker enzymes and their limitations in distinguishing the outer membrane of rat liver mitochondria from the microsomes. *Eur J Biochem* (1969), 8, 530-534.

CAMPBELL, W. H.

Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (1999), 50, 277-303.

CAPPIELLO, M.; GIULIANI, L. UND PACIFICI, G. M.

Distribution of UDP-glucuronosyltransferase and its endogenous substrate uridine 5'-diphosphoglucuronic acid in human tissues. *Eur J Clin Pharmacol* (1991), 41, 345-350.

CLEMENT, B.

Methoden zur Behandlung und Prophylaxe der *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) und anderen Erkrankungen sowie Verbindungen und Formulierungen zum Gebrauch bei besagten Methoden. Dt. Patentanmeldung (1993), P4321444.4, PCT/DE 94/00756 (1994), weltweite Anmeldung, Europa ist erteilt (0708640, 1998), USA ist erteilt (5,786,383, 1998).

CLEMENT, B.

Oxidation and reduction of nitrogen via CYP450: importance of the reduction of genotoxic N-hydroxylated functional groups. *Biomedical and Health Research* (1998), 25, 59-71.

CLEMENT, B.

Reduction of N-hydroxylated compounds: amidoximes (N-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev* (2002), 34, 565-579.

CLEMENT, B.; BEHRENS, D.; AMSCHLER, J.; MATSCHKE, K.; WOLF, S. und HAVEMEYER, A.

Reduction of sulfamethoxazole and dapson hydroxylamines by a microsomal enzyme system purified from pig liver and pig and human liver microsomes. *Life Sci* (2005a), 77, 205-219.

CLEMENT, B.; BEHRENS, D.; MOLLER, W. UND CASHMAN, J. R.

Reduction of amphetamine hydroxylamine and other aliphatic hydroxylamines by benzamidoxime reductase and human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* (2000), 13, 1037-1045.

CLEMENT, B. UND DEMESMAEKER, M.

Formation of guanoxabenz from guanabenz in human liver. A new metabolic marker for CYP1A2. *Drug Metab Dispos* (1997), 25, 1266-1271.

CLEMENT, B.; DEMESMAEKER, M. UND LINNE, S.

Microsomal catalyzed N-hydroxylation of guanabenz and reduction of the N-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem Res Toxicol* (1996), 9, 682-688.

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; SCHMITT, S. UND STEINMANN, U.

Biotransformation of benzamidine and benzamidoxime in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)* (1993b), 326, 807-812.

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; TERLINDEN, R. UND WINGEN, F. J.

Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)* (1992), 325, 61-62.

CLEMENT, B. UND JUNG, F.

N-hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P-450 2C3 or human liver microsomes, microsomal retroreduction, and further oxidative transformation of the formed amidoximes. Possible relationship to the biological oxidation of arginine to NG-hydroxyarginine, citrulline, and nitric oxide. *Drug Metab Dispos* (1994), 22, 486-497.

CLEMENT, B. UND KUNZE, T.

The reduction of 6-N-hydroxylaminopurine to adenine by xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* (1992), 44, 1501-1509.

CLEMENT, B.; LOMB, R. UND MOLLER, W.

Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem* (1997), 272, 19615-19620.

CLEMENT, B. UND LOPIAN, K.

Characterization of in vitro biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab Dispos* (2003), 31, 645-651.

CLEMENT, B.; MAU, S.; DETERS, S. UND HAVEMEYER, A.

Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the N-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([[1-[(2s)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos* (2005b), 33, 1740-1747.

CLEMENT, B.; SCHMEZER, P.; WEBER, H.; SCHLEHOFER, J. R.; SCHMITT, S. UND POOL, B. L.

Genotoxic activities of benzamidine and its N-hydroxylated metabolite benzamidoxime in *Salmonella typhimurium* and mammalian cells. *J Cancer Res Clin Oncol* (1988a), 114, 363-368.

CLEMENT, B.; SCHMITT, S. UND ZIMMERMANN, M.

Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm (Weinheim)* (1988b), 321, 955-956.

CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M. H. UND WOHLERS, H.

Cytochrome P450 dependent N-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the N-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide. *Biochem Pharmacol* (1993a), 46, 2249-2267.

CLEMENT, B. UND WISSEL, S.

Studies on the microsomal N-oxygenation of isothiourreas. *Progress in Pharmacology and Clinical Pharmacology* (1991), 8, 219-227.

COHEN, H. J.; BETCHER-LANGE, S.; KESSLER, D. L. UND RAJAGOPALAN, K. V.

Hepatic sulfite oxidase. Congruency in mitochondria of prosthetic groups and activity. *J Biol Chem* (1972), 247, 7759-7766.

COJOCEL, C.; MAITA, K.; PASINO, D. A.; KUO, C. H. UND HOOK, J. B.

Metabolic heterogeneity of the proximal and distal kidney tubules. *Life Sci* (1983), 33, 855-861.

COLCA, J. R.; McDONALD, W. G.; WALDON, D. J.; LEONE, J. W.; LULL, J. M.; BANNOW, C. A.; LUND, E. T. und MATHEWS, W. R.

Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2004), 286, E252-260.

COMTE, J. UND GAUTHERON, D. C.

The markers of pig heart mitochondrial sub-fractions : I. - The dual location of NADPH-cytochrome c reductase in outer membrane and microsomes. *Biochimie* (1978), 60, 1289-1298.

CONSTANTINO, L.; PAIXAO, P.; MOREIRA, R.; PORTELA, M. J.; DO ROSARIO, V. E. und ILEY, J.

Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions. Evidence for monoamine oxidase and cytochrome P450 involvement in the oxidative deamination of primaquine to carboxyprimaquine. *Exp Toxicol Pathol* (1999), 51, 299-303.

COON, M. J.; DING, X. X.; PERNECKY, S. J. UND VAZ, A. D.

Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb J* (1992), 6, 669-673.

CORCORAN, G. B. UND SALAZAR, D. E.

Obesity as a risk factor in drug induced organ injury. II. Increased renal cytochrome P-450 in the obese overfed rat. *Drug Metab Dispos* (1988), 16, 898-900.

COWLEY, A. B.; RIVERA, M. UND BENSON, D. R.

Stabilizing roles of residual structure in the empty heme binding pockets and unfolded states of microsomal and mitochondrial apocytochrome b5. *Protein Sci* (2004), 13, 2316-2329.

CRIBB, A. E.; SPIELBERG, S. P. UND GRIFFIN, G. P.

N4-hydroxylation of sulfamethoxazole by cytochrome P450 of the cytochrome P4502C subfamily and reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine in human and rat hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* (1995), 23, 406-414.

DA CRUZ, S.; XENARIOS, I.; LANGRIDGE, J.; VILBOIS, F.; PARONE, P. A. UND MARTINOU, J. C.

Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* (2003), 278, 41566-41571.

DAILEY, H. A. UND STRITTMATTER, P.

Characterization of the interaction of amphipathic cytochrome b5 with stearyl coenzyme A desaturase and NADPH:cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* (1980), 255, 5184-5189.

DAMBROVA, M.; UHLEN, S.; WELCH, C. J. UND WIKBERG, J. E.

Identification of an N-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. *Eur J Biochem* (1998), 257, 178-184.

D'ARRIGO, A.; MANERA, E.; LONGHI, R. UND BORGESE, N.

The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b5 suggests novel targeting pathways. *J Biol Chem* (1993), 268, 2802-2808.

DAVISON, K. L.; BAKKE, J. E. UND LARSEN, G. L.

Metabolism of the glutathione conjugate of propachlor by in situ perfused kidneys and livers of rats. *Xenobiotica* (1990), 20, 375-383.

DAWSON, J. R.; NORBECK, K. UND MOLDEUS, P.

The effectiveness of different sulfate precursors in supporting extrahepatic sulfate conjugation. *Biochem Pharmacol* (1983), 32, 1789-1791.

DE KROON, A. I.; DOLIS, D.; MAYER, A.; LILL, R. UND DE KRUIJFF, B.

Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim Biophys Acta* (1997), 1325, 108-116.

DE KROON, A. I.; KOORENGEVEL, M. C.; GOERDAYAL, S. S.; MULDER, P. C.; JANSSEN, M. J. UND DE KRUIJFF, B.

Isolation and characterization of highly purified mitochondrial outer membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (method). *Mol Membr Biol* (1999), 16; 205-11.

DE LANNOY, I. A.; HIRAYAMA, H. UND PANG, K. S.

A physiological model for renal drug metabolism: enalapril esterolysis to enalaprilat in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacokinet Biopharm* (1990), 18, 561-587.

DECKER, G. L. UND GREENAWALT, J. W.

Ultrastructural and biochemical studies of mitoplasts and outer membranes derived from French-pressed mitochondria. Advances in mitochondrial subfractionation. *J Ultrastruct Res* (1977), 59, 44-56.

DEITRICH, R. A.

Tissue and subcellular distribution of mammalian aldehyde-oxidizing capacity. *Biochem Pharmacol* (1966), 15, 1911-1922.

DEKANT, W.; LASH, L. UND ANDERS, M. W.

Fate of Glutathione Conjugates and bioactivation of Cysteine *S*-Conjugates by Cysteine Conjugate β -Lyase. In: *Glutathione conjugation: mechanisms and biological significance*. Sies, H., Ketterer, B., Academic Pr.: London (1988), 415-447.

DEL VILLAR, E.; GAULE, C. UND VEGA, P.

Kidney drug metabolizing activities in streptozotocin diabetic rats. *Gen Pharmacol* (1995), 26, 137-141.

DELLA-CIOPPA, G.; MUFFLY, K. E.; YANAGIBASHI, K. UND HALL, P. F.

Preparation and characterization of submitochondrial fractions from adrenal cells. *Mol Cell Endocrinol* (1986), 48, 111-120.

DENNEY, R. M.; FRITZ, R. R.; PATEL, N. T.; WIDEN, S. G. UND ABELL, C. W.

Use of a monoclonal antibody for comparative studies of monoamine oxidase B in mitochondrial extracts of human brain and peripheral tissues. *Mol Pharmacol* (1983), 24, 60-68.

DETERS, S.

Aktivierung von N-hydroxylierten Prodrugs durch mitochondriale Enzyme. Kiel, *Dissertation* (2002).

DICK, R. A.; KANNE, D. B. UND CASIDA, J. E.

Identification of aldehyde oxidase as the neonicotinoid nitroreductase. *Chem Res Toxicol* (2005), 18, 317-323.

DICK, R. A.; KANNE, D. B. UND CASIDA, J. E.

Substrate specificity of rabbit aldehyde oxidase for nitroguanidine and nitromethylene neonicotinoid insecticides. *Chem Res Toxicol* (2006), 19, 38-43.

DIPPLE, K. M. UND CRABB, D. W.

The mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene resides in an HTF island but is expressed in a tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* (1993), 193, 420-427.

DOLPHIN, C.; SHEPHARD, E. A.; POVEY, S.; PALMER, C. N.; ZIEGLER, D. M.; AYESH, R.; SMITH, R. L. und PHILLIPS, I. R.

Cloning, primary sequence, and chromosomal mapping of a human flavin-containing monooxygenase (FMO1). *J Biol Chem* (1991), 266, 12379-12385.

DONATO, M. T.; CASTELL, J. V. UND GOMEZ-LECHON, M. J.

Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* (1995), 23, 553-558.

DOUGLAS, W. R.

Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci* (1972), 3, 226-234.

DUNBAR, B. S. UND SCHWOEBEL, E. D.

Preparation of polyclonal antibodies. *Methods Enzymol* (1990), 182, 663-670.

DURLEY, R. C. UND MATHEWS, F. S.

Refinement and structural analysis of bovine cytochrome b5 at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (1996), 52, 65-76.

ECOBICHON, D. J.

Relative amounts of hepatic and renal carboxylesterases in mammalian species. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* (1972), 3, 629-636.

EL MOUELHI, M.; BECK, S. UND BOCK, K. W.

Stereoselective glucuronidation of (R)- and (S)-naproxen by recombinant rat phenol UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) and its human orthologue. *Biochem Pharmacol* (1993), 46, 1298-1300.

ELFARRA, A. A. UND HWANG, I. Y.

Targeting of 6-mercaptopurine to the kidneys. Metabolism and kidney-selectivity of S-(6-puriny)-L-cysteine analogs in rats. *Drug Metab Dispos* (1993), 21, 841-845.

ELORANTA, T. O.

Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat. Effect of age, sex and methionine administration on the metabolism of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and polyamines. *Biochem J* (1977), 166, 521-529.

ENDOU, H.

Distribution and some characteristics of cytochrome P-450 in the kidney. *J Toxicol Sci* (1983), 8, 165-176.

ENOCH, H. G.; FLEMING, P. J. UND STRITTMATTER, P.

Cytochrome b5 and cytochrome b5 reductase-phospholipid vesicles. Intervesicle protein transfer and orientation factors in protein-protein interactions. *J Biol Chem* (1977), 252, 5656-5660.

ENOCH, H. G. UND STRITTMATTER, P.

Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* (1979), 254, 8976-8981.

ERNSTER, L. UND SCHATZ, G.

Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* (1981), 91, 227s-255s.

ESTABROOK, R. W. UND WERRINGLOER, J.

The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol* (1978), 52, 212-220.

ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B. UND TESTA, B.

Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* (2004), 47, 2393-2404.

FERNANDES, M. H. UND SOARES-DA-SILVA, P.

Role of monoamine oxidase A and B in the deamination of newly-formed dopamine in the rat kidney. *J Neural Transm Suppl* (1990), 32, 155-159.

FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL W. UND STARKE, K.

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer: München (2002).

FRIEDRICH, S.

Aktivität und Kinetik eines mikrosomalen CYP2D-Enzyms. Kiel, *Dissertation* (2003).

FRY, J. R.; WIEBKIN, P.; KAO, J.; JONES, C. A.; GWYNN, J. UND BRIDGES, J. W.

A comparison of drug-metabolizing capability in isolated viable rat hepatocytes and renal tubule fragments. *Xenobiotica* (1978), 8, 113-120.

FUKUSHIMA, H.; GRINSTEAD, G. F. UND GAYLOR, J. L.

Total enzymic synthesis of cholesterol from lanosterol. Cytochrome b5-dependence of 4-methyl sterol oxidase. *J Biol Chem* (1981), 256, 4822-4826.

FUNAE, Y. UND IMAOKA, S.

Simultaneous purification of multiple forms of rat liver microsomal cytochrome P-450 by high-performance liquid chromatography. *Biochim Biophys Acta* (1985), 842, 119-132.

FURNES, B. UND SCHLENK, D.

Evaluation of xenobiotic N- and S-oxidation by variant flavin-containing monooxygenase 1 (FMO1) enzymes. *Toxicol Sci* (2004), 78, 196-203.

FURUTA, T.; SHIRAI, N.; SUGIMOTO, M.; NAKAMURA, A.; HISHIDA, A. UND ISHIZAKI, T.

Influence of CYP2C19 pharmacogenetic polymorphism on proton pump inhibitor-based therapies. *Drug Metab Pharmacokinet* (2005), 20, 153-167.

GOEPTAR, A. R.; SCHEERENS, H. UND VERMEULEN, N. P.

Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* (1995), 25, 25-65.

GOLDBARG, J. A.; FRIEDMAN, O. M.; PINEDA, E. P.; SMITH, E. E.; CHATTERJI, R.; STEIN, E. H. UND RUTENBURG, A. M.

The colorimetric determination of gamma-glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch Biochem Biophys* (1960), 91, 61-70.

GONENNE, A. UND ERNST, R.

Solubilization of membrane proteins by sulfobetaines, novel zwitterionic surfactants. *Anal Biochem* (1978), 87, 28-38.

GONZALEZ, F. J.

The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* (1988), 40, 243-288.

GOYER, R. A. UND KRALL, R.

Ultrastructural transformation in mitochondria isolated from kidneys of normal and lead-intoxicated rats. *J Cell Biol* (1969), 41, 393-400.

GREGUS, Z.; FEKETE, T.; VARGA, F. UND KLAASSEN, C. D.

Effect of valproic acid on glycine conjugation of benzoic acid. *J Pharmacol Exp Ther* (1993), 267, 1068-1075.

GROSSMAN, E. B. UND HEBERT, S. C.

Renal inner medullary choline dehydrogenase activity: characterization and modulation. *Am J Physiol* (1989), 256, F107-112.

GUENGERICH, F. P.

Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* (1991), 266, 10019-10022.

GUENGERICH, F. P.

Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* (2001), 14, 611-650.

GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T.; YUN, C. H.; YAMAZAKI, H.; RANEY, K. D.; THIER, R.; COLES, B. UND HARRIS, T. M.

Interactions of ingested food, beverage, and tobacco components involving human cytochrome P4501A2, 2A6, 2E1, and 3A4 enzymes. *Environ Health Perspect* (1994), 102, 49-53.

GUSTAFSSON, D.; NYSTROM, J.; CARLSSON, S.; BREDBERG, U.; ERIKSSON, U.; GYZANDER, E.; ELG, M.; ANTONSSON, T.; HOFFMANN, K.; UNGELL, A.; SORENSEN, H.; NAGARD, S.; ABRAHAMSSON, A. und BYLUND, R.

The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res* (2001), 101, 171-181.

HACKENBROCK, C. R.

Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* (1966), 30, 269-297.

HARA, T. UND MINAKAMI, S.

On functional role of cytochrome b5. I. NADH-linked cytochrome c reductase in microsomes. *J Biochem (Tokyo)* (1971), 69, 317-324.

HARSDORF, A.

In vitro Biotransformationsstudien von N-Hydroxyguanidinen und Amidoximen. Kiel, *Dissertation* (1998).

HASUMURA, S.; ENDOU, H.; KAKUNO, K.; HOJO, K. UND SAKAI, F.

Effects of starvation on microsomal cytochrome P-450 and laurate-omega-hydroxylation of rat kidney and liver. *Jpn J Pharmacol* (1983), 33, 999-1006.

HAUPTMANN, J.; PAINTZ, M.; KAISER, B. UND RICHTER, M.

Reduction of a benzamidoxime derivative to the corresponding benzamidine in vivo and in vitro. *Pharmazie* (1988), 43, 559-560.

HAVEMEYER, A.

Mitochondriale Benzamidoximreduktion: Identifizierung des molybdäncofaktorabhängigen Enzymsystems. Kiel, *Dissertation* (2006).

HAVEMEYER, A.; BITTNER, F.; WOLLERS, S.; MENDEL, R.; KUNZE, T. UND CLEMENT, B.

Identification of the Missing Component in the Mitochondrial Benzamidoxime Prodrug-converting System as a Novel Molybdenum Enzyme. *J Biol Chem* (2006), 281, 34796-34802.

HAZELTON, G. A.; HJELLE, J. J.; DILLS, R. L. UND KLAASSEN, C. D.

A radiometric method for the measurement of adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate in rat and mouse liver. *Drug Metab Dispos* (1985), 13, 30-34.

HEBERLING, S.; GIRRESER, U.; WOLF, S. UND CLEMENT, B.

Oxygen-insensitive enzymatic reduction of oximes to imines. *Biochem Pharmacol* (2006), 71, 354-365.

HEIN, D. W.; FLAMMANG, T. J.; KIRLIN, W. G.; TRINIDAD, A. UND OGOLLA, F.

Acetylator genotype-dependent metabolic activation of carcinogenic N-hydroxyarylamines by S-acetyl coenzyme A-dependent enzymes of inbred hamster tissue cytosols: relationship to arylamine N-acetyltransferase. *Carcinogenesis* (1987a), 8, 1767-1774.

HEIN, D. W.; KIRLIN, W. G.; OGOLLA, F. UND TRINIDAD, A.

Extrahepatic expression of N-acetylator genotype in the inbred hamster. *Drug Metab Dispos* (1987b), 15, 68-73.

HELENIUS, A. UND SIMONS, K.

Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* (1975), 415, 29-79.

HEYMANN, E.

Carboxylesterases and Amidases. In: *Enzymatic basis of detoxication*. Jakoby, W. B., Acad. Press: New York (1980), 291-323.

HILDEBRANDT, A. UND ESTABROOK, R. W.

Evidence for the participation of cytochrome b 5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch Biochem Biophys* (1971), 143, 66-79.

HILLE, R.

The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem Rev* (1996), 96, 2757-2816.

HILLE, R.

Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem Sci* (2002), 27, 360-367.

HILLE, R.

Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch Biochem Biophys* (2005), 433, 107-116.

HILLE, R. UND NISHINO, T.

Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb J* (1995), 9, 995-1003.

HINCHMAN, C. A. UND BALLATORI, N.

Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species. *Biochem Pharmacol* (1990), 40, 1131-1135.

HJELLE, J. T.; HAZELTON, G. A.; KLAASSEN, C. D. UND HJELLE, J. J.

Glucuronidation and sulfation in rabbit kidney. *J Pharmacol Exp Ther* (1986), 236, 150-156.

HJELMELAND, L. M.

Solubilization of native membrane proteins. *Methods Enzymol* (1990), 182, 253-264.

HLAVICA, P.

N-oxidative transformation of free and N-substituted amine functions by cytochrome P450 as means of bioactivation and detoxication. *Drug Metab Rev* (2002), 34, 451-477.

HOIVIK, D. J.; MANAUTOU, J. E.; TVEIT, A.; HART, S. G.; KHAIRALLAH, E. A. UND COHEN, S. D.

Gender-related differences in susceptibility to acetaminophen-induced protein arylation and nephrotoxicity in the CD-1 mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* (1995), 130, 257-271.

HOLMANS, P. L.; SHET, M. S.; MARTIN-WIXTROM, C. A.; FISHER, C. W. UND ESTABROOK, R. W.

The high-level expression in *Escherichia coli* of the membrane-bound form of human and rat cytochrome b5 and studies on their mechanism of function. *Arch Biochem Biophys* (1994), 312, 554-565.

HOLMES, R. S.; COURTNEY, Y. R. UND VANDEBERG, J. L.

Alcohol dehydrogenase isozymes in baboons: tissue distribution, catalytic properties, and variant phenotypes in liver, kidney, stomach, and testis. *Alcohol Clin Exp Res* (1986), 10, 623-630.

HOVIUS, R.; LAMBRECHTS, H.; NICOLAY, K. UND DE KRUIJFF, B.

Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim Biophys Acta* (1990), 1021, 217-226.

HU, J. J.; LEE, M. J.; VAPIWALA, M.; REUHL, K.; THOMAS, P. E. UND YANG, C. S.

Sex-related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen. *Toxicol Appl Pharmacol* (1993), 122, 16-26.

HULTQUIST, D. E. UND PASSON, P. G.

Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome B5 and cytochrome B5 reductase. *Nat New Biol* (1971), 229, 252-254.

IMAOKA, S. UND FUNAE, Y.

Purification and NH₂-terminal sequence of cytochrome P-450 from kidney microsomes of untreated male rats. *Biochem Biophys Res Commun* (1986), 141, 711-717.

IMAOKA, S.; NAGASHIMA, K. UND FUNAE, Y.

Characterization of three cytochrome P450s purified from renal microsomes of untreated male rats and comparison with human renal cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* (1990), 276, 473-480.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M. UND MCLELLAN, R. A.

Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* (1999), 20, 342-349.

IOANNIDES, C. UND PARKE, D. V.

The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab Rev* (1990), 22, 1-85.

ITO, A.

Hepatic sulfite oxidase identified as cytochrome b 5 -like pigment extractable from mitochondria by hypotonic treatment. *J Biochem (Tokyo)* (1971), 70, 1061-1064.

ITO, A.

Cytochrome b5-like hemoprotein of outer mitochondrial membrane; OM cytochrome b. I. Purification of OM cytochrome b from rat liver mitochondria and comparison of its molecular properties with those of cytochrome b5. *J Biochem (Tokyo)* (1980), 87, 63-71.

ITO, A.; HAYASHI, S. UND YOSHIDA, T.

Participation of a cytochrome b5-like hemoprotein of outer mitochondrial membrane (OM cytochrome b) in NADH-semidehydroascorbic acid reductase activity of rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* (1981), 101, 591-598.

IYANAGI, T.; WATANABE, S. UND ANAN, K. F.

One-electron oxidation-reduction properties of hepatic NADH-cytochrome b5 reductase. *Biochemistry* (1984), 23, 1418-1425.

JOHNSON, J. L.; JONES, H. P. UND RAJAGOPALAN, K. V.

In vitro reconstitution of demolybdsulfite oxidase by a molybdenum cofactor from rat liver and other sources. *J Biol Chem* (1977), 252, 4994-5003.

JOHNSON, J. L. UND RAJAGOPALAN, K. V.

Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982), 79, 6856-6860.

JOHNSTON, J. P.

Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol* (1968), 17, 1285-1297.

JUDD, R. C.

Peptide mapping. *Methods Enzymol* (1990), 182, 613-626.

JUNG, F.

Enzymatische Grundlagen der N-oxidativen Biotransformation von Amidinen und Amidoximen. Kiel, *Dissertation* (1994).

KADLUBAR, F. F.; MCKEE, E. M. UND ZIEGLER, D. M.

Reduced pyridine nucleotide-dependent N-hydroxy amine oxidase and reductase activities of hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys* (1973), 156, 46-57.

KADLUBAR, F. F. UND ZIEGLER, D. M.

Properties of a NADH-dependent N-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* (1974), 162, 83-92.

KAMIN, H.; MASTERS, B. S.; GIBSON, Q. H. UND WILLIAMS, C. H., Jr.

Microsomal TPNH-cytochrome c reductase. *Fed Proc* (1965), 24, 1164-1171.

KARAHALIL, B.; HOGUE, B. A.; DE SOUZA-PINTO, N. C. UND BOHR, V. A.

Base excision repair capacity in mitochondria and nuclei: tissue-specific variations. *Faseb J* (2002), 16, 1895-1902.

KARHAN, W.

Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mechanismus eines mikrosomalen, N-reduktiven Biotransformationssystems. Kiel, *Dissertation* (2002).

KARLSON, P.; DOENECKE, D. UND KOOLMAN, J.

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Thieme: Stuttgart (1994).

KASTNER, M. UND NEUBERT, D.

Isolation of cytochrome P-450 components from marmoset liver microsomes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1991), 587, 117-126.

KENNEDY, B.; BIGBY, T. D. UND ZIEGLER, M. G.

Nonadrenal epinephrine-forming enzymes in humans. Characteristics, distribution, regulation, and relationship to epinephrine levels. *J Clin Invest* (1995), 95, 2896-2902.

KETTERER, B. UND MULDER, G. J.

Glutathione conjugation. In: *Conjugation reactions in drug metabolism: an integrated approach; substrates, co-substrates, enzymes and their interactions in vivo and in vitro*. Mulder, G. J., Taylor & Francis: London (1990), 307-364.

KEYES, S. R.; ALFANO, J. A.; JANSSON, I. UND CINTI, D. L.

Rat liver microsomal elongation of fatty acids. Possible involvement of cytochrome b5. *J Biol Chem* (1979), 254, 7778-7784.

KIMURA, S.; KAWAMURA, M. UND IYANAGI, T.

Role of Thr(66) in porcine NADH-cytochrome b5 reductase in catalysis and control of the rate-limiting step in electron transfer. *J Biol Chem* (2003), 278, 3580-3589.

KISKER, C.; SCHINDELIN, H. UND REES, D. C.

Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annu Rev Biochem* (1997), 66, 233-267.

KITAMURA, S.; SUGIHARA, K. UND TATSUMI, K.

Reductase activity of aldehyde oxidase toward the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene and the related hydroxamic acids. *Biochem Mol Biol Int* (1994), 34, 1197-1203.

KLINE, E. S.; BRANDT, R. B.; LAUX, J. E.; SPAINHOUR, S. E.; HIGGINS, E. S.; ROGERS, K. S.; TINSLEY, S. B. und WATERS, M. G.

Localization of L-lactate dehydrogenase in mitochondria. *Arch Biochem Biophys* (1986), 246, 673-680.

KLING, L.; LEGRUM, W. UND NETTER, K. J.

Induction of liver cytochrome P-450 in mice by warfarin. Comparison of warfarin-, phenobarbitone-, and cobalt-induced hepatic microsomal protein patterns by PAGE after partial purification on octyl-sepharose CL-4B. *Biochem Pharmacol* (1985), 34, 85-91.

KNOLL, J. UND MAGYAR, K.

Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv Biochem Psychopharmacol* (1972), 5, 393-408.

KORNBERG, A.

Why purify enzymes? *Methods Enzymol* (1990), 182, 1-5.

KOSTER, A. S.; SCHIRMER, G. UND BOCK, K. W.

Immunochemical and functional characterization of UDP-glucuronosyltransferases from rat liver, intestine and kidney. *Biochem Pharmacol* (1986), 35, 3971-3975.

KRISHNA, D. R. UND KLOTZ, U.

Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* (1994), 26, 144-160.

KRIVANEK, J. UND NOVAKOVA, L.

A novel effect of vanadium ions: inhibition of succinyl-CoA synthetase. *Gen Physiol Biophys* (1991), 10, 71-82.

KRÜGER, P.

On derivatives of benzenylamidoxime. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* (1885), 1053.

KUBIC, V. L. UND ANDERS, M. W.

Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide. II. In vitro studies. *Drug Metab Dispos* (1975), 3, 104-112.

KULKOSKI, J. A.; WEBER, J. L. UND GHAZARIAN, J. G.

NADPH-cytochrome c reductase in outer membrane of kidney mitochondria. Purification and properties. *Arch Biochem Biophys* (1979), 192, 539-547.

KURIAN, J. R.; BAJAD, S. U.; MILLER, J. L.; CHIN, N. A. UND TREPANIER, L. A.

NADH cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *J Pharmacol Exp Ther* (2004), 311, 1171-1178.

KUSCHINSKY, G.; LÜLLMANN, H. UND MOHR, K.

Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Thieme: Stuttgart (1993).

KUWAHARA, S.; OKADA, Y. UND OMURA, T.

Evidence for molecular identity of microsomal and mitochondrial NADH-cytochrome b5 reductases of rat liver. *J Biochem (Tokyo)* (1978), 83, 1049-1059.

LAEMMLI, U. K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970), 227, 680-685.

LAUE, T. M. UND RHODES, D. G.

Determination of size, molecular weight, and presence of subunits. *Methods Enzymol* (1990), 182, 566-587.

LE MAIRE, M.; CHAMPEIL, P. UND MOLLER, J. V.

Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* (2000), 1508, 86-111.

LEDERER, F.; GHRIR, R.; GUIARD, B.; CORTIAL, S. UND ITO, A.

Two homologous cytochromes b5 in a single cell. *Eur J Biochem* (1983), 132, 95-102.

LEE, H. J.; ADHAM, I. M.; SCHWARZ, G.; KNEUSSEL, M.; SASS, J. O.; ENGEL, W. UND REISS, J.

Molybdenum cofactor-deficient mice resemble the phenotype of human patients. *Hum Mol Genet* (2002), 11, 3309-3317.

LEHNINGER, A. L. UND REMMERT, L. F.

An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation. *J Biol Chem* (1959), 234, 2459-2464.

LEMOINE, A.; JOHANN, M. UND CRESTEIL, T.

Evidence for the presence of distinct flavin-containing monooxygenases in human tissues. *Arch Biochem Biophys* (1990), 276, 336-342.

LILL, R. UND NEUPERT, W.

Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol* (1996), 6, 56-61.

LINDELL, S. E. UND SCHAYER, R. W.

The renal removal of injected [14C] histamine from the blood in dogs. *Br J Pharmacol Chemother* (1958), 13, 44-51.

LINN, S.

Strategies and considerations for protein purifications. *Methods Enzymol* (1990), 182, 9-15.

LITTERST, C. L.; MIMNAUGH, E. G.; REAGAN, R. L. UND GRAM, T. E.

Comparison of in vitro drug metabolism by lung, liver, and kidney of several common laboratory species. *Drug Metab Dispos* (1975), 3, 259-265.

LOHR, J. W.; WILLSKY, G. R. UND ACARA, M. A.

Renal drug metabolism. *Pharmacol Rev* (1998), 50, 107-141.

LOMB, R.

Enzymatische Grundlagen der N-reduktiven Biotransformation von N-hydroxylierten Amidinen, Guanidinen und Amidinohydrazonen. Kiel, *Dissertation* (1995).

LOPIAN, K.

Enzymatische Grundlagen der Aktivierung des Amidoxim- und Ester-Prodrugs Ximelagatran. Kiel, *Dissertation* (2002).

LOSTANLEN, D.; VIEIRA DE BARROS, A.; LEROUX, A. UND KAPLAN, J. C.

Soluble NADH-cytochrome b5 reductase from rabbit liver cytosol: partial purification and characterization. *Biochim Biophys Acta* (1978), 526, 42-51.

MACKENZIE, P. I.; OWENS, I. S.; BURCHELL, B.; BOCK, K. W.; BAIROCH, A.; BELANGER, A.; FOURNEL-GIGLEUX, S.; GREEN, M.; HUM, D. W.; IYANAGI, T.; LANCET, D.; LOUISOT, P.; MAGDALOU, J.; CHOWDHURY, J. R.; RITTER, J. K.; SCHACHTER, H.; TEPHLY, T. R.; TIPTON, K. F. UND NEBERT, D. W.

The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* (1997), 7, 255-269.

MAKITA, K.; FALCK, J. R. UND CAPDEVILA, J. H.

Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *Faseb J* (1996), 10, 1456-1463.

MANGUM, J. H.; KLINGLER, M. D. UND NORTH, J. A.

The purification of a soluble cytochrome from pig kidney with spectral properties similar to those of microsomal cytochrome b5. *Biochem Biophys Res Commun* (1970), 40, 1520-1525.

MANNERVIK, B.; AWASTHI, Y. C.; BOARD, P. G.; HAYES, J. D.; DI ILIO, C.; KETTERER, B.; LISTOWSKY, I.; MORGENSTERN, R.; MURAMATSU, M. UND PEARSON, W. R.

Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J* (1992), 282, 305-306.

MARGULIS, L.

Symbiosis and evolution. *Sci Am* (1971), 225, 48-57.

MATHEWS, F. S. UND CZERWINSKI, E. W.

Cytochrome b₅ and Cytochrome b₅ Reductase from a Chemical and X-Ray Diffraction Viewpoint. In: *Electron transport systems and receptors*. Martonosi, A., Briggs, M., Wiley: London (1976), 143-197.

MATHEWS, F. S.; CZERWINSKI, E. W. UND ARGOS, P.

The X-Ray Crystallographic Structure of Calf Liver Cytochrome b₅. In: *Biochemistry*. Dolphin, D., Acad. Press: New York (1979), 107-147.

MATHEWS, F. S.; LEVINE, M. UND ARGOS, P.

The structure of calf liver cytochrome b 5 at 2.8 Å resolution. *Nat New Biol* (1971), 233, 15-16.

MAU, S.

Studien zur extrahepatischen Reduktion verschiedener N-hydroxylierter Verbindungen. Kiel, *Dissertation* (2002).

MAYER, A.; LILL, R. UND NEUPERT, W.

Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. *J Cell Biol* (1993), 121, 1233-1243.

MAYER, R. D.; BERMAN, S.; COCKETT, A. T. UND MAINES, M. D.

Differential effects of cyclosporin on hepatic and renal heme, cytochrome P-450 and drug metabolism. Possible role in nephrotoxicity of the drug. *Biochem Pharmacol* (1989), 38, 1001-1007.

MENDEL, R. R. UND BITTNER, F.

Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta* (2006), 1763, 621-635.

MIHARA, K. UND SATO, R.

Partial purification of NADH-cytochrome b 5 reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. *J Biochem (Tokyo)* (1972), 71, 725-735.

MIHARA, K. UND SATO, R.

Detergent-solubilized NADH-cytochrome b₅ reductase. *Methods Enzymol* (1978), 52, 102-108.

MIKI, K.; KAIDA, S.; KASAI, N.; IYANAGI, T.; KOBAYASHI, K. UND HAYASHI, K.

Crystallization and preliminary x-ray crystallographic study of NADH-cytochrome b₅ reductase from pig liver microsomes. *J Biol Chem* (1987), 262, 11801-11802.

MIKSYS, S. L.; CHEUNG, C.; GONZALEZ, F. J. UND TYNDALE, R. F.

Human CYP2D6 and mouse CYP2Ds: organ distribution in a humanized mouse model. *Drug Metab Dispos* (2005), 33, 1495-1502.

MOHANDAS, J.; MARSHALL, J. J.; DUGGIN, G. G.; HORVATH, J. S. UND TILLER, D. J.

Differential distribution of glutathione and glutathione-related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic nephropathy. *Biochem Pharmacol* (1984), 33, 1801-1807.

MOKASHI, V.; LI, L. UND PORTER, T. D.

Cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 support the CYP2E1-mediated activation of nitrosamines in a recombinant Ames test. *Arch Biochem Biophys* (2003), 412, 147-152.

MOLLER, E.; MCINTOSH, J. F. UND VAN SLYKE, D. D.

Studies of Urea Excretion. II: Relationship Between Urine Volume and the Rate of Urea Excretion by Normal Adults. *J Clin Invest* (1928), 6, 427-465.

MÖLLER, W.

Enzymatische Grundlagen der N-reduktiven Biotransformation: Isolierung und Charakterisierung eines mikrosomalen Enzymsystems. Kiel, *Dissertation* (1997).

MOZIER, N. M. UND HOFFMAN, J. L.

Biosynthesis and urinary excretion of methyl sulfonium derivatives of the sulfur mustard analog, 2-chloroethyl ethyl sulfide, and other thioethers. *Faseb J* (1990), 4, 3329-3333.

MULDER, G. J.

Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1992), 32, 25-49.

MULDER, G. J. UND JAKOBY, W. B.

Sulfation. In: *Conjugation reactions in drug metabolism: an integrated approach; substrates, co-substrates, enzymes and their interactions in vivo and in vitro*. Mulder, G. J., Taylor & Francis: London (1990), 107-161.

MURTHY, M. S. UND PANDE, S. V.

Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1987), 84, 378-382.

MUTSCHLER, E.

Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wiss. Verl.-Ges.: Stuttgart (2001).

MYERS, M. J.; FARRELL, D. E.; HOWARD, K. D. UND KAWALEK, J. C.

Identification of multiple constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 enzymes in market weight swine. *Drug Metab Dispos* (2001), 29, 908-915.

MZIAUT, H.; KORZA, G. UND OZOLS, J.

The N terminus of microsomal delta 9 stearoyl-CoA desaturase contains the sequence determinant for its rapid degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000), 97, 8883-8888.

NASON, A.; LEE, K. Y.; PAN, S. S.; KETCHUM, P. A.; LAMBERTI, A. UND DeVRIES, J.

In vitro formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum-enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1971), 68, 3242-3246.

NEBERT, D. W. UND GONZALEZ, F. J.

P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* (1987), 56, 945-993.

NELSON, D. R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J. J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D. J.; WATERMAN, M. R.; GOTOH, O.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GUNSALUS, I. C. UND NEBERT, D. W.

P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* (1996), 6, 1-42.

NETTER, F. H.; RENNER, E.; GOLLMANN, G. UND CIBA GEIGY CORPORATION

Niere und Harnwege. In: *Farbatlanten der Medizin*. Thieme: Stuttgart (1983), 2-17.

NICOT, G.; VALETTE, J. P.; DUPUY, J. L.; MERLE, L.; LACHATRE, G. UND NOUAILLE, Y.

Characterization of the esterases of the mitochondrial fraction of guinea pig cortical renal cells. *Proc Soc Exp Biol Med* (1984), 176, 467-71.

NISHIMURA, M.; YAGUTI, H.; YOSHITSUGU, H.; NAITO, S. UND SATOH, T.

Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* (2003), 123, 369-375.

OBACH, R. S.; COX, L. M. UND TREMAINE, L. M.

Sertraline is metabolized by multiple cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: an in vitro study. *Drug Metab Dispos* (2005), 33, 262-270.

OGISHIMA, T.; KINOSHITA, J. Y.; MITANI, F.; SUEMATSU, M. UND ITO, A.

Identification of outer mitochondrial membrane cytochrome b5 as a modulator for androgen synthesis in Leydig cells. *J Biol Chem* (2003), 278, 21204-21211.

OHASHI, M. UND OMURA, T.

Presence of the NADPH-cytochrome P-450 reductase system in liver and kidney mitochondria. *J Biochem (Tokyo)* (1978), 83, 249-260.

OHISHI, N.; IMAOKA, S. UND FUNAE, Y.

Changes in content of P450 isozymes in hepatic and renal microsomes of the male rat treated with cis-diamminedichloroplatinum. *Xenobiotica* (1994), 24, 873-880.

OLIW, E. H.

Oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450 monooxygenases. *Prog Lipid Res* (1994), 33, 329-354.

OMURA, T. UND SATO, R.

The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* (1964), 239, 2370-2378.

ORRENIUS, S.; ELLIN, A.; JAKOBSSON, S. V.; THOR, H.; CINTI, D. L.; SCHENKMAN, J. B. UND ESTABROOK, R. W.
The cytochrome P-450-containing mono-oxygenase system of rat kidney cortex microsomes. *Drug Metab Dispos* (1973), 1, 350-357.

ORTIZ DE MONTELLANO, P. R.

Oxygen Activation and Transfer. In: *Cytochrome P-450: structure, mechanism, and biochemistry*. Ortiz de Montanello, P. R., Plenum Press: New York, (1986), 217-257.

OZOLS, J.

Preparation of membrane fractions. *Methods Enzymol* (1990), 182, 225-235.

OZOLS, J.; CARR, S. A. UND STRITTMATTER, P.

Identification of the NH₂-terminal blocking group of NADH-cytochrome b5 reductase as myristic acid and the complete amino acid sequence of the membrane-binding domain. *J Biol Chem* (1984), 259, 13349-13354.

OZOLS, J.; KORZA, G.; HEINEMANN, F. S.; HEDIGER, M. A. UND STRITTMATTER, P.

Complete amino acid sequence of steer liver microsomal NADH-cytochrome b5 reductase. *J Biol Chem* (1985), 260, 11953-11961.

PAKKARI, I

Cardiotoxicity of new antihistamines and cisapride. *Toxicol Lett* (2002), 127, 279-284.

PACIFICI, G. M.; BENCINI, C. UND RANE, A.

Acetyltransferase in humans: development and tissue distribution. *Pharmacology* (1986), 32, 283-291.

PACIFICI, G. M.; SANTERINI, S. UND GIULIANI, L.

Methylation of captopril in human liver, kidney and intestine. *Xenobiotica* (1991), 21, 1107-1112.

PAOLINI, M.; MESIRCA, R.; POZZETTI, L.; SAPONE, A. UND CANTELLI-FORTI, G.

Molecular non-genetic biomarkers related to Fenarimol cocarcinogenesis: organ- and sex-specific CYP induction in rat. *Cancer Lett* (1996), 101, 171-178.

PARK, B. K.; PIRMOHAMED, M. UND KITTERINGHAM, N. R.

The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther* (1995), 68, 385-424.

PARKINSON, A.

Biotransformation of Xenobiotics. In: *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. Klaassen, C. D., McGraw-Hill: New York (1996), 113-186.

PARONE, P. A.; JAMES, D. UND MARTINOU, J. C.

Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* (2002), 84, 105-111.

PARSONS, D. F. UND WILLIAMS, G. R.

Isolation and purification of the outer membrane and inner membrane of liver mitochondria. *Methods in Enzymology* (1967), 10, 443-448.

PELKONEN, P.; LANG, M. UND PASANEN, M.

Tissue and sex-dependent differences in CYP2A activities in hamsters. *Arch Toxicol* (1994), 68, 416-422.

PETERLIN-MASIC, L.; CESAR, J. UND ZEGA, A.

Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr Pharm Des* (2006), 12, 73-91.

PICKETT, C. B. UND LU, A. Y.

Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem* (1989), 58, 743-764.

PIETRINI, G.; AGGUJARO, D.; CARRERA, P.; MALYSZKO, J.; VITALE, A. UND BORGESE, N.

A single mRNA, transcribed from an alternative, erythroid-specific, promoter, codes for two non-myristylated forms of NADH-cytochrome b5 reductase. *J Cell Biol* (1992), 117, 975-986.

PINGOUD, A. UND URBANKE, C.

Säulenchromatographie. In: *Arbeitsmethoden der Biochemie*. de Gruyter: Berlin, (1997), 66-97.

POON, K. UND PANG, K. S.

Benzoic acid glycine conjugation in the isolated perfused rat kidney. *Drug Metab Dispos* (1995), 23, 255-260.

PORTER, T. D. UND COON, M. J.

Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* (1991), 266, 13469-13472.

POSTLIND, H.; AXEN, E.; BERGMAN, T. UND WIKVALL, K.

Cloning, structure, and expression of a cDNA encoding vitamin D3 25-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* (1997), 241, 491-497.

POSTLIND, H. UND WIKVALL, K.

Purification of a cytochrome P-450 from pig kidney microsomes catalysing the 25-hydroxylation of vitamin D3. *Biochem J* (1988), 253, 549-552.

PRITCHARD, J. B. UND MILLER, D. S.

Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol Rev* (1993), 73, 765-796.

QUEBBEMANN, A. J. UND RENNICK, B. R.

Effects of structural modifications of catecholamines on renal tubular transport in the chicken. *J Pharmacol Exp Ther* (1969), 166, 52-62.

QULALI, M.; DIPPLE, K. M. UND CRABB, D. W.

Modulation of hepatic and renal alcohol dehydrogenase activity and mRNA by steroid hormones in vivo. *Adv Exp Med Biol* (1993), 328, 581-589.

QULALI, M.; ROSS, R. A. UND CRABB, D. W.

Estradiol induces class I alcohol dehydrogenase activity and mRNA in kidney of female rats. *Arch Biochem Biophys* (1991), 288, 406-413.

RAJAGOPALAN, K. V.; FRIDOVICH, I. UND HANDLER, P.

Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J Biol Chem* (1962), 237, 922-928.

RAMADOSS, C. S.

Effects of vanadate on the molybdoproteins xanthine oxidase and nitrate reductase: kinetic evidence for multiple site interaction. *Z Naturforsch [C]* (1980), 35, 702-707.

RAMANADHAM, M. UND KAPLAY, S. S.

Increased microsomal enzyme contamination of liver mitochondrial fraction in protein-deficient rats: a novel membrane modification in stress. *Biochem Med* (1978), 20, 417-421.

RAZA, H.; PRABU, S. K.; ROBIN, M. A. UND AVADHANI, N. G.

Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes* (2004), 53, 185-194.

REDDY, V. V.; KUPFER, D. UND CASPI, E.

Mechanism of C-5 double bond introduction in the biosynthesis of cholesterol by rat liver microsomes. *J Biol Chem* (1977), 252, 2797-2801.

REED, J. C.

Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell* (1997), 91, 559-562.

REHLING, P.; PFANNER, N. UND MEISINGER, C.

Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane--a guided tour. *J Mol Biol* (2003), 326, 639-657.

REIN, H.; JUNG, C.; RISTAU, O. UND FRIEDRICH, J.

Biophysical Properties of Cytochrome P-450, Analysis of the Reaction Mechanism-Thermodynamic Aspects. In: *Cytochrome P-450: structural and functional relationships, biochemical and physicochemical aspects of mixed function oxidases*. Ruckpaul, K., Blanck, I., Akad.-Verl.: Berlin, (1984), 163-177.

REMY, C. N.

Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines. S-Methylation with S-adenosylmethionine transmethylase and catabolism in mammalian tissues. *J Biol Chem* (1963), 238, 1078-1084.

RHODES, D. G. UND LAUE, T. M.

Determination of purity. *Methods Enzymol* (1990), 182, 555-565.

RIECKERT, W.

In vivo und in vitro Biotransformation von Pentamidinderivaten. Kiel, *Dissertation* (1999).

RIVERA, M.; BARILLAS-MURY, C.; CHRISTENSEN, K. A.; LITTLE, J. W.; WELLS, M. A. et al.

Gene synthesis, bacterial expression, and ¹H NMR spectroscopic studies of the rat outer mitochondrial membrane cytochrome b5. *Biochemistry* (1992), 31, 12233-12240.

ROCH-RAMEL, F.; BESSEGHIR, K. UND MURER, H.

Renal excretion and tubular transport of organic anions and cations. In: *Handbook of physiology: a critical, comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts*. Windhager, E. E., Pappenheimer, J. R., American Physiological Soc.: Bethesda (1992), 2189-2262.

RODRIGUEZ-TRELLES, F.; TARRIO, R. UND AYALA, F. J.

Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003), 100, 13413-13417.

ROGERS, M. J. UND STRITTMATTER, P.

Evidence for random distribution and translational movement of cytochrome b5 in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* (1974), 249, 895-900.

ROSSIGNOL, R.; LETELLIER, T.; MALGAT, M.; ROCHER, C. UND MAZAT, J. P.

Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* (2000), 347, 45-53.

RUCKPAUL, K.

Cytochrome p-450 dependent enzymes--target enzymes for drug action? *Pharm Unserer Zeit* (1993), 22, 296-304.

RUDOLPH, M. J.; JOHNSON, J. L.; RAJAGOPALAN, K. V. UND KISKER, C.

The 1.2 Å structure of the human sulfite oxidase cytochrome b(5) domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (2003), 59, 1183-1191.

RUSH, G. F. UND HOOK, J. B.

Characteristics of renal UDP-glucuronyltransferase. *Life Sci* (1984), 35, 145-153.

RYAN, R.; GRIMM, S. W.; KEDZIE, K. M.; HALPERT, J. R. UND PHILPOT, R. M.

Cloning, sequencing, and functional studies of phenobarbital-inducible forms of cytochrome P450 2B and 4B expressed in rabbit kidney. *Arch Biochem Biophys* (1993), 304, 454-463.

SALVA, M.; JANSAT, J. M.; MARTINEZ-TOBED, A. UND PALACIOS, J. M.

Identification of the human liver enzymes involved in the metabolism of the antimigraine agent almotriptan. *Drug Metab Dispos* (2003), 31, 404-411.

SAULTER, J. Y.; KURIAN, J. R.; TREPANIER, L. A.; TIDWELL, R. R.; BRIDGES, A. S.; BOYKIN, D. W.; STEPHENS, C. E.; ANBAZHAGAN, M. UND HALL, J. E.

Unusual dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase. *Drug Metab Dispos* (2005), 33, 1886-1893.

SCHACHTER, D. UND MANIS, J. G.

Salicylate and salicyl conjugates: fluorimetric estimation, biosynthesis and renal excretion in man. *J Clin Invest* (1958), 37, 800-807.

SCHAFFER, D. A. UND HULTQUIST, D. E.

Purification of bovine liver microsomal NADH-cytochrome b5 reductase using affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* (1980), 95, 381-387.

SCHLONDORFF, D.

Isolation and use of specific nephron segments and their cells in biochemical studies. *Kidney Int* (1986), 30, 201-207.

SCHNAITMAN, C.; ERWIN, V. G. UND GREENAWALT, J. W.

The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Cell Biol* (1967), 32, 719-735.

SCHNAITMAN, C. UND GREENAWALT, J. W.

Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Cell Biol* (1968), 38, 158-175.

SCHUETZ, E. G.; SCHUETZ, J. D.; GROGAN, W. M.; NARAY-FEJES-TOTH, A.; FEJES-TOTH, G.; RAUCY, J.; GUZELIAN, P.; GIONELA, K. UND WATLINGTON, C. O.

Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch Biochem Biophys* (1992), 294, 206-214.

SECOND SYMPHONY INVESTIGATORS

Randomized trial of aspirin, sibralfiban, or both for secondary prevention after acute coronary syndromes. *Circulation* (2001), 103, 1727-1733.

SHAW, P. N. UND BLAGBROUGH, I. S.

Cysteine conjugate β -lyase, II: isolation, properties and structure-activity relationships. In: *Sulphur-containing drugs and related organic compounds*. Damani, L. A., Horwood: Chichester (1989), 135-155.

SHIRABE, K.; YUBISUI, T.; BORGESSE, N.; TANG, C. Y.; HULTQUIST, D. E. UND TAKESHITA, M.

Enzymatic instability of NADH-cytochrome b5 reductase as a cause of hereditary methemoglobinemia type I (red cell type). *J Biol Chem* (1992), 267, 20416-20421.

SIEST, G.; ANTOINE, B.; FOURNEL, S.; MAGDALOU, J. UND THOMASSIN, J.

The glucuronosyltransferases: what progress can pharmacologists expect from molecular biology and cellular enzymology? *Biochem Pharmacol* (1987), 36, 983-989.

SILBERNAGL, S.

Tubular transport of amino acids and small peptides. In: *Handbook of physiology: a critical, comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts*. Windhager, E. E., Pappenheimer, J. R., American Physiological Soc.: Bethesda (1992), 1937-1976.

SINGH, J.; NORDLIE, R. C. UND JORGENSEN, R. A.

Vanadate: a potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. *Biochim Biophys Acta* (1981), 678, 477-82.

SINGH, S. V.; LEAL, T.; ANSARI, G. A. UND AWASTHI, Y. C.

Purification and characterization of glutathione S-transferases of human kidney. *Biochem J* (1987), 246, 179-186.

SLAUGHTER, S. R.; WILLIAMS, C. H., Jr. UND HULTQUIST, D. E.

Demonstration that bovine erythrocyte cytochrome b5 is the hydrophilic segment of liver microsomal cytochrome b5. *Biochim Biophys Acta* (1982), 705, 228-237.

SMITH, D. A. UND JONES, B. C.

Speculations on the substrate structure-activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes. *Biochem Pharmacol* (1992), 44, 2089-2098.

SMITH, J. H.; RUSH, G. F. UND HOOK, J. B.

Induction of renal and hepatic mixed function oxidases in the hamster and guinea pig. *Toxicology* (1986), 38, 209-218.

SMITH, M. A.; NAPIER, J. A.; STYMNE, S.; TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. UND STOBART, A. K.

Expression of a biologically active plant cytochrome b5 in *Escherichia coli*. *Biochem J* (1994), 303, 73-79.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J. UND KLENK, D. C.

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* (1985), 150, 76-85.

SMITH, R. L. UND WILLIAMS, R. T.

Comparative metabolism of drugs in man and monkeys. *J Med Primatol* (1974), 3, 138-152.

SNYDER, S. H. UND AXELROD, J.

Sex differences and hormonal control of histamine methyltransferase activity. *Biochim Biophys Acta* (1965), 111, 416-421.

SOGO, L. F. UND YAFFE, M. P.

Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* (1994), 126, 1361-1373.

SOTTOCASA, G. L.; KUYLENSTIERNA, B.; ERNSTER, L. UND BERGSTRAND, A.

An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J Cell Biol* (1967), 32, 415-438.

SOTTOCASA, G. L. UND SANDRI, G.

Intramitochondrial distribution of cytochrome P-450 in ox adrenal cortex. *Biochem J* (1970), 116, 16P-17P.

SPAHN-LANGGUTH, H. UND BENET, L. Z.

Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab Rev* (1992), 24, 5-47.

SPATZ, L. UND STRITTMATTER, P.

A form of cytochrome b5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1971), 68, 1042-1046.

SPATZ, L. UND STRITTMATTER, P.

A form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b 5 reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane-binding segment. *J Biol Chem* (1973), 248, 793-799.

SPEER, O.; BACK, N.; BUERKLEN, T.; BRDICZKA, D.; KORETSKY, A.; WALLIMANN, T. UND ERIKSSON, O.

Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem J* (2005), 385, 445-450.

STASIECKI, P.; OESCH, F.; BRUDER, G.; JARASCH, E. D. UND FRANKE, W. W.

Distribution of enzymes involved in metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons among rat liver endomembranes and plasma membranes. *Eur J Cell Biol* (1980), 21, 79-92.

STEVENS, J. L. UND BAKKE, J. E.

S-Methylation. In: *Conjugation reactions in drug metabolism: an integrated approach; substrates, co-substrates, enzymes and their interactions in vivo and in vitro*. Mulder, G. J., Taylor & Francis: London (1990), 251-272.

STIRPE, F. UND DELLA CORTE, E.

The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* (1969), 244, 3855-3863.

STOEHRER, G.

Reduction of hydroxylamine derivatives by xanthine oxidase. *Israel Journal of Chemistry* (1968), 6, 845-846.

STRITTMATTER, P.

The interaction of nucleotides with microsomal cytochrome reductase. *J Biol Chem* (1958), 233, 748-753.

STRITTMATTER, P.

The properties of nucleotide complexes with microsomal cytochrome reductase. *J Biol Chem* (1959), 234, 2665-2669.

STRITTMATTER, P.

The nature of the heme binding in microsomal cytochrome b5. *J Biol Chem* (1960), 235, 2492-2497.

STRITTMATTER, P.

The characterization and interconversions of two conformational states of cytochrome b5 reductase. *J Biol Chem* (1971), 246, 1017-1024.

STRITTMATTER, P. UND DAILEY, H. A.

Essential structural features and orientation of cytochrome b5 in membranes. *Membr. Transp.* (1982), 1, 71-82.

STRITTMATTER, P.; HACKETT, C. S.; KORZA, G. UND OZOLS, J.

Characterization of the covalent cross-links of the active sites of amidinated cytochrome b5 and NADH:cytochrome b5 reductase. *J Biol Chem* (1990), 265, 21709-21713.

STRITTMATTER, P.; KITTLER, J. M. UND COGHILL, J. E.

Characterization of the role of lysine 110 of NADH-cytochrome b5 reductase in the binding and oxidation of NADH by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* (1992a), 267, 20164-20167.

STRITTMATTER, P.; KITTLER, J. M.; COGHILL, J. E. UND OZOLS, J.

Characterization of lysyl residues of NADH-cytochrome b5 reductase implicated in charge-pairing with active-site carboxyl residues of cytochrome b5 by site-directed mutagenesis of an expression vector for the flavoprotein. *J Biol Chem* (1992b), 267, 2519-2523.

STRITTMATTER, P.; ROGERS, M. J. UND SPATZ, L.

The binding of cytochrome b 5 to liver microsomes. *J Biol Chem* (1972), 247, 7188-7194.

STRITTMATTER, P.; SPATZ, L.; CORCORAN, D.; ROGERS, M. J.; SETLOW, B. UND REDLINE, R.

Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1974), 71, 4565-4569.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. UND BERG, J. M.

Biochemie. Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg (2003)

SUGIHARA, K.; KITAMURA, S. UND TATSUMI, K.

Involvement of liver aldehyde oxidase in conversion of N-hydroxyurethane to urethane. *J Pharmacobiodyn* (1983b), 6, 677-683.

SUGIHARA, K.; KITAMURA, S. UND TATSUMI, K.

Evidence for reduction of hydroxamic acids to the corresponding amides by liver aldehyde oxidase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* (1983a), 31, 3366-3369.

SUGIHARA, K. UND TATSUMI, K.

Participation of liver aldehyde oxidase in reductive metabolism of hydroxamic acids to amides. *Arch Biochem Biophys* (1986), 247, 289-293.

SUNDSETH, S. S. UND WAXMAN, D. J.

Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid omega-hydroxylases. Male specificity of liver and kidney CYP4A2 mRNA and tissue-specific regulation by growth hormone and testosterone. *J Biol Chem* (1992), 267, 3915-3921.

SUTHERLAND, L.; EBNER, T. UND BURCHELL, B.

The expression of UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 family in human liver and kidney and in response to drugs. *Biochem Pharmacol* (1993), 45, 295-301.

SWARUP, G.; COHEN, S. UND GARBERS, D. L.

Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem Biophys Res Commun* (1982), 107, 1104-9.

SZYMONA, O. UND SZUMILO, T.

Adenosine triphosphate and inorganic polyphosphate fructokinases of *Mycobacterium phlei*. *Acta Biochim Pol* (1966), 13, 129-143.

TABOR, C. W.; TABOR, H. UND ROSENTHAL, S. M.

Purification of amine oxidase from beef plasma. *J Biol Chem* (1954), 208, 645-661.

TACHIBANA, T.; TANIGUCHI, S.; IMAMURA, S.; FUJIWARA, M. UND HAYASHI, H.

Effects of drugs on the activity of histamine-N-methyltransferase from guinea pig skin. *Biochem Pharmacol* (1988), 37, 2872-2876.

TAKESUE, S. UND OMURA, T.

Immunological similarity between NADH-cytochrome c reductases of mitochondrial outer membrane and microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* (1970), 40, 396-401.

TAN, C. A. UND ROBERTS, M. F.

Vanadate is a potent competitive inhibitor of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Biochim Biophys Acta* (1996), 1298, 58-68.

TANIGUCHI, H.; IMAI, Y. UND SATO, R.

Role of the electron transfer system in microsomal drug monooxygenase reaction catalyzed by cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* (1984), 232, 585-596.

TATSUMI, K. UND ISHIGAI, M.

Oxime-metabolizing activity of liver aldehyde oxidase. *Arch Biochem Biophys* (1987), 253, 413-418.

TENHUNEN, J. UND ULMANEN, I.

Production of rat soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase forms from bifunctional mRNAs. *Biochem J* (1993), 296, 595-600.

TESTA, B.

Biochemistry of redox reactions. Testa, B., Caldwell, J., Acad. Press: London (1995).

TESTAI, E.

The drug-metabolizing enzymatic system and the experimental tools used for in vitro toxicology for metabolic studies. *Cell Biol Toxicol* (2001), 17, 271-285.

THAKKER, D. R. UND CREVELING, C. R.

O-Methylation. In: *Conjugation reactions in drug metabolism: an integrated approach; substrates, co-substrates, enzymes and their interactions in vivo and in vitro*. Mulder, G. J., Taylor & Francis: London (1990), 193-232.

THOMAS, T. C. UND McNAMEE, M. G.

Purification of membrane proteins. *Methods Enzymol* (1990), 182, 499-520.

TOFTGARD, R. UND NILSEN, O. G.

Effects of xylene and xylene isomers on cytochrome P-450 and in vitro enzymatic activities in rat liver, kidney and lung. *Toxicology* (1982), 23, 197-212.

TONEGAWA, Y.; UMEDA, N.; HAYAKAWA, T. UND ISHIBASHI, T.

Evaluation of data in terms of two-dimensional random walk model: interaction between NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5. *Biomed Res* (2005), 26, 207-212.

TORRETTI, J. UND WEINER, I. M.

The Renal Excretion of Drugs. In: *Renal pharmacology*. Martinez-Maldonado, M., Appleton: New York (1976), 357-379.

TREFOUËL, J.; NITTI, F. UND BOVET, D.

Action of p-aminophenylsulfamide in experimental streptococcus infections of mice and rabbits. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales* (1935), 120, 756-758.

TUCKER, G. T.

Measurement of the renal clearance of drugs. *Br J Clin Pharmacol* (1981), 12, 761-770.

UEDA, O.; SUGIHARA, K.; OHTA, S. UND KITAMURA, S.

Involvement of molybdenum hydroxylases in reductive metabolism of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian skin. *Drug Metab Dispos* (2005), 33, 1312-1318.

- UENG, T. H.; FRIEDMAN, F. K.; MILLER, H.; PARK, S. S.; GELBOIN, H. V. UND ALVARES, A. P.
Studies on ethanol-inducible cytochrome P-450 in rabbit liver, lungs and kidneys. *Biochem Pharmacol* (1987), 36, 2689-2691.
- ULLRICH, K. J.; RUMRICH, G.; GEMBORYS, M. UND DEKANT, W.
Transformation and transport: how does metabolic transformation change the affinity of substrates for the renal contraluminal anion and cation transporters? *Toxicol Lett* (1990), 53, 19-27.
- ULLRICH, K. J.; RUMRICH, G. UND KLOSS, S.
Contraluminal para-aminohippurate transport in the proximal tubule of the rat kidney. III. Specificity: monocarboxylic acids. *Pflugers Arch* (1987), 409, 547-554.
- UZZELL, T. UND SPOLSKY, C.
Origin of mitochondria. *Science* (1973), 180, 516-517.
- VAN LOON, J. A.; SZUMLANSKI, C. L. UND WEINSHILBOUM, R. M.
Human kidney thiopurine methyltransferase. Photoaffinity labeling with S-adenosyl-L-methionine. *Biochem Pharmacol* (1992), 44, 775-785.
- VAN LOON, J. A. UND WEINSHILBOUM, R. M.
Thiopurine methyltransferase isozymes in human renal tissue. *Drug Metab Dispos* (1990), 18, 632-638.
- VATSIS, K. P. UND WEBER, W. W.
Human *N*-Acetyltransferases. In: *Conjugation-deconjugation reactions in drug metabolism and toxicity*. Kauffman, F. C., Bock, K. W., Springer: Berlin (1994), 109-130.
- VICKERS, A. E.; FISCHER, V.; CONNORS, M. S.; BIGGI, W. A.; HEITZ, F.; BALDECK, J. P. UND BRENDEL, K.
Biotransformation of the antiemetic 5-HT₃ antagonist tropisetron in liver and kidney slices of human, rat and dog with a comparison to in vivo. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* (1996), 21, 43-50.
- VREE, T. B.; HEKSTER, Y. A. UND ANDERSON, P. G.
Contribution of the human kidney to the metabolic clearance of drugs. *Ann Pharmacother* (1992), 26, 1421-1428.
- WAN, S. H. UND RIEGELMAN, S.
Renal contribution to overall metabolism of drugs. I. Conversion of benzoic acid to hippuric acid. *J Pharm Sci* (1972), 61, 1278-1284.
- WEBER, W. W. UND GLOWINSKI, I. B.
Acetylation. In: *Enzymatic basis of detoxication*. Jakoby, W. B., Acad. Press: New York (1980), 169-186.
- WEIDEMANN, M. J.; HEMS, D. A. UND KREBS, H. A.
Effects of adenine nucleotides on renal metabolism. *Nephron* (1969), 6, 282-296.

WEINSHILBOUM, R. M.

Human erythrocyte catechol-O-methyltransferase: correlation with lung and kidney activity. *Life Sci* (1978), 22, 625-630.

WEINSHILBOUM, R. M.; RAYMOND, F. A. UND FROHNAUER, M.

Monogenic inheritance of catechol-O-methyltransferase activity in the rat -- biochemical and genetic studies. *Biochem Pharmacol* (1979), 28, 1239-1247.

WERMUTH, B.; PLATTS, K. L.; SEIDEL, A. UND OESCH, F.

Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxication in man. *Biochem Pharmacol* (1986), 35, 1277-1282.

WESTERMANN, B.; HERRMANN, J. M. UND NEUPERT, W.

Analysis of mitochondrial translation products in vivo and in organello in yeast. *Methods Cell Biol* (2001), 65, 429-438.

WEYLER, W.; HSU, Y. P. UND BREAKFIELD, X. O.

Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol Ther* (1990), 47, 391-417.

WIKVALL, K.

Cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of vitamin D to its hormonal form (review). *Int J Mol Med* (2001), 7, 201-209.

WILLIAMS, R. T.

The biogenesis of conjugation and detoxication products. In: *Biogenesis of natural compounds*. Bernfeld, P., Pergamon Press: Oxford (1967), 589-639.

WITTKER, B.; MACKIE, I. J.; MACHIN, S. J.; TIMM, U.; ZELL, M. UND GOGGIN, T.

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Ro 44-3888 after single ascending oral doses of sibraxiban, an oral platelet aggregation inhibitor, in healthy male volunteers. *Br J Clin Pharmacol* (1999), 47, 521-530.

WONG, K. P.

Measurement of nanogram quantities of UDP-glucuronic acid in tissues. *Anal Biochem* (1977), 82, 559-563.

WOZNEY, J. M.

Using purified protein to clone its gene. *Methods Enzymol* (1990), 182, 738-751.

XIE, J.; ZHU, H.; LARADE, K.; LADOUX, A.; SEGURITAN, A.; CHU, M.; ITO, S.; BRONSON, R. T.; LEITER, E. H.; ZHANG, C. Y.; ROSEN, E. D. UND BUNN, H. F.

Absence of a reductase, NCB5OR, causes insulin-deficient diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004), 101, 10750-10755.

YAMADA, H.; SHIYAMA, S.; SOEJIMA-OHKUMA, T.; HONDA, S.; KUMAGAI, Y.; CHO, A. K.; OGURI, K. UND YOSHIMURA, H.

Deamination of amphetamines by cytochromes P450: studies on substrate specificity and regioselectivity with microsomes and purified CYP2C subfamily isozymes. *J Toxicol Sci* (1997), 22, 65-73.

YAN, B.; YANG, D.; BRADY, M. UND PARKINSON, A.

Rat kidney carboxylesterase. Cloning, sequencing, cellular localization, and relationship to rat liver hydrolase. *J Biol Chem* (1994), 269, 29688-29696.

YANG, M. X. UND CEDERBAUM, A. I.

Interaction of ferric complexes with NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5: lipid peroxidation, H₂O₂ generation, and ferric reduction. *Arch Biochem Biophys* (1996), 331, 69-78.

YASUNAMI, M.; CHEN, C. S. UND YOSHIDA, A.

A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991), 88, 7610-7614.

YOKOTA, H.; FUKUDA, T. UND YUASA, A.

Differential effects of phospholipids on two similar forms of UDP-glucuronyltransferase purified from rat liver and kidney microsomes. *J Biochem (Tokyo)* (1991), 110, 50-53.

YOSHIMOTO, M.; KUSUNOSE, E.; YAMAMOTO, S.; MAEKAWA, M. UND KUSUNOSE, M.

Purification and characterization of two forms of cytochrome P-450 from rat kidney cortex microsomes. *Biochem Int* (1986), 13, 749-755.

YUBISUI, T.; NAITOH, Y.; ZENNO, S.; TAMURA, M.; TAKESHITA, M. UND SAKAKI, Y.

Molecular cloning of cDNAs of human liver and placenta NADH-cytochrome b5 reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1987), 84, 3609-3613.

YUBISUI, T. UND TAKESHITA, M.

Characterization of the purified NADH-cytochrome b5 reductase of human erythrocytes as a FAD-containing enzyme. *J Biol Chem* (1980), 255, 2454-6.

ZENSER, T. V.; MATTAMMAL, M. B. UND DAVIS, B. B.

Differential distribution of the mixed-function oxidase activities in rabbit kidney. *J Pharmacol Exp Ther* (1978), 207, 719-725.

ZENSER, T. V.; MATTAMMAL, M. B. UND DAVIS, B. B.

Demonstration of separate pathways for the metabolism of organic compounds in rabbit kidney. *J Pharmacol Exp Ther* (1979), 208, 418-421.

ZHANG, S.; YANG, Y. UND SHI, Y.

Characterization of human SCD2, an oligomeric desaturase with improved stability and enzyme activity by cross-linking in intact cells. *Biochem J* (2005), 388, 135-142.

ZHU, H.; QIU, H.; YOON, H. W.; HUANG, S. UND BUNN, H. F.

Identification of a cytochrome b-type NAD(P)H oxidoreductase ubiquitously expressed in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999), 96, 14742-14747.

ZIEGLER, D. M.

Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab Rev* (1988), 19, 1-32.

ZIEGLER, D. M. UND PETTIT, F. H.

Microsomal oxidases. I. The isolation and dialkylarylamine oxygenase activity of pork liver microsomes. *Biochemistry* (1966), 5, 2932-2938.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas sowie die stetige Diskussionsbereitschaft und die mir gewährte Unterstützung möchte ich mich bei meinem Doktorvater herzlich bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn HD Dr. Thomas Kunze für seine immerwährende Bereitschaft zur Diskussion sowie vielen hilfreichen Tipps. Seine Hinweise und Ratschläge bei analytischen und biochemischen Fragen waren eine großartige Hilfe.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Florian Bittner (TU Braunschweig) für seine unermüdliche Zusammenarbeit sowie ständige Bereitschaft zur Unterstützung bei allen Fragen bezüglich molybdänhaltiger Enzyme bedanken. Für die Durchführung zahlreicher *nit-1* Assays, FormA Analysen und Western Blots bedanke ich mich gleichermaßen bei Tanja Otte (TU Braunschweig).

Ebenso sei Richard Jones (Division of Systems Toxicology, FDA/NCTR, Jefferson, AR 72079) für die massenspektrometrischen Analysen gedankt.

Für die Einarbeitung in die HPLC-Analytik und ständige Hilfe bei allen Fragen bzgl. HPLC möchte ich mich bei Sven Wichmann bedanken. Ebenso möchte ich mich bei Thomas Behrendt für seine Unterstützung bei vielen Enzymassays sowie der Durchführung von SDS-Gelelektrophoresen und ihren Anfärbungen bedanken. Petra Köster danke ich für die Unterstützung bei der Proteinreinigung. Arne und Detlef sei für ihre ständige Unterstützung und gute Zusammenarbeit im Bereich der EDV gedankt. Moni und Susanne aus dem Geschäftszimmer danke ich für Bearbeitung aller Formalien und sonstiger übertragener Arbeiten.

Mein weiterer Dank gilt Britta, Christiane, Dennis, Helen, Jacek, Jan, Martin und Ullvi für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 2. Semesters.

Für das zügige und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit sowie hilfreichen und konstruktiven Hinweisen bedanke ich mich bei Dennis, Ilka, Sabine, Sanja und Thomas.

Allen meinen Kollegen, insbesondere der „Reinigungsgruppe“, bin ich für ihren freundschaftlichen Umgang sowie ständiger Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sehr dankbar.

DANKSAGUNG

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinen Freunden Anja, Ule, Dana, Lutz, Conny, Frank und Juliane sowie Inga, Lina, Lisa und Jens, mit denen ich Vieles erlebt habe. Sie hatten großen Anteil an der Gestaltung meines Lebens.

Ebenfalls möchte ich mich bei Stefan, Hendrik, Thorsten, Marc, Heiner und Jana für die schon lange bestehende Freundschaft bedanken.

Mein letzter und ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder. Sie haben immer an mich geglaubt und mich jederzeit unterstützt.

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Familienname	Dirk Jan Holtkamp
Geburtsdatum	24. September 1976
Geburtsort	Gronau/Westfalen
Staatangehörigkeit	deutsch

SCHULAUSS BILDUNG

1983 – 1987	Grundschule, Bad Bentheim/Gildehaus
1987 – 1996	Missionsgymnasium St. Antonius, Bad Bentheim/Bardel

ZIVILD IENST

Juni 1996 – Juni 1997	Deutsches Rotes Kreuz, Nordhorn
-----------------------	---------------------------------

STUDIUM

1997 – 2001	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Frühjahr 1999	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar 2000 – Dezember 2000	Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
November 2001	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar 2002 – Juni 2002	Pharmaziepraktikum in der Belvedere-Apotheke, Kiel
Juli 2002 – Dezember 2002	Pharmaziepraktikum im Department of Clinical Pharmacology, Flinders Medical Centre, Bedford Park, South Australia 5042, Australien
Januar 2003	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

BERUFLICHE TÄTIGKEIT UND WEITERBILDUNG

Seit März 2003	Wissenschaftlicher Angestellter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
Seit August 2006	Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik

Publikation:

HOLTKAMP, D.; HAVEMEYER, A.; KUNZE, T.; BITTNER, F.; MENDEL, R. R.; JONES, R. C.; UND CLEMENT, B.
Identification of the third component active in reduction of benzamidoxime in combination with cytochrome b₅ und NADH cytochrome b₅ reductase in pig kidney mitochondria (in Vorbereitung).

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, im März 2007

Dirk Holtkamp

Stark basische Verbindungen mit Amidin- und Guanidinstruktur liegen unter physiologischen Bedingungen überwiegend protoniert vor. Enthalten Arzneistoffe solche funktionelle Gruppen, werden sie schlecht im Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die Herabsetzung dieser starken Basizität ist durch die *N*-Hydroxylierung des Amidins oder Guanidins möglich, wodurch die Verbindung resorbierbar wird. Nach Resorption findet die *N*-Reduktion durch Mikrosomen und Mitochondrien hepatisch und extrahepatisch statt. Die Kenntnis der an der *N*-Reduktion beteiligten Enzyme ist hilfreich zur Risikoabschätzung von unerwünschten Wirkungen der resorbierten Substanzen. Mit spezifischen Inhibitoren wurde die Beteiligung von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase am *N*-reduzierenden Enzymsystem sowohl in den Mikrosomen als auch in den Mitochondrien der Schweineniere demonstriert. Ferner konnte mit den Mikrosomen gezeigt werden, dass die Beteiligung eines Cytochrom P450 Isoenzym an dieser Reaktion in der Schweineniere auszuschließen ist. Dafür konnte die Beteiligung eines Molybdäncofaktor-bindenden Enzyms gezeigt werden. Im Zuge dieser Studien konnte in den Mikrosomen ein hoher Anteil der äußeren mitochondrialen Membran als Verunreinigung demonstriert werden. Das Vorkommen des Enzymsystems ist somit vermutlich nicht auf die Mikrosomen zurückzuführen. Deshalb wurden Mitochondrien der Schweineniere bezüglich dieses Enzymsystems untersucht. Das Enzymsystem konnte auf der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert werden. Die Auftrennung der äußeren mitochondrialen Membran mit einem Anionenaustauscher führte zu einem Enzym, welches zusammen mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase die *N*-hydroxylierte Verbindung Benzamidoxim reduziert. Das gereinigte Enzym der Schweinenierenmitochondrien konnte als Molybdäncofaktor-bindendes Enzym identifiziert werden.

Strongly basic compounds with amidine and guanidine function are usually protonated under physiological conditions. Therefore, these drugs will not be absorbed, if they contain such functional groups. *N*-hydroxylation of amidines and guanidines decreases this strong basicity. In this case, the compounds can be readily absorbed. Following absorption, hepatic and extrahepatic microsomes and mitochondria are able to reduce these *N*-hydroxylated compounds. The knowledge of the enzymes participating in this *N*-reducing system is extremely helpful for risk analyses of undesired side effects caused by these absorbed compounds. In pig kidney microsomes and mitochondria the participation of cytochrome b_5 and NADH cytochrome b_5 reductase was demonstrated with specific inhibitors. Furthermore the participation of a cytochrome P450 isoenzyme could be excluded for the enzyme system in pig kidney. Instead of this, the participation of a Moco-binding enzyme was shown. In addition, it was demonstrated, that the microsomes were contaminated with outer mitochondrial membrane and it seems that this contamination is responsible for the microsomes *N*-reducing capability. Therefore the enzyme system was purified from pig kidney mitochondria and it was located on the outer mitochondrial membrane. Further purification of the outer mitochondrial membrane with anion exchange chromatography lead to an enzyme, that was able to reduce the *N*-hydroxylated compound benzamidoxime in combination with cytochrome b_5 and NADH cytochrome b_5 reductase. The purified enzyme of pig kidney mitochondria was identified as a Moco-binding enzyme.